

ТОМ 36

ВЫПУСК 1

ЯНВАРЬ — ФЕВРАЛЬ

Двухмесячный научно-теоретический журнал

Основан в 1955 г.

ВОПРОСЫ МЕДИЦИНСКОЙ ХИМИИ



РЕДАКЦИОННАЯ КОЛЛЕГИЯ:

Главный редактор С. С. ДЕБОВ

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

РЕДАКЦИОННЫЙ СОВЕТ:

Баев А. А. (Москва)	Троицкий Г. В. (Симферополь)
Бычков С. М. (Москва)	Туракулов Я. Х. (Ташкент)
Константинов А. А. (Хабаровск)	Тяхепплд Л. Я. (Тарту)
Кудряшов Б. А. (Москва)	Яковлев Н. П. (Ленинград)
Ляхович В. В. (Новосибирск)	Ясайтис А. А. (Вильнюс)
Пасхина Т. С. (Москва)	



И. А. Лисняк

ПРИРОДА АНГИОГЕННЫХ ФАКТОРОВ (ОБЗОР)

Институт проблем онкологии им. Р. Е. Кавецкого АН УССР, Киев

На возможность существования гуморальных факторов ангиогенеза указывал еще Ide в 1939 г. [28]. Данные, подтверждающие это предположение, были получены лишь в 1968 г. при имплантации в защечный мешок хомяков меланомы, помещенной в камеру с миллипоровым фильтром [25].

Использованный фильтр служил перегородкой, отделяющей васкулярное ложе тканей организма от опухоли. В этом эксперименте, невзирая на отсутствие прямого контакта опухоли с васкулярным ложем организма-реципиента, наблюдали образование новых сосудов, устремляющихся к индуктору. Позднее выяснилось, что индукция капиллярообразования — свойство не только опухолей, но и многих нормальных тканей и клеточных элементов [4, 26, 47].

Дальнейшие усилия исследователей были направлены на поиски веществ, ответственных за индукцию капиллярообразования. Работа велась в нескольких направлениях: получение ангиогенных факторов из опухолей и нормальных тканей, определение общности и различий в биохимических характеристиках и ангиогенном эффекте.

В настоящее время существует уже значительное количество работ, основная часть которых посвящена получению и очистке указанных факторов. В них выделенные индукторы представлены веществами, значительно различающимися по многим признакам — молекулярной массе, структуре и т. д. Однако результаты этих исследований часто противоречивы.

Ангиогенные факторы из опухолей. Руководствуясь гипотезой о растворимой природе выделяемого опухолью вещества и используя традиционные хроматографические методы выделения, Folkman и соавт. в 1971 г. [23] показали наличие ангиогенной активности в экстракте из карциномы Уокера 256, растущей как в солидной, так и в асцитной форме. Разделяя экстракты из этой опухоли на сефадексе G-100, авторы получили 4 фракции, из которых только 2 (м. м. 35—300 кД) обладали ангиогенной активностью при введении этого материала в подкожный воздушный мешок крысам. Была получена также ангиогенная активность из экстрактов мышинной меланомы В 16, нейробластомы человека, опухоли Вильмса, гепатобластомы.

Немного позже Phillips и соавт. [21], разделяя на том же сефадексе экстракты из карциномы

Уокера, спонтанной опухоли молочной железы у крыс, опухоли Вильмса, нейробластомы, гипернефромы у взрослых, гемангиомы у детей, а также нормальной и регенерирующей печени у крыс, ткани почек человека, подтвердили данные, полученные Folkman и соавт. о наличии ангиогенной активности в полученных фракциях. Ее оценивали по образованию новых сосудов при вживлении крысам подкожно миллипоровых трубочек, наполненных материалом полученных фракций. Наличие зоны неоваскуляризации подтверждалось также гистологически. Аналогичным способом полученные из экстрактов нормальных тканей фракции ангиогенной активностью не обладали.

Активность разрушалась при обработке материала протеазами либо при нагревании, что указывает на белковую природу полученного ангиогенного фактора. Активный материал содержал приблизительно 25 % РНК, 10 % белка и 50 % сахаридов.

Первоначально молекулярная масса ангиогенного фактора определялась в диапазоне 35—300 кД [23], позже с усовершенствованием методов очистки она оценивалась приблизительно в 100 кД [22]. Однако применение дальнейшей, более тонкой очистки фактора привело к получению индукторов с другой молекулярной массой. Так, низкомолекулярные ангиогенные факторы (200—800 Д) были получены независимо в нескольких лабораториях при использовании той же карциномы Уокера 256 в качестве источника ангиогенного фактора.

Подвергая полученный с помощью хроматографии на сефадексе G-100 активный материал изоэлектрофокусированию и ионообменной хроматографии на ДЭАЭ-целлюлозе [42], получили эндотелиестимулирующий фактор с м. м. 210 Д, не содержащий нуклеотидов и пептидов.

В то время как полуочищенный на G-100 ангиогенный фактор из карциномы Уокера 256 стимулировал деление эндотелиальных клеток *in vivo* и *in vitro*, фактор с м. м. 210 Д не обладал такой активностью и не оказывал стимулирующего действия на рост эндотелиальных клеток аорты в культуре, однако он способствовал неоваскуляризации почечной ткани.

Аналогичный фактор был получен Mc Auslan [43] из парацитовидной железы и ЗТЗ клеток. Ангиогенная активность обнаруживалась у вещества с м. м. 3 кД, которое диссоциировало на неактивную часть и компонент с м. м. 210 Д, содержащий медь.

Другой группой исследователей [59] был также получен ангиогенный фактор с низкой молекулярной массой (200—300 Д). Активность его определялась в тесте на хорион-аллантаиновой мембране куриных эмбрионов. Процедура очистки включала получение полуочищенных фракций гелем-фильтрацией на сефадексе G-100, дальнейшую их хроматографию на ионообменнике ДЭАЭ-целлюлозе и аффинную хроматографию с исполь-

зованием антител против полуочищенного гель-фильтрацией ангиогенного фактора. Обработка аффинного комплекса элюентом с низким рН приводила к появлению низкомолекулярного фактора (200 Д), который вызывал неоваскуляризацию *in vitro* и стимулировал пролиферацию эндотелиальных клеток капилляров в культуре [31] в пикомольных количествах. Выделенный фактор не является простагландином, пептидом или дериватом нуклеиновых кислот, не определяется при UV-спектрофотометрии [59], а также не содержит ионов меди в отличие от эндотелиястимулирующего фактора, полученного группой Mc Auslan.

Аналогичный индуктор был получен также из карциномы Льюиса [2]. Последовательная хроматография экстракта на сефадексе G-100 и ДЭАЭ-целлюлозе позволила получить ангиогенное вещество с м. м. 60—80 кД, что подтверждалось электрофорезом в денатурирующих условиях. Дальнейшая обработка этого компонента буфером с рН ниже 3,0 либо 10 % изопропанолом приводила к появлению диализируемого вещества с молекулярной массой около 60 Д [3]. Последнее, как и высокомолекулярная субстанция, вызывало сильный ангиогенный эффект в тесте на хорион-аллантаической мембране куриных эмбрионов.

Fenselau и соавт. [19] был получен ангиогенный фактор (м. м. 400—800 Д), который в отличие от фактора, выделенного группой Weiss [59], определялся при 260 им. Авторы использовали в качестве исходного материала асцитную форму карциномы Уокера. Ангиогенный фактор получали в отличие от предыдущих авторов экстракцией лиофилизированного опухолевого материала абсолютным этанолом и последующей колоночной хроматографией на силикагеле. Полученное вещество вызывало неоваскуляризацию *in vivo* и стимулировало деление эндотелиальных клеток *in vitro*.

Фактор с низкой молекулярной массой (приблизительно 200 Д), полученный группой Shog [50], оказался активным для клеток эндотелия капилляров, растущих на субстрате с нативным коллагеном [31], и не проявлял активности по отношению к эндотелиальным клеткам аорты.

Используя опухоль легких человека, растущую в культуре без сыворотки в течение 12 мес, Kumar и соавт. [38] выделили ангиогенный фактор из культуральной среды, применяя последовательно гель- и ионообменную хроматографию. Молекулярная масса полученного вещества составляла приблизительно 80 кД. Обработка его растворами с рН 2,0—3,0 приводила к высвобождению низкомолекулярного компонента с массой около 300 Д, не поглощающего ультрафиолет при 260 нм. Характерно, что такой же низкомолекулярный компонент обнаружен в свободной форме и в самой культуральной среде. В связи с этим авторами высказывается предположение о существовании связи низкомолекулярного компонента с высокомолекулярным носителем белковой природы. Длительный рост опухолевых клеток в бессывороточной среде исключил возможность образования ангиогенной активности из белков сыворотки.

Ангиогенные факторы, молекулярная масса которых не определялась, были выделены из опухоли центральной нервной системы [44] и клеток

меланомы человека [56], растущих в культуре.

Следует, однако, отметить, что ни один из описанных выше ангиогенных факторов не был получен в количестве, необходимом для анализа. И только недавно [53—55], используя хондросаркому в качестве исходного материала, выделили фактор с молекулярной массой около 18 кД и изоэлектрической точкой 9,8. Используя две ступени очистки (на ионообменнике Bio-Rex и гепарин-сефарозе), авторы достигли 500 000-кратной очистки полученного фактора. Выделенный ими фактор стимулировал пролиферацию клеток эндотелия в концентрации 1 нг/мл и васкуляризацию *in vitro* в концентрации 120 нг/мл в течение 24 ч. Неоваскуляризация не сопровождалась воспалительными процессами.

Другой белок, проявляющий ангиогенное действие и названный ангиогенином, был выделен из культуральной среды с клетками аденокарциномы [20]. Ангиогенный эффект проявлялся при внесении его в количестве от 0,5 до 290 нг на хорион-аллантаическую мембрану и 50 нг в роговичном тесте на кроликах.

Ангиогенин представляет собой полипептид с м. м. 14,4 кД и рI 9,5. Свободные N-концевые аминокислоты этого пептида не выявлены, а C-концевая карбоксильная группа представлена пролином. При частичном гидролизе ангиогенина и последующем анализе всех фрагментов была установлена его полная первичная структура [57], состоящая из 123 аминокислотных остатков. Было также показано, что ангиогенин не является гликоконъюгатом, а компьютерный анализ дал возможность установить гомологию ангиогенина с панкреатической РНКазой, степень гомологии которой с указанным ферментом равна 35 % [51].

Базируясь на этой гомологии, была построена трехмерная структура ангиогенина [46]. Выяснилось, что структуры этих двух белков весьма сходны: число водородных связей в обоих белках примерно одинаковое, в одних и тех же положениях находятся 3 дисульфидные связи. Эти данные явились крайне важными для формирования представлений о возможной роли ангиогенина в организме [1]. По мнению Vallee [51], высокая степень гомологии его с РНКазой могла означать, что ангиогенин должен быть весьма специфической РНКазой, активность которой должна проявляться в атаке ограниченного числа участков в молекуле РНК. Это предположение было подтверждено: ангиогенин способен атаковать только 28S и 16S рРНК из клеток карциномы, образуя в качестве продуктов гидролиза нуклеотиды длиной 100—500 оснований, молекулярная масса которых значительно больше молекулярной массы продуктов гидролиза РНК, образованных под действием РНКазы.

Со способностью ангиогенина атаковать 28S и 16S рРНК связывается, по-видимому, и его ингибирующее действие на бесклеточную систему синтеза белка [11].

Ангиогенин был выделен также из нормальной человеческой плазмы крови [52]. Содержание его в нормальной плазме или сыворотке крови 60—150 мкг/л. В последнее время для указанного митогена был выделен ген и предполагается получение его в рекомбинантной форме [33]. Более подробно этот вопрос освещен в обзоре А. А. Клесова [1].

Осталось, однако, неизвестным, как рибонуклеазная активность фактора, обладающего высокими ангиогенными потенциями в тест-системах, может быть связана с механизмами ангиогенеза.

Ангиогенные факторы клеточных элементов и тканей неопухоловой природы. Полное представление об опухолевом ангиогенезе невозможно без изучения васкуляризации, вызываемой нормальными тканями, тем более, что определить границу между физиологическим и опухолевым ангиогенезом не представляется возможным. Васкуляризация — процесс универсальный для организма, в него вовлекаются многие ткани и клеточные элементы, выделяя в среду окружения растворимые ростовые факторы, мишенью для которых являются клетки эндотелия. Получение этих факторов — необходимое звено в анализе свойств, структуры и характера их действия в сравнении с опухолевыми ангиогенными факторами.

В последнее время в литературе появился ряд работ, посвященных выделению и характеристике факторов из нормальных тканей и клеточных элементов.

Эндотелийстимулирующий фактор с м. м. 210 Д был выделен из ткани парацитовидной железы и клеток ЗТЗ [43]. Этот фактор оказался полностью идентичен фактору из карциномы Уокера 256. Факторы, подобные или очень близкие по структуре и свойствам фактору, полученному из карциномы Уокера 256 [59], были выделены из синовиальной жидкости человека [7], а также из сетчатки кошки и быка [17, 34]. Вместе с тем другая группа авторов [13] при изучении ангиогенной активности бычьей сетчатки установила, что активность ассоциирована с двумя компонентами м. м. 50 и 70 кД. Дальнейшая очистка в среде с кислым значением рН и этанольная экстракция приводила к появлению фактора с м. м. 22 кД. Последний, как и два предыдущих компонента, проявлял митогенную активность в отношении клеток эндотелия *in vitro* [14]. Близкие по молекулярной массе ангиогенные факторы (68 кД) были получены из тех же тканей и в других исследованиях [17, 34]. В дальнейшем было показано наличие низкомолекулярного компонента, близкого по свойствам фактору, полученному из карциномы Уокера [34].

Низкомолекулярный ангиогенный фактор с м. м. был выделен из ткани почек [7]. Аналогичные факторы были получены из синовиальной жидкости пациентов, страдающих болезнями суставов. Факторы были обнаружены как в свободном состоянии, так и в связанной, высокомолекулярной форме, возможно, с белками-носителями. Особенно высокий уровень ангиогенной активности наблюдался у больных остеоартрозами. Выделяемые низкомолекулярные факторы по своим свойствам напоминают факторы, полученные группой Weiss из опухолевого материала. Имеются сообщения о наличии такого же фактора в стекловидном теле и сетчатке глаза у собак [10].

С другими характеристиками был выделен фактор из жидкости очага воспаления [5]. Он имеет м. м. 2—14 кД, не оказывает действия на деление эндотелиальных клеток, хотя вызывает их миграцию.

К клеточным компонентам, синтезирующим и

выделяющим факторы с ангиогенными свойствами, следует отнести лимфоциты, лейкоциты, макрофаги. Однако выделенные из этих клеток или из культуральной жидкости вещества с ангиогенными свойствами почти не изучены. Так, лимфоцитиндуцированный ангиогенез считается результатом действия выделяемых лимфоцитами медиаторов — лимфокинов. Последние, вступая в реакцию непосредственно с эндотелием или через активированные макрофаги, вызывают генерацию роста сосудов [4].

Макрофаги, активируемые *in vivo* и *in vitro*, а также среда, содержащая эти клетки, обладают ангиогенной способностью при введении в роговицу глаза морской свинке [47]. Было показано [28], что в процессе заживления раны, макрофаги, захватывающие дебрис, обладают высокой ангиогенной активностью. Последняя наблюдается особенно выражено при местной гипоксии и молочной-кисломой ацидозе. По мере приближения уровня кислорода и лактата к нормальному ангиогенная активность этих макрофагов резко снижается [32]. Гипоксия и лактат являются специфическими стимулами для синтеза ангиогенного фактора макрофагами. Характерно, что ни гипоксия, ни увеличение уровня лактата в тканях не стимулируют эндотелиальные клетки. Это указывает на специфику этих условий для ангиогенной деятельности макрофагов [30].

Недавно Polverini и соавт. [48] показали, что макрофаги инфильтрата опухоли способны увеличивать ее ангиогенные потенции в несколько раз, внося таким образом вклад в опухолевую неоваскуляризацию выделением собственного ангиогенного фактора. Выделенные из крысиной фибросаркомы макрофаги, уровень которых в ней достигает 22 %, поддерживали в условиях культуры. Культуральную жидкость концентрировали и в составе медленно высвобождающего вещества — полимера [39] вносили в роговичный карман глаза крысы. В результате степень васкуляризации была выше по сравнению с таковой, вызванной опухолевыми клетками.

Следует остановиться и на семействе ростовых факторов эндотелиальных клеток, избирательно связывающихся с гепарином. Это свойство легло в основу метода их выделения. Для этой группы митогенов характерны почти одинаковая м. м. 16—18 кД, сильно выраженная индукция пролиферации эндотелиальных клеток *in vitro* и неоваскуляризация *in vivo*. С использованием аффинной хроматографии на гепарине ростовые факторы, проявляющие активность в отношении клеток эндотелия, были получены из широкого спектра тканей. Многие из них выделены в гомогенном виде в количествах, необходимых для изучения биохимических свойств. Установлена первичная структура двух, аффинно связывающихся с гепарином ростовых факторов — основного фибробластного фактора (FGF) с рI 5—7 (146 аминокислотных остатков) и кислого с рI 8—10 (140 аминокислотных остатков) [18, 24, 25]. Выяснилось, что оба фактора, полученные из ткани мозга, имеют около 53 % гомологии.

Этот класс индукторов разделили на две группы полипептидов — анионные и катионные. Первые элюируются в колонки 1 М NaCl, имеют рI 5—7 и м. м. 15—18 кД. Это фактор ткани мозга [40],

фактор роста эндотелиальных клеток [41], фактор роста II, полученный из глаз [12] и из сетчатки [15]. Катионные полипептиды вымываются из колонки 1,5 М NaCl, имея при этом рI 8—10. Молекулярная масса их составляет 16—18,5 кД. Полипептиды этого класса получены из гипофиза [18], мозга [40], гипоталамуса [35], глаз [12], хряща [58], почек и макрофагов [4], плаценты [45]. Для многих веществ этой группы получены гены, и в дальнейшем предполагается получение их в рекомбинантной форме.

Сравнительный структурный анализ полипептидов этой группы позволяет разделить их на два класса — кислые и основные, прототипами которых может служить кислый и основной FGF [24]. Наиболее изученными в структурном плане являются основной FGF из ткани мозга и такой же, но синтезируемый клетками гепатомы [37]. Оба индуктора представлены несколькими молекулярными формами.

Получение той или иной молекулярной формы гепаринсвязывающих ангиогенных факторов, включая, возможно, и факторы с другими характеристиками, на наш взгляд, связано не столько с типом ткани, сколько со способом их выделения. Особенно решающим звеном могут быть условия первичной обработки ткани (рН экстрагирующей среды, ее ионная сила и т. д.). При анализе способов обработки материала выяснилось, что при экстракции ткани мозга и гепатомы в среде с нейтральным рН, молекулярная масса выделенного из обеих тканей фактора составляла 18,4 кД. Экстракция в среде с кислым значением рН приводила к получению из ткани мозга фактора с м. м. 18 кД. С другой стороны, при экстракции в кислой среде клеток гепатомы удалось выделить две формы FGF: одну с м. м. 18 кД, что соответствовало форме, полученной из мозга, и другую — с м. м. 16,5 кД, которая не обнаруживалась при экстракции мозговой ткани. Перекрестная преципитация с антителами к СООН-терминальному участку и участку с последовательностью аминокислот, взятому из середины молекулы основного FGF (последовательность с 33-го по 43-й остаток), показала полную идентичность молекулярных форм, получаемых как из ткани мозга, так и из гепатомы [37].

Эти данные позволяют сделать вывод, что экстракция FGF в среде с кислым значением рН

приводит к деградации фактора, причем деградация его связана, по-видимому, со спецификой той ткани, из которой выделялся фактор. На это указывает и тот факт, что из гепатомы экстракцией при кислом значении рН выделяются две молекулярные формы FGF, а из ткани мозга — одна, хотя обе ткани подвергались воздействию в одинаковых условиях. Характерно, что подобная фрагментация не обусловлена прямой деградацией, вызванной кислотами. Так, инкубация FGF, полученного из гепатомы и мозга в одинаковых условиях экстракции, в 0,1 % трифторуксусной кислоте рН 2,0 при 37 °С в течение 3 ч не сказывалась на изменении молекулярной массы, что подтверждалось хроматографией высокого давления в обращенной фазе.

На наш взгляд, причиной появления нескольких молекулярных форм FGF могут быть протеиназы, активность которых зависит от рН экстрагента. Возможно, экстракция в среде с кислым значением рН приводит к активации кислых протеиназ, а как стало известно недавно в этой среде на этапе экстракции могут активироваться по крайней мере две кислые протеиназы [18]. Одна обнаружена в мозге, ингибируется пепстатином и, возможно, приводит к редукции FGF в кислых условиях от пептида с м. м. 18,4 кД до пептида с м. м. 18 кД.

Очевидно, этот фермент активен и в клетках гепатомы, так как обнаруживается компонент с м. м. 18 кД. Вторая кислая протеиназа, ингибирующаяся лейпептином, найдена в гепатоме и отсутствует в мозге. Ее активация на этапе кислотной экстракции, очевидно, сказывается на редукции FGF из клеток этой ткани с м. м. 18,4—16,5 кД.

Другие факторы, такие, как фактор роста эндотелиальных клеток — EDGF [8], тромбоцитарный фактор [49], эпидермальный фактор — EGF [9], трансформирующий фактор — TGF [16], также представлены множественными молекулярными формами. Исключение составляет пока ангиогенин, полученный из растущей в культуре аденокарциномы [20].

Резюмируя представленный материал, следует заключить, что способность индуцировать ангиогенез не является прерогативой злокачественного роста, хотя может быть отнесена к обязательным его атрибутам. Опухолевые клетки отличаются постоянной экстракцией индукторов ангиогенеза

Биологическая активность факторов ангиогенеза, выделенных из злокачественных и нормальных тканей

Фактор	Ангиогенез, реакция	Действие на клетки эндотелия (реакция)		Источник получения
		Пролиферация	Миграция	
Низкомолекулярные ангиогенные факторы (м. м. 200—3000 Д)	+	+	+	Карцинома 256 [19, 42]; ткань паразитовидной железы [43]; 3Т3 клетки [43]; карцинома 344 [3]; опухоль легких человека [38]; синовиальная жидкость человека [7]; сетчатка кошки [17]; сетчатка быка [34]; почки [7]
Высокомолекулярные ангиогенные факторы (м. м. 20 кД)	+	+	+	Карцинома 256 [21, 23]; карцинома 344 [2]; сетчатка быка [13, 14, 17, 34]; синовиальная жидкость [6]
Гепаринсвязывающие ангиогенные факторы (м. м. 16—18 кД)	+	+	+	Хондросаркома [53—55]; мозг [40]; гипофиз [18]; гипоталамус [35]; хрящ [58]; почки [4]; макрофаги [4]; плацента [45]
Ангиогенин (м. м. 14,4 кД)	+	—	Не определялось	Аденокарцинома [20]; нормальная сыворотка (плазма) человека [52]

в окружающую среду, в то время как поступление этих факторов из нормальных тканей должно быть сопряжено либо с их разрушением, либо с получением особых импульсов (например, активация макрофагов). Набор и структура индукторов ангиогенеза, выделенных из злокачественных и нормальных тканей, идентичны (см. таблицу).

Отличительной чертой индукторов ангиогенеза является их множественность. Данные о новых факторах все продолжают поступать. Причины множественности пока неясны. Логично предположить, что множественность индукторов может быть связана с различной их ролью в таком сложном морфофункциональном процессе, как ангиогенез. Так, если гепаринсвязывающие факторы являются митогенами в отношении клеток эндотелия, то этой способностью не обладает ангиогенин. Их способность индуцировать ангиогенез связана со способностью содействовать инфильтрации активной зоны макрофагами, выделяющими в свою очередь эндотелиальные митогены. Как хемотактики, эти факторы помогают выстраиваться в побег клеткам эндотелия.

При объяснении причин множественности обращает на себя внимание такой интересный факт, как различная активность индукторов ангиогенеза: пороговые дозы для различных факторов могут отличаться на 1—2 порядка. Это дает основание считать, что эти факторы действуют не одновременно, а их функции как-то распределяются во времени.

Множественность молекулярных форм факторов может быть обусловлена разной чувствительностью эндотелия капилляров и более крупных сосудов к тем или иным индукторам. Выше приводились работы, в которых было выделено два фактора ангиогенеза: к одному чувствителен эндотелий капилляров, к другому — крупных сосудов.

Не исключено, что множественность связана и со способами получения и очистки факторов, особенно на этапе обработки тканей экстрагентами. Исходя из представленных данных и анализа способов получения факторов ангиогенеза на примере гепаринсвязывающих индукторов, ее можно, по-видимому, объяснить фрагментацией кислыми протеиназами на этапе экстракции в средах с кислым значением pH, гипотетической ангиогенной субстанции, имеющей молекулярную массу в несколько раз больше массы получаемых факторов и, возможно, находящуюся в нормальных тканях в неактивной форме. Не исключено, что в процессах фрагментации могут участвовать и другие протеиназы — нейтральные и щелочные.

Фрагментация может иметь физиологический смысл, так как подобное, вероятно, происходит и в тканях организма в результате изменения pH микроокружения, особенно при развитии злокачественного роста, где на фоне гипоксии может развиваться молочнокислый ацидоз. Последнее может способствовать активации соответствующих протеиназ. В целом процессинг ростовых факторов и другие посттрансляционные модификации могут играть важную роль в регуляции синтеза индукторов и их высвобождения клетками.

Цель данного обзора состояла не только в том,

чтобы воедино собрать известные факты, но и в том, чтобы оттенить весьма важную сторону проблемы — множественность форм ангиогенных факторов с рассмотрением ее возможных причин, которая нуждается в более глубоком изучении и понимании. В частности, например, следует решить такие вопросы: с чем связана наблюдаемая множественность молекулярных форм ангиогенных факторов, имеющих одинаковую физиологическую активность? Является ли степерь множественности форм тканеспецифичной? Существует ли общий предшественник ангиогенных факторов и каковы его характеристики? Не приходится сомневаться в том, что усиление внимания к этой стороне проблемы позволит получить полезную в теоретическом и практическом отношении информацию.

ЛИТЕРАТУРА

1. Клесов А. А. // Успехи совр. биол.— 1988.— Т. 106.— С. 264—279.
2. Лисняк И. А. // Укр. биохим. журн.— 1986.— № 6.— С. 58—61.
3. Лисняк И. А. // Экспер. онкол.— 1987.— № 1.— С. 70—72.
4. Auerbach R., Sydky Y. A. // J. Immunol.— 1979.— Vol. 123.— P. 751—758.
5. Banda M. J., Knighton D. R., Hunt T. K., Werb Z. // Proc. nat. Acad. Sci. USA.— 1982.— Vol. 79.— P. 7773—7776.
6. Baird A., Esch F., Bohlen P. et al. // Regul. Pep.— 1985.— Vol. 12.— P. 201—213.
7. Brown R. A., Tomlinson J. W., Hill C. R. et al. // Ann. rheum. Dis.— 1983.— Vol. 42.— P. 301—305.
8. Burgos H. // Europ. J. clin. Invest.— 1986.— Vol. 16.— P. 486—494.
9. Carpenter G., Cohen M. // Ann. Rev. Biochem.— 1979.— Vol. 48.— P. 193—216.
10. Chen C. H., Chen S. C. // Invest. Ophthalm.— 1980.— Vol. 19.— P. 596—602.
11. Clair D. K. S., Rybak S., Riordan J. F. et al. // Proc. nat. Acad. Sci. USA.— 1987.— Vol. 84.— P. 8330—8334.
12. Courthy J., Loret C., Moenner M. et al. // Biochemie.— 1985.— Vol. 67.— P. 265—269.
13. D'Amore P. Ap., Glaser B. M., Brunson S. K., Fenselau A. H. // Proc. nat. Acad. Sci. USA.— 1986.— Vol. 78.— P. 3068—3072.
14. D'Amore P. A. // J. Cell. Biol.— 1982.— Vol. 95.— P. 9055.
15. D'Amore P. A., Klagsbrun M. // Ibid.— Vol. 94.— P. 1545—1549.
16. Dart L. L., Smith D. A., Meyers C. A. // Biochemistry (Wash.).— 1985.— Vol. 24.— P. 5925—5931.
17. Elston S. F., Scoor A. M., Weiss J. B. // Invest. Ophthalm.— 1985.— Vol. 26.— P. 74—79.
18. Esch F., Baird A., Ling N. et al. // Proc. nat. Acad. Sci. USA.— 1985.— Vol. 82.— P. 6507—6511.
19. Fenselau A., Raiser A., Wallis K. // J. Cell. Physiol.— 1981.— Vol. 108.— P. 375—381.
20. Felt J., Stridom D., Lobb R. et al. // Biochemistry (Wash.).— 1985.— Vol. 24.— P. 5480—5486.
21. Phillips P., Steward J. K., Kumar S. // Int. J. Cancer.— 1976.— Vol. 17.— P. 549—558.
22. Folkman J. // Advanc. Cancer Res.— 1974.— Vol. 19.— P. 331—358.
23. Folkman J., Mersler E., Abernathy C., Williams G. // J. exp. Med.— 1971.— Vol. 113.— P. 275—288.
24. Folkman J., Klagsbrun M. // Science.— 1987.— Vol. 235.— P. 442—447.
25. Gimenes-Gallego G. // Ibid.— 1985.— Vol. 230.— P. 1385—1387.
26. Greenblatt M., Shubic P. // J. nat. Cancer inst.— 1985.— Vol. 41.— P. 111—118.
27. Hoffman H., McAuslan B., Robertson D., Burnett E. // Exp. Cell. Res.— 1976.— Vol. 102.— P. 269—275.
28. Hunt T. K., Andrews W. S., Halliday B. J. et al. // The Surgical Wound / Eds. P. Dineen, G. Hildick-Smith.— Philadelphia, 1981.— P. 1—30.
29. Ide A. G., Baker N. H., Warren S. L. // Amer. J. Roentgenol.— 1939.— Vol. 42.— P. 891—899.
30. Jensen J., Hunt T., Scheuensthe H., Banda M. // Lab. invest.— 1986.— Vol. 54.— P. 574—579.

31. Keegan A., Hill C., Kumar S. et al. // J. Cell Sci.— 1982.— Vol. 51.— P. 261—268.
32. Kumar S., West D., Shahabuddin S. et al. // Lancet.— 1983.— Vol. 2.— P. 364—367.
33. Kurachi K., Dawie E., Strydom D. et al. // Biochemistry (Wash.).— 1985.— Vol. 24.— P. 5494—5499.
34. Kissun R. D., Hill C. R., Garner A. et al. // Brit. J. Ophthal.— 1982.— Vol. 66.— P. 165—169.
35. Klagsbrun M., Shing Y. // Proc. nat. Acad. Sci. USA.— 1985.— Vol. 82.— P. 805—809.
36. Klagsbrun M., Sasse J., Sulivan R. // Ibid.— 1986.— Vol. 83.— P. 2448—2451.
37. Klagsbrun M., Smith S., Sullivan R. et al. // Ibid.— 1987.— Vol. 84.— P. 1839—1843.
38. Kumar S., Keegan A., Erroi A. et al. // Progress in Applied Microcirculation: Angiogenesis / Eds. F. Hammerson et al.— Birmingham, 1980.— Vol. 4.— P. 54—75.
39. Langer R., Folkman J. // Nature.— 1976.— Vol. 263.— P. 797—800.
40. Lobb R. R., Felt J. W. // Biochemistry (Wash.).— 1984.— Vol. 23.— P. 6295—6299.
41. Maciag T., Mehlman T., Friesel R., Schreiber A. // Science.— 1984.— Vol. 225.— P. 932—935.
42. McAuslan B. R., Hoffjan H. // Exp. Cell Res.— 1979.— Vol. 119.— P. 181—185.
43. McAuslan B. R. // Control Mechanisms in Animal Cells / Eds. L. Jimenez de Asasua et al.— New York, 1980.— P. 285—291.
44. Matsuno H. // Neurol. Med. Chir.— 1981.— Vol. 21.— P. 765—773.
45. Moscatelli D., Presfa M., Mignatt P. et al. // Anticancer Res.— 1986.— Vol. 64.— P. 861—865.
46. Palmer K. A., Scheraga H. A., Riordan J. F., Vallee B. L. // Proc. nat. Acad. Sci. USA.— 1986.— Vol. 83.— P. 1965—1969.
47. Polverini P. J., Cotran R. S., Gimbrone M. A., Unanue E. R. // Nature.— 1977.— Vol. 226.— P. 804—806.
48. Polverini P. J., Leibovich S. // Lab. Invest.— 1984.— Vol. 51.— P. 635—643.
49. Raines E. W., Ross R. // J. biol. Chem.— 1982.— Vol. 257.— P. 5154—5160.
50. Schor A. M., Schor S. L., Weiss J. B. et al. // Brit. J. Cancer.— 1980.— Vol. 41.— P. 790—799.
51. Schapiro R., Riordan J. F., Vallee B. L. // Biochemistry (Wash.).— 1986.— Vol. 25.— P. 3527—3534.
52. Schapiro R., Strydom D. J., Olson K. A., Vallee B. L. // Ibid.— 1987.— Vol. 26.— P. 5141—5146.
53. Shing Y., Folkman J., Murray J., Klagsbrun M. // J. Cell Biol.— 1983.— Vol. 97.— P. 295—301.
54. Shing Y., Folkman J., Sullivan R. // Science.— 1984.— Vol. 223.— P. 1296—1298.
55. Shing Y., Folkman J., Haudenschied C. et al. // J. Cell. Biochem.— 1985.— Vol. 29.— P. 275—309.
56. Stenzinger W., Brugger J., Macher E., Sorg C. // Europ. J. clin. Oncol.— 1983.— Vol. 19.— P. 649—656.
57. Strydom D. J., Felt J. W., Lobb R. R. et al. // Biochemistry (Wash.).— 1985.— Vol. 24.— P. 5486—5492.
58. Sullivan R., Klagsbrun M. // J. biol. Chem.— 1985.— Vol. 266.— P. 2399—2403.
59. Weiss J. B., Brown R. A., Kumar S., Phillips P. // Brit. J. Cancer.— 1979.— Vol. 40.— P. 493—496.

Поступила 18.01.89

ON THE NATURE OF ANGIOGENIC FACTORS

I. A. Lisnjak

Institute of Oncology Problems, Academy of Sciences of the Ukrainian SSR, Kiev

Literature data on angiogenic factors inducing neovascularization of both tumors and normal tissues are reviewed. Properties and structure of the factors isolated from tumors and non-tumoral tissues are considered. Multiple molecular forms of the angiogenic factors are discussed based on the data obtained as well as on analysis of these factors isolation. Acid proteinases appear to be responsible for this multiplicity. Possible fragmentation of the angiogenesis factors by means of proteinases is considered using as an example the factors isolated from brain and hepatoma tissues.

© В. Е. РЯБИНИН, Р. И. ЛИФШИЦ, 1990

УДК 616-001.17-074:616.153.939.15-39

В. Е. Рябинин, Р. И. Лифшиц

СОСТОЯНИЕ И ВОЗМОЖНЫЕ МЕХАНИЗМЫ НАРУШЕНИЙ КИСЛОРОДЗАВИСИМЫХ ПРОЦЕССОВ ПРИ ОЖГОВОЙ БОЛЕЗНИ (ОБЗОР)

Кафедра биохимии Челябинского медицинского института

Кислородзависимые процессы составляют основу метаболизма всех клеток, определяя интенсивность реакций аккумуляции и трансформации энергии, перекисного окисления липидов (ПОЛ), биотрансформации и детоксикации [20]. Нарушение окислительных процессов при различных патологических состояниях является основным метаболическим синдромом, формирующим развитие многочисленных морфофункциональных изменений. Изучение состояния и возможных механизмов нарушений этих процессов дает возможность установить общую закономерность и взаимообусловленность течения кислородзависимых реакций, т. е. уточнить патогенез заболевания и сделать более направленной и обоснованной коррекцию патохимических расстройств. Решение этих вопросов тесно связано с фундаментальными общебиологическими проблемами транспорта и утилизации кислорода в клетке, функционированием биомембран и компарментализацией биохимических реакций и может оказаться полезным для выявления сложных взаимоотношений различных метаболических процессов при экстремальных воздействиях.

К числу заболеваний, важным патогенетическим механизмом развития которых является нарушение окислительных процессов и возникновение гипоксии, относится ожоговая болезнь. В настоящее время известно большое количество работ, посвященных изучению вопроса о состоянии энергетического обмена и ПОЛ при ожоговой болезни, однако во многом остается неясным механизм нарушения и степень сопряженности процессов ПОЛ и аккумуляции, и трансформации энергии после термической травмы. Недостаточно исследуются состояние микросомальной системы окисления и метаболизирования лекарств в различные периоды ожоговой болезни [31, 38, 51, 53, 54] и связь этих реакций с окислительными процессами в митохондриях и ПОЛ.

Все вышеизложенное свидетельствует о необходимости рассмотрения и обобщения результатов исследований состояния кислородзависимых процессов при ожоговой болезни.

Ожоговая болезнь характеризуется нарушением гомеостатических механизмов транспорта и утилизации кислорода вследствие возникновения циркуляторной, гемической, гипоксической и тканевой форм гипоксии. Возникающая после термической травмы централизация кровообращения, которая носит приспособительный характер и обеспечивает в посттравматический период кровоснабжение сердца, легких, мозга, приводит к существенному нарушению регионального и периферического кровообращения. Это может проявляться, в частности, в ослаблении артериального притока к пе-

чени, уменьшении скорости портального кровотока, что в свою очередь приводит к уменьшению степени насыщения гемоглобина кислородом и падению напряжения кислорода в печени до 20—40 мм рт. ст. [25, 36]. Нарушение микроциркуляции, падение артериального давления и уменьшение объема циркулирующей крови являются также важными факторами, способствующими развитию циркуляторной гипоксии. Возникновению гипоксического состояния и последующей анемии способствуют повышенный гемолиз, гемоглобинемия и уменьшение скорости синтеза гема [4].

Изменение направленности окислительно-восстановительных процессов при ожоговой болезни происходит также вследствие нарушения функции внешнего дыхания, проявляющегося в уменьшении жизненного объема легких и нарушении бронхиальной проводимости, что ведет к уменьшению уровня оксигенации крови и появлению артериальной гипоксемии [17, 39]. Одновременно у больных с термической травмой происходит мобилизация всех механизмов, увеличивающих легочную вентиляцию, увеличиваются частота и минутный объем дыхания, что приводит к гипервентиляции и соответствующему усилению поглощения кислорода и основного обмена [9].

Выраженное усиление потребления кислорода у больных отмечается с 1-х суток после ожога со значительными колебаниями в процессе заболевания и нормализацией при выздоровлении [59, 69]. Степень гиперметаболизма, регистрируемая как отношение количества потребленного кислорода к количеству выделяемого углекислого газа, коррелирует с тяжестью ожога и может быть критерием как степени метаболических расстройств, так и эффективности проводимого лечения. Мнения различных исследователей в отношении природы и механизмов развития гиперметаболизма у обожженных носят противоречивый характер. Согласно одной точке зрения, повышенная продукция тепла представляет собой реакцию на потерю тепла с испарениями с поверхности раны, так как было обнаружено, что снижение основного обмена может произойти после погружения обожженного организма в теплую солевую ванну [47]. Однако другие исследователи не смогли доказать зависимость нарушений основного обмена от испарений, блокируя их обвертыванием раны водонепроницаемой оболочкой или определяя расход кислорода у обожженных в различных температурных условиях (от 19 до 33 °С). Основной обмен оказался значительно усиленным даже на фоне повышения температуры окружающей среды, что свидетельствует о том, что внешняя терморегуляция не является доминирующим стимулом ожогового гиперметаболизма, а избыточная продукция тепла является следствием повышенного обмена после термической травмы [46]. Об этом свидетельствуют результаты исследований, которые показали, что ни одна из травм не дает такого повышения метаболизма, как термическое поражение [62]. Гиперметаболическая реакция приводит к еще большему несоответствию между повышенной потребностью в кислороде, его транспортом и утилизацией. Так, при ожогах средней тяжести, несмотря на возросшее потребление кислорода, организм больного все-таки страдает от его не-

достатка. О недостаточном кислородном обеспечении тканей и органов свидетельствует, в частности, развитие ацидоза, обнаружение в крови большого количества недоокисленных продуктов [8, 18, 23, 33].

Распространенной является точка зрения, согласно которой развитие тканевой гипоксии при ожоговой болезни является следствием нарушения процессов микроциркуляции, возникновения циркуляторной, гемической и гипоксической форм гипоксии. Однако полярографические опыты по изучению динамики напряжения кислорода свидетельствуют о том, что сразу после ожога III степени во всех тканях, кроме мышц, нарастает кровоток и величина pO_2 [7, 11, 12]. Было показано, что увеличение pO_2 в начальный период ожоговой болезни может быть связано с усилением тканевого кровотока, однако дальнейшее увеличение pO_2 на фоне снижения тканевого кровотока свидетельствует об уменьшении потребления кислорода тканями, т. е. о развивающейся тканевой гипоксии. Это подтверждается и уменьшением потребления кислорода при его ингаляции обожженным. Исходя из этого, было сделано предположение, что нарушение окислительных процессов при ожоговой болезни связано не с недостатком кислорода в организме, а с нарушением его утилизации в клетке. В настоящее время имеются аргументированные предположения, что клетки животных и человека при шоке не способны утилизировать кислород даже при нормализации кровотока [15]. Возможной причиной данного явления может быть первичное изменение активности ферментативных окислительных систем клеток, возникающее не вследствие нарушения транспорта и низкого напряжения кислорода (критическая концентрация кислорода для некоторых ферментов составляет лишь 2—8 мм рт. ст.), а из-за изменений каталитических свойств самих ферментов, составляющих электронотранспортные цепи митохондрий, микросом и других кислородзависимых систем клетки. Какие же факторы могут вызывать нарушение активности ферментов при ожоговой болезни?

Некоторые исследователи считают, что нарушение тканевого дыхания является следствием ранней депрессии ретикуло-эндотелиальной системы (РЭС) и снижением резистентности организма обожженных к токсическому действию веществ гистиогенного происхождения [15, 16, 21, 50]. Еще в 1950 г. было высказано предположение, что главным следствием поступления токсических продуктов в кровь является блокада различных, в том числе и окислительных, ферментов, что приводит к тканевой гипоксии [13]. Поиски токсических субстанций привели к заключению о сложной и многофакторной природе ожоговой токсемии. Из обожженной кожи мышей был выделен токсичный высокомолекулярный гликопротеин, способный разрушать митохондриальную мембрану и подавлять действие АТФазы [68], выделен и охарактеризован токсичный липид-белковый комплекс, обладающий цитотоксическим действием, подавляющий энергетический обмен в клетке, интенсивность образования глюкозы и мочевины [21, 42, 43, 71]. Из крови обожженных и здоровых животных были выделены среднемолекулярные компоненты пептидной природы, обладающие ши-

роким спектром биологического действия и способны оказывать влияние на окислительные процессы в клетке [28]. Существенное влияние на кислородзависимые процессы может оказывать изменение гормонального статуса у обожженных, активация метаболизма арахидоновой кислоты и образование простагландинов, лейкотриенов и других медиаторов воспалительной реакции.

Наиболее чувствительными и быстрореагирующими системами при различных патологических воздействиях, в том числе и при ожоговой болезни, являются митохондрии, реакции которых значительно опережают реакции других субклеточных структур клетки. Так, уже в первые минуты после ожога в крови, сердце, печени, почках отмечается уменьшение содержания АТФ [10, 40], понижение активности цитохромоксидазы [14, 37], снижение содержания цитохромов b , $c+c_1$, a_{a_3} [76]. В последующие периоды ожоговой болезни степень энергетической обеспеченности продолжает снижаться, о чем свидетельствует уменьшение соотношения АТФ/АДФ, увеличение активности митохондриальных АТФаз [6, 22, 44], уменьшение энергетического заряда до 0,659 [66]. Уровень АТФ в мышцах остается сниженным с 8-го по 30-й день, тогда как уменьшение содержания АДФ и АМФ в этот период — менее выражено [61, 73]. Содержание АТФ в период шока уменьшается в миокарде на 3—11 %, в печени на 4—9 %, в почках на 4,5—14,5 % [27]; в период септикотоксемии — в миокарде на 14—17 %, в печени на 11—14 %, в почках на 11—13,2 %. Через 24 ч после ожога содержание АТФ в легких уменьшается, через 7 дней возвращается к норме и к 14-м суткам после травмы вновь падает [5].

Изучение интенсивности поглощения кислорода митохондриями печени мышей в начальный период после ожоговой травмы показало, что уже через 4 ч отмечается высокая скорость потребления кислорода во всех метаболических состояниях, увеличивается скорость фосфорилирования при окислении как янтарной, так и смеси яблочной и глутаминовой кислот [28]. Аналогичные данные были получены через 15, 30, 45 и 60 мин после ожога [76]. В работе [35] представлены сходные результаты, однако в этих экспериментах стимуляция дыхания не сопровождалась увеличением скорости потребления кислорода в метаболическом состоянии 3, что свидетельствует, по мнению авторов, о нарушении эффективности фосфорилирования в этот период. В противоположность этому в работе [67] показано, что тяжелая термическая травма приводит к гиперметаболизму, проявляющемуся в увеличении скорости потребления кислорода в состоянии 3, дыхательного контроля и коэффициента фосфорилирования. Как считают авторы, этот гиперметаболизм в ранний период ожоговой болезни связан с усилением утилизации высших ненасыщенных жирных кислот. Можно также предположить, что наблюдаемая активация работы дыхательной цепи, или «гиперэргизация», происходит при усилении так называемого ионного фосфорилирования, т. е. процесса синтеза АТФ за счет электрической или осмотической энергии при движении ионов через мембрану митохондрий по концентрационному градиенту. Подобное выравнивание концентрационных градиентов, сопровождающееся выделением значительных порций

энергий в виде АТФ, может играть большую роль в поддержании энергетического баланса при определенных патологических условиях [34].

Известно, что продолжающееся воздействие какого-либо патологического фактора со временем приводит к нарушению компенсаторных механизмов вследствие истощения метаболических ресурсов пораженного организма. Подтверждением этому служат данные об изменении функций митохондрий через 24 ч после ожога кожи у мышей, что проявляется прежде всего в уменьшении дыхательного контроля на 20 % при окислении янтарной кислоты и на 13 % при окислении смеси яблочной и глутаминовой кислот [28]. В последующие дни также отмечается уменьшение дыхательного контроля, однако достоверных изменений коэффициента АДФ/О не наблюдалось, что рассматривается как показатель активации обмена в организме после травмы [44]. Нарушение окислительных процессов в период шока и токсемии проявляется в уменьшении активности сукцинатдегидрогеназы, глутаматдегидрогеназы и цитохромоксидазы в миокарде, печени и почках [27, 28]. Была установлена тесная корреляция между падением уровня макроэргов и активностью этих ферментов, с одной стороны, и уменьшением количества сульфгидрильных групп белков митохондрий — с другой, на основании чего было сделано предположение, что первичным пусковым механизмом нарушения биоэнергетических процессов является уменьшение количества свободных тиоловых групп белков, что приводит к нарушению транспорта электронов в дыхательной цепи, разобщению окислительного фосфорилирования, уменьшению уровня АТФ и др. [27]. Хотя подобное объяснение логично, остается неясным: что же служит причиной снижения содержания SH-групп? На наш взгляд, уменьшение содержания SH-групп является лишь отражением активации патологических процессов, часть которых специфична для ожоговой болезни и заключается, например, в интенсивном образовании биологически активных сложных белков и пептидов, тогда как другие имеют общебиологическую природу. Так, нарушение функционального состояния митохондрий может приводить к уменьшению энергетического потенциала клетки, нарушению работы протонной АТФазы, Ca^{2+} -аккумулирующей способности митохондрий, что способствует накоплению ионов кальция в цитозоле и активации фосфолипазы A_2 с последующим гидролизом фосфолипидов мембран, увеличением содержания полиненасыщенных жирных кислот. Это в свою очередь стимулирует процесс ПОЛ, продуктами которого являются высокорекреационноспособные радикалы кислорода. Источником свободных радикалов могут быть также непосредственно митохондриальные электронотранспортные цепи и некоторые окислительные ферменты. Так, имеющий место при ожоговой болезни интенсивный гидролиз АТФ сопровождается усиленным образованием АДФ и АМФ, которые могут стимулировать последовательные стадии образования аденозина, инозина и ферментативного превращения гиоксантина в мочевую кислоту с образованием O_2^- и H_2O_2 . Генерация свободных радикалов возможна также после непосредственного теплового воздействия.

В настоящее время разрабатывается универ-

сальная теория патогенеза шока, основанная на главенствующей роли свободных радикалов, которые модифицируют действие физиологических медиаторов и определяют характер реакции тканей на раздражитель [65]. Свободные радикалы кислорода вызывают прямое повреждение ДНК, липидов, белков, способствуют образованию пероксидных радикалов и пероксидов. Активация процессов ПОЛ изменяет фосфолипидный состав и уменьшает содержание сульфгидрильных групп в мембранах, модифицируя липид-белковые взаимодействия и уменьшая текучесть мембран, что в свою очередь отражается на функциональной активности различных субклеточных структур, в том числе и митохондрий. Усиление свободнорадикального окисления (СРО) сопровождается увеличением потребления фагоцитами кислорода и переводом его в активные формы супероксида-ниона (O_2^-) или синглетного кислорода, которые могут инициировать нарушения микроциркуляции, сочетающиеся с переходом полинуклеарных клеток в маргинальный пул и склеиванием тромбоцитов, нарушением проницаемости капилляров и образованием отека [26, 52]. Усиленное образование O_2^- при термической травме может активировать неферментативное ПОЛ и стимулировать метаболические превращения арахидоновой кислоты до простаглицина, простаглицлинов, тромбоксанов и лейкотриенов, влияющих на просвет сосудов, адгезию и хемотаксис полиморфно-ядерных лейкоцитов, проницаемость сосудов [45]. Образование дериватов арахидоновой кислоты зависит от того, какие вещества стимулируют мембрану и на уровне каких клеток или тканей формируется воспалительная реакция. Так, при стимуляции тромбоцитов коллагеном образуются тромбоксаны, а при раздражении эндотелия тромбином — простаглицлин, имеющий противоположное действие.

О значительной роли СРО в патогенезе ожоговой болезни свидетельствуют работы [55, 74, 75], в которых показано, что в ранний период после тяжелой термической травмы наблюдается активация системы комплемента, приводящая в результате к появлению в плазме дериватов комплемента, анафилотоксина, стимулирующих образование окислительных радикалов нейтрофилами с последующим повреждением клеточных мембран, в частности эритроцитарных. Изучение морфологии легких при ожоговой болезни показало, что отмечающиеся интраальвеолярные кровоизлияния и лейкоагрегация в легочных капиллярах связаны не только с генерацией нейтрофилами O_2^- и гидроксильных радикалов, но и с усилением образования диеновых конъюгатов, концентрация которых в легких, коже и плазме бывает резко увеличена уже через 2 ч после ожога [75]. Дермэктомия обожженной кожи сразу после нанесения ожога приводила к уменьшению количества диеновых конъюгатов, что еще раз подчеркивает непосредственную связь между термическим поражением кожи, появлением активных радикалов кислорода и вторичным поражением легких. Применение в качестве лекарственных средств ингибиторов СРО (супероксиддисмутазы, каталазы) и ингибиторов метаболизма арахидоновой кислоты (ибупрофен, кетоканазол и др.) уменьшало образование воспалительного отека и потерю плазмы, стабилизировало мембраны, улучшало микроциркуляцию и

реологию крови [41, 48, 57], ускоряло эпителизацию ожоговой раны [64].

Клинико-экспериментальные исследования показали, что интенсивность реакций ПОЛ в сыроворотке крови больных с термической травмой (20—60 % поверхности тела) и обожженных крыс повышается в раннем периоде ожоговой болезни, вслед за чем следует ослабление этого процесса [58]. В других исследованиях [3] не отмечалось значительных изменений содержания липоперексидов в плазме крови больных в период ожогового шока, хотя облучение ультрафиолетовыми лучами мембран эритроцитов значительно усиливало ПОЛ у этих больных по сравнению со здоровыми. В период токсемии отмечалось усиление ПОЛ, которое коррелировало с тяжестью состояния больных и клиническими признаками интоксикации.

Исследование интенсивности ПОЛ в субклеточных органеллах печени при термическом ожоге [2] показало, что окисление липидов в микросомах наиболее интенсивно в первые часы после ожога, причем усиливаются реакции не только образования продуктов ПОЛ, но и их утилизации. Тот факт, что на 7-е сутки содержание продуктов ПОЛ в микросомах снижается, а в митохондриях, наоборот, увеличивается, объясняют результатом первоначальной активации ПОЛ в микросомах, что затем стимулирует ПОЛ и в других мембранных системах. Следствием такой индукции может быть усиление реакций ПОЛ в митохондриях, увеличение уровня продуктов ПОЛ, которое в более поздние стадии ожоговой болезни приводит к уменьшению способности липидов к окислению. Работы, проведенные в нашей лаборатории, подтвердили такую точку зрения [29], показав, что степень активации аскорбатзависимого ПОЛ по мере развития патологии понижается, т. е. способность липидов к окислению при индукции процесса *in vitro* понижается, хотя количество продуктов ПОЛ *in vivo* увеличивается. Отмечаемая динамика реакций ПОЛ может регулироваться уровнем полиненасыщенных жирных кислот (линолевой, арахидоновой) в фосфолипидах клеточных мембран, когда усиление окислительных реакций приводит к уменьшению содержания ненасыщенных жирных кислот и соответствующему падению интенсивности ПОЛ. Клинические наблюдения показали, что у больных с термической травмой наблюдается уменьшение уровня полиненасыщенных жирных кислот [56].

Активация процессов ПОЛ при ожоговой болезни может быть результатом не только усиленного образования кислородных радикалов, но и следствием нарушения функционирования ферментативных механизмов антирадикальной защиты клетки с участием супероксиддисмутазы, глутатионпероксидазы и каталазы [1, 24], уменьшения содержания церулоплазмينا [49]. Лечение больных с термической травмой антиоксидантами дает положительный эффект, так как при этом подавляется образование активных и токсичных радикалов кислорода с одновременным ингибированием процесса образования медиаторов воспаления.

Биосинтез внутриклеточных медиаторов — простаглицлинов, тромбоксанов, простаглицлина, лейкотриенов и липоксинов происходит при участии таких специализированных ферментативных систем, как циклооксигеназы, липоксигеназы, микро-

сомальные оксигеназы, и сопряжен с образованием липопероксидов. Большую роль в синтезе оксигенированных продуктов арахидоновой кислоты играет НАДФН-зависимая цитохром Р-450-монооксигеназная система [77], участвующая также в окислительной деградации гидрофобных соединений и биотрансформации ксенобиотиков. Таким образом, на уровне микросомального окисления тесно переплетаются процессы ПОЛ, реакции образования медиаторов воспаления, биотрансформации и детоксикации. Важным представляется анализ взаимоотношений этих процессов в норме и при развитии патологических состояний. Как уже отмечалось, при ожоговой болезни происходит усиление ПОЛ и соответствующее уменьшение полиненасыщенных жирных кислот, в том числе арахидоновой кислоты, являющейся основным субстратом ПОЛ в микросомах [63]. Понижение содержания арахидоновой кислоты в фосфолипидах приводит к увеличению гидрофильности микросомальных мембран, снижению содержания цитохрома Р-450 и последующему ослаблению реакций ПОЛ. Уже через 6 ч после тяжелой термической травмы наблюдается диффузное поражение эндоплазматической сети (вакуольная дегенерация, везикуляция), увеличение уровня восстановленного цитохрома Р-450 [72]. Термическая травма приводит к значительному подавлению монооксигеназной активности микросом печени, снижению содержания цитохрома Р-450 и цитохрома b_5 начиная с периода ожогового шока до 6 сут наблюдения [29, 30, 38].

В связи с этим возникает вопрос о возможном фармакологическом эффекте и фармакокинетике тех лекарств, метаболизм которых осуществляется преимущественно в микросомах печени, в условиях ожоговой болезни. Имеются единичные работы, посвященные этому вопросу; отсутствуют данные о коррекции нарушений лекарственного метаболизма у обожженных [51, 53, 54]. Исследования, проведенные в нашей лаборатории, показали, что термическая травма существенно подавляет микросомальную систему метаболизирования лекарств [31]. Это проявляется в удлинении снотворного действия хлоралгидрата и гексенала, нарушении фармакокинетики антипирина. Применение в качестве корректирующего средства фенобарбитала способствовало снижению интенсивности процессов ПОЛ, активации цитохром Р-450-зависимых монооксигеназных реакций и усилению процессов конъюгации с глюкуроновой кислотой у обожженных животных.

Важными факторами, регулирующими активность митохондриальной и микросомальной систем окисления, являются активность ПОЛ, а также уровень и соотношение окисленных и восстановленных форм ди- и трифосфопиридиннуклеотидов. Так, активация ПОЛ может приводить к деградации цитохрома Р-450 и его конверсии в цитохром Р-420 [70], инактивации мембранно-связанных ферментов вследствие окисления сульфгидрильных групп и нарушения их гидрофобного окружения, «сшивания» белков [60]. Реакции ПОЛ могут выступать в сочетании с реакциями протеолиза различных ферментов в качестве взаимосоиливающих процессов, обеспечивающих в совокупности высокую активность «разборки» энзи-

мов и соответствующее ингибирование их активности [32].

Взаимоотношения микросомальных и митохондриальных редокс-цепей строятся по типу конкурентных процессов в отношении кислорода; в случае возникновения тканевой гипоксии нарушение транспорта электронов в дыхательной цепи митохондрий может сопровождаться усилением монооксигеназных реакций, которые поставляют восстановительные эквиваленты в митохондрии путем трансмембранного транспорта [19]. Возможность такого процесса была показана в ранний период ожоговой болезни и проявлялась в усилении процессов окисления НАДН (в присутствии экзогенного цитохрома С) при инкубации с микросомами печени экспериментальных животных [29]. Важным метаболитом, функционально объединяющим эти системы окисления, является НАДФН — основной источник электронов для микросом, который может синтезироваться из НАДН при участии митохондриальных трансгидрогеназ. Как известно, при ожоговой болезни происходит гиперпродукция НАДФН, которая в значительной степени зависит от активности глюкозо-6-фосфатдегидрогеназы, содержания ацетил-КоА, интенсивности реакций декарбоксилирования пировиноградной кислоты. Несмотря на интенсивное образование НАДФН при ожоговой болезни наблюдается преобладание окисленных форм нуклеотида. Это может объясняться тем, что уже в ранний период после термической травмы активируется глюконеогенез и происходит компенсаторное усиление реакций биосинтеза жиров, использующих НАДФН. Уменьшение содержания НАДФН приводит к подавлению активности микросомального окисления и соответствующему нарушению реакций биотрансформации и детоксикации. В этом случае может происходить образование функциональных связей между митохондриями и микросомами за счет переноса восстановительных эквивалентов через митохондриальную мембрану в цитозоль и окисление их в редокс-системе микросом.

Представленные данные свидетельствуют не только о нарушении процессов микросомального, митохондриального и перекисного окисления при ожоговой болезни, но и характеризуют некоторые особенности их взаимодействия на уровне переноса и трансформации информационных сигналов в клеточных системах управления, основной задачей которых является сохранение автоматической регуляции с помощью отрицательной и положительной обратной связи. Примером таких взаимодействий могут быть реципрокные отношения микросомальных и митохондриальных электронотранспортных цепей в начальный период ожоговой болезни, регуляция по принципу отрицательной обратной связи интенсивности микросомального и митохондриального окисления продуктами ПОЛ, тесная взаимосвязь между генерацией свободнорадикальных форм кислорода, функциональной активностью цитохрома Р-450 и образованием медиаторов воспаления, оказывающих в свою очередь существенное влияние на кислородное обеспечение тканей.

Учет особенностей и взаимоотношений кислородзависимых процессов не только имеет значение для направленного поиска средств и методов кор-

рекции патохимических расстройств, но и позволяет оценить их функциональную роль в условиях нормальной жизнедеятельности клетки.

ЛИТЕРАТУРА

1. Агаджанов М. И. // Журн. экспер. и клин. мед.— 1979.— № 4.— С. 14—22.
2. Аристархова С. А., Бурлакова Е. Б., Заец Т. Л. // Вопр. мед. химии.— 1983.— № 4.— С. 102—106.
3. Бабская Ю. Е., Лавров В. А., Олюнина Н. А. // Хирургия.— 1985.— № 11.— С. 95—97.
4. Бернат И. Патогенез ожоговой анемии: Пер. с венг.— Будапешт, 1975.
5. Вазина И. Р. // Вопросы ожоговой патологии.— Горький, 1980.— С. 50—54.
6. Вальдман Б. М., Слободин В. Б., Ефименко Г. П. // Вопросы биохимии ожоговой травмы.— Челябинск, 1973.— С. 66—83.
7. Вогралик М. В., Голованова М. В. // Экспер. хир.— 1976.— № 5.— С. 20—23.
8. Волынский Ю. Д., Чернышева Л. М., Бабская Ю. Е., Матвеев П. В. // Вести. хир.— 1973.— № 4.— С. 106—110.
9. Герасимова Л. И., Юрасов И. И., Скобелина Г. С. // Апест. и реаниматол.— 1980.— № 2.— С. 64—66.
10. Горькова А. В., Рубин В. И. // Поволжская конф. физиологов, фармакологов и биохимиков с участием морфологов и клиницистов, 4-я: Материалы.— Саратов, 1966.— С. 166—168.
11. Григорьев И. Г., Вогралик М. В., Голованова М. В. // Сов. мед.— 1981.— № 4.— С. 56—61.
12. Гублер Е. В., Зимица Э. П. // Там же.— 1963.— № 7.— С. 56—61.
13. Дервиз Г. В. Газообмен при травматическом шоке: Автореф. дис. ... д-ра мед. наук.— М., 1950.
14. Довганский А. П. Об изменениях тканевого дыхания при тяжелых ожогах и их лечение в эксперименте: Автореф. дис. ... канд. мед. наук.— Л., 1962.
15. Заветная Г. Л., Иоффе Н. Е., Мазуркевич Г. С., Цибин Ю. П. // Травматический шок.— Л., 1977.— С. 13.
16. Заец Т. Л., Носова И. М. // Бюл. экспер. биол.— 1973.— № 10.— С. 56—58.
17. Кажекин А. А. Нарушение внешнего дыхания и бронхиальной проводимости при ожоговой болезни: Автореф. дис. ... канд. мед. наук.— Волгоград, 1977.
18. Кочетыгов Н. И., Булавин О. П. // Оксидобиотические и апоксибиотические процессы при экспериментальной и клинической патологии.— Киев, 1975.— С. 112—113.
19. Кривецкене Э. И., Ясайтис А. А. // Молекулярные механизмы и регуляция энергетического обмена.— Пуццино, 1986.— С. 12—13.
20. Лукьянова Л. Д., Балмуханов Б. С., Уголев А. Т. Кислород-зависимые процессы в клетке и ее функциональное состояние.— М., 1982.
21. Мовшев Б. Е., Недошивина Р. В. // Гематол. и трансфузиол.— 1986.— № 8.— С. 49.
22. Мороз А. М., Бик В. Г., Юрмин Е. А., Юнко М. А. // Пат. физиол.— 1984.— № 6.— С. 31—34.
23. Мурадян Р. И., Шуруев А. С. // Актуальные вопросы постреанимационного периода.— Саранск, 1982.— С. 26—27.
24. Мхитарян В. Г., Агаджанов М. И., Геворкян Д. М., Микаелян Э. М. // Вести. АМН СССР.— 1982.— № 9.— С. 15—19.
25. Орлов С. П. Расстройства гепатопортальной гемодинамики и кислородного режима печени при ожоговом шоке, пути и методы их коррекции: Автореф. дис. ... канд. мед. наук.— Харьков, 1978.
26. Петрович Ю. А., Гуткин Д. В. // Пат. физиол.— 1986.— № 5.— С. 85—92.
27. Розанов В. Е. // Воен.-мед. журн.— 1982.— № 4.— С. 66—67.
28. Рябинин В. Е., Лифшиц Р. И., Чарная Л. Ф. и др. // Вопр. мед. химии.— 1984.— № 3.— С. 113—116.
29. Рябинин В. Е., Лифшиц Р. И. // Там же.— 1985.— № 5.— С. 38—40.
30. Рябинин В. Е., Лифшиц Р. И. // Там же.— 1986.— № 3.— С. 115—118.
31. Рябинин В. Е., Коростелев М. Ю. // Современные средства первой помощи и методы лечения ожоговой болезни.— М., 1986.— С. 252—254.
32. Сербинова Е. А., Савов В. М., Казан В. Е. // Бюл. экспер. биол.— 1983.— № 6.— С. 53—55.
33. Семенов В. М., Киселев С. И. // Острая ожоговая токсемия.— Киев, 1976.— С. 22—24.
34. Скулачев В. П. Трансформация энергии в биомембранах.— М., 1972.
35. Слепнева Л. В., Ремизова М. И., Кочетыгов Н. И. // Пат. физиол.— 1984.— № 1.— С. 32—35.
36. Сологуб В. К., Винокурова И. Ю., Каем Р. И. // Хирургия.— 1977.— № 6.— С. 41—43.
37. Федорова Э. П. // Научная конф. по проблеме «Ожоги», 4-я: Материалы.— Л., 1965.— С. 258.
38. Хакимов Э. Э., Мавлянов И. Р., Карабанович А. К. // Вопр. мед. химии.— 1987.— № 2.— С. 48—51.
39. Чернышева Л. М. Изменение дыхания и газообмена при ожоговой болезни: Автореф. дис. ... канд. мед. наук.— М., 1975.
40. Шепотько А. И. Некоторые особенности патофизиологических изменений при ожоговой болезни: Автореф. дис. ... канд. мед. наук.— Ереван, 1975.
41. Alexander F., Mathieson M., Teon H. T. et al. // J. Trauma.— 1984.— Vol. 24, N 8.— P. 709—712.
42. Louyats H., Izawa V., Ozawa T. // Burns.— 1980.— Vol. 7, N 1.— P. 33—37.
43. Louyats H., Suzuki K., Izawa V. // Ibid.— 1982.— Vol. 9, N 1.— P. 13—16.
44. Aprille J. R., Hom J. A., Rulfs J. // J. Trauma.— 1977.— Vol. 17, N 4.— P. 279—288.
45. Arturson G. // Verbrennungs: Entstehung, Verlauf and Ther.— Berlin.— 1982.— S. 16—29.
46. Aulick L. H., Hander E. H., Wilmore D. W. et al. // J. Trauma.— 1979.— Vol. 19, N 8.— P. 559—566.
47. Bansillon V., Henane R. // Med. et Armees.— 1976.— Vol. 4, N 1.— P. 90—92.
48. Balstone G. F., Levick P. L., Spurr E. et al. // Burns.— 1983.— Vol. 9, N 4.— P. 234—239.
49. Boosalis M. G., McClain C. J. // Amer. J. clin. Nutr.— 1986.— Vol. 44, N 6.— P. 899—906.
50. Dolecek R., Mahaffey W. // Acta chir. plast.— 1970.— Vol. 12.— P. 217—222.
51. Durlotsky L., Fruncillo R. J. // J. Trauma.— 1982.— Vol. 22, N 11.— P. 950—953.
52. Emerit J., Gall J. // Cah. Nutr. Diet.— 1987.— Vol. 22, N 1.— P. 35—39.
53. Fruncillo R. J., Digregorio G. J. // J. Trauma.— 1983.— Vol. 23, N 6.— P. 523—529.
54. Fruncillo R. J., Digregorio G. J. // J. pharm. Sci.— 1984.— Vol. 13, N 8.— P. 1117—1121.
55. Hatherill J. R., Till G. D., Brunner L. H., Ward P. A. // J. clin. Invest.— 1986.— Vol. 78, N 3.— P. 629—636.
56. Helmkamp G. M., Wilmore D. W., Johnson A. A. et al. // Amer. J. clin. Nutr.— 1973.— Vol. 26.— P. 1331.
57. Hilton J. G. // Fed. Proc.— 1979.— Vol. 38, N 3.— P. 758.
58. Hiramatsy M., Izawa V., Hagihara M. et al. // Burns.— 1984.— Vol. 11, N 2.— P. 111—116.
59. Henane R. // Med. et Armees.— 1978.— Vol. 6, N 4.— P. 295—302.
60. Hogberg J., Bergstrand A., Jakobson S. // Europ. J. Biochem.— 1973.— Vol. 37, N 1.— P. 51—59.
61. Larsson G., Schiedt B., Liliedahl O., Vinnars E. // Acta chir. scand.— 1984.— Vol. 150, N 8.— P. 611—618.
62. Liliedahl S. O. // Langenbeck's Arch. Chir.— 1978.— Bd 347.— S. 517—523.
63. Lokesh B. R., Mathur S. W., Spector A. A. // J. Lipid. Res.— 1981.— Vol. 22, N 6.— P. 905—915.
64. Melikian V., Laverson S., Zawacki B. // J. Trauma.— 1987.— Vol. 27, N 2.— P. 151—154.
65. Novelli G. P. // Acta anaesth. ital.— 1984.— Vol. 35, N 1.— P. 29—54.
66. Ogawa V., Matsumoto K., Oltji Sh. // J. Lab. clin. Med.— 1977.— Vol. 90, N 3.— P. 457—465.
67. Pruitt B., Goodwin C., Vanghan J. et al. // Acta chir. scand.— 1985.— Suppl. 522.— P. 119—139.
68. Rosental S. R., Hawley P. L. // Surgery.— 1972.— Vol. 11, N 4.— P. 527—536.
69. Sancher R., Chollet J., Cledes M. et al. // Bordeaux med.— 1979.— Vol. 12, N 25.— P. 1565—1569.
70. Scheller J. B., Renneberg R., Mochr P. et al. // FEBS. Lett.— 1976.— Vol. 71, N 2.— P. 309—312.
71. Scholmerich J., Kremer B., Schmidt K. et al. // Langenbeck's Arch. Chir.— 1980.— Bd 350.— S. 151—163.
72. Seccia A., Ribert C., De Gennaro M., Flamini G. // Burns.— 1980.— Vol. 6, N 3.— P. 174—180.
73. Shires T., Albert S. A., Illner H. // J. Trauma.— 1983.— Vol. 23, N 10.— P. 899—901.
74. Till G. O., Beauchamp C., Menapace D. et al. // Ibid.—

75. Till G. O., Hatherill J. R., Tourtellotte W. W. et al. // Amer. J. Path.— 1985.— Vol. 119.— P. 376—384.
 76. Xuemin W., Keming C., Ying W. // Burns.— 1986.— Vol. 12, N 7.— P. 461—464.
 77. Ullerich V., Graf H., Hanrend M. // Microsomes and Drug Oxidations.— Brighton, 1985.— P. 95—104.

Поступила 31.10.89

© Е. М. БАСКАЕВА, 1990

УДК 616-008.9-055.5/7-076.5:575.222.75

Е. М. Баскаева

ГЕНЕТИЧЕСКАЯ КОМПЛЕМЕНТАЦИЯ В ИЗУЧЕНИИ МЕХАНИЗМОВ РАЗВИТИЯ НАСЛЕДСТВЕННЫХ НАРУШЕНИЙ ОБМЕНА ВЕЩЕСТВ У ЧЕЛОВЕКА (ОБЗОР)

Институт биологической и медицинской химии АМН СССР, Москва

В последние два десятилетия широкое применение в различных областях биологии и медицины находит метод генетической комплементации (МГК), основанный на гибридизации соматических клеток. О все большем распространении этого метода свидетельствует стремительно увеличивающееся количество работ, посвященных исследованиям с применением гибридизации клеток. Основными направлениями, в которых используются МГК, являются картирование генов в индивидуальных хромосомах, изучение природы злокачественности и трансформации клеток под влиянием онкогенных вирусов, исследование механизмов, контролирующих рост и дифференцировку клеток в процессе нормального развития зародышей, при заживлении ран и опухолеобразовании [6]. Кроме того, МГК применяется при изучении природы и типа наследования многих врожденных заболеваний человека, механизмов их развития и диагностики.

В настоящем обзоре сделана попытка обобщить данные литературы, касающиеся такой важной для медицинской науки области применения МГК, как его использование для выяснения генетической гетерогенности наследственных энзимопатий и их диагностики на цитобиохимическом уровне.

Некоторые сведения о гибридизации соматических клеток. Впервые возможность гибридизации клеток была обнаружена в 1960 г. Дж. Барским и его сотрудниками, которые показали, что клетки двух разных линий мышей при культивировании могут спонтанно сливаться с образованием гибридов, содержащих геномы исходных родительских клеток [7]. Доказательство существования в гибридных клетках активных родительских геномов было получено при слиянии двух линий мышинных клеток, содержащих различные типы β -глюкуронидазы. В полученных при спонтанном слиянии гибридных клетках были выявлены обе формы β -глюкуронидазы — термостабильная и термолабильная [23]. Эти эксперименты доказали наличие в гибридных клетках генетической комплементации, т. е. одновременного синтеза двух ферментов, каждый из которых мог синтезироваться только в одной из родительских клеток.

Позднее были разработаны и усовершенствованы

методы получения гибридных клеток с использованием стимуляторов клеточного слияния, включающих различные типы вирусов, полиэтиленгликоль, электрическое поле, лазеры и т. д. [56]. Из многочисленных данных литературы, посвященной проблеме клеточного слияния, известно, что гибридизации могут подвергаться разного рода клетки животных, включающие фибробласты, эритроциты, моноциты, лимфоциты, гепатоциты, клетки амниотической жидкости, макрофаги и миобласты [15, 27, 34, 36, 48]. Надо отметить, что механизм клеточного слияния представляет собой довольно сложный процесс, состоящий из последовательности событий, основным из которых является взаимодействие липидных бислоев мембран. Поскольку вопросы слияния биомембран достаточно полно отражены в литературе, нецелесообразно подробно останавливаться на описании механизмов клеточного слияния в настоящем обзоре. В то же время хотелось бы отметить, что большинство стадий при слиянии клеточных мембран *in vivo*, как принято, инициируется увеличением внутриклеточной концентрации многофункциональных ионов кальция. Некоторые типы стимуляторов клеточного слияния, используемые в опытах по гибридизации клеток, в частности полиэтиленгликоль, способствуют увеличению проницаемости мембран для ионов кальция благодаря взаимодействию с фосфолипидами мембран. При слиянии биомембран клеток, обработанных вирусами, а именно вирусом Сендай, отмечается важная роль подвижности и латеральной диффузии внутримембранных частиц и интегральных белков.

В зависимости от условий слияния клеток (соотношения числа родительских клеток, концентрации и типа стимуляторов клеточного слияния и др.) могут образовываться гетерокарионы — многоядерные клетки, содержащие ядра исходных родительских клеток и (или) гибридные клетки, в которых разные геномы исходных клеток объединяются в одном ядре. Гибридные клетки можно выделить и поддерживать в виде чистой культуры, тогда как гетерокарионы нежизнеспособны и обмен веществ в них происходит в течение лишь 15 дней [6]. Следует отметить, что, кроме гетерокарионов, в процессе слияния клеток образуются и гомокарионы (слившиеся клетки одного родительского типа). Поскольку комплементация может происходить только в гетерокарионах, ее степень должна зависеть от количества образовавшихся гетерокарионов, которое может достигать 70—90 % от общего числа клеток [21]. В настоящее время известны методы, позволяющие повысить количество многоядерных клеток в культуре [16]. Так, использование метода седиментации в градиенте фиколла приводит к увеличению содержания гетерокарионов в популяции более чем в 2 раза.

Разработка условий гибридизации клеток и их клонирования открыла широкие возможности для использования МГК в генетическом анализе человека, в изучении молекулярных механизмов развития многих наследственных нарушений обмена у человека, их пре- и постнатальной диагностики, а также дифференциальной диагностики ряда наследственных энзимопатий на цитобиохимическом уровне.

Принцип использования МГК для дифферен-

циальной диагностики наследственных заболеваний. Как правило, МГК используется для дифференциальной диагностики наследственных энзимопатий, обусловленных недостаточностью одного и того же фермента, причины которой могут быть самыми разнообразными (нарушение синтеза полипептидной цепи, недостаточность активаторов, кофакторов, изменение стабильности фермента и т. д.) [17]. Сущность МГК применительно к этому случаю заключается в следующем. Фибробласты обследуемого больного с неидентифицированным заболеванием подвергают гибридизации с фибробластами больных с известной болезнью, вызванной недостаточностью того же фермента («маркерными» клетками), и в полученных гетерокарионах определяют активность фермента, недостающего в исходных клетках. Обнаружение в гетерокарионах активности исследуемого фермента или некоторых его форм свидетельствует о наличии генетической комплементации, которая возможна лишь в том случае, если недостаточность фермента или его форм в исследуемых и «маркерных» клетках обусловлена мутациями разных генов. Заболевания, развивающиеся при недостаточности одного и того же фермента, обусловленной разными, не аллельными мутациями, принято считать комплементационными.

Классическим примером комплементационных болезней являются болезни Тея — Сакса и Зандгоффа, относящиеся к группе G_{M2} -ганглиозидозов, обусловленных недостаточностью гексозаминидазы. Известно, что болезнь Тея — Сакса развивается при недостаточности гексозаминидазы А (α, β -гетерополимера) в результате мутации гена в 15-й хромосоме, кодирующего образование α -субъединицы [10]. Болезнь Зандгоффа характеризуется недостаточностью как гексозаминидазы А, так и гексозаминидазы В (β, β -гомополимера), вызванной генной мутацией в 5-й хромосоме, ответственной за синтез β -субъединицы гексозаминидазы [51]. Как видно из приведенной на рисунке

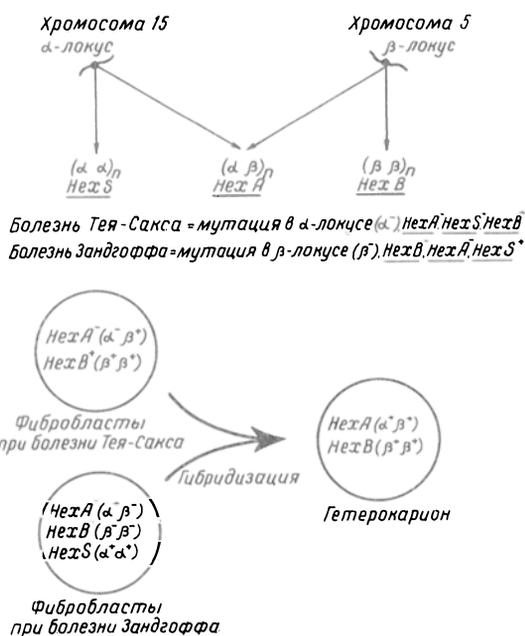


Схема генетического контроля различных типов гексозаминидаз в норме и при некоторых типах G_{M2} -ганглиозидозов.

схемы, в результате гибридизации фибробластов, полученных от людей с болезнями Тея — Сакса и Зандгоффа, образуются гетерокарионы, в которых должна происходить генетическая комплементация, т. е. образование полноценных форм гексозаминидазы А и В из активных α - и β -субъединиц, кодируемых геномами исходных клеток. Экспериментальное доказательство этого было получено ранее двумя группами исследователей, показавших наличие комплементации после слияния фибробластов лиц с болезнями Тея — Сакса и Зандгоффа [19, 59].

Отсутствие комплементации, а следовательно, и отсутствие восстановления активности ферментов в гетерокарионах свидетельствуют, что недостаточность фермента в исследуемых и «маркерных» клетках обусловлена мутациями одного и того же гена или его разных аллелей. Заболевания, развивающиеся при недостаточности одного и того же фермента, обусловленной аллельными мутациями, принято называть некомплементационными. Примерами таких заболеваний являются разные формы болезни Гоше, мукополисахаридозов и ряда других лизосомных болезней накопления [21].

Из огромного количества литературы, посвященной проблеме наследственных энзимопатий, известно, что большинство этих заболеваний проявляется в разных формах с той или иной степенью тяжести [2, 3, 21, 63]. Подобное разнообразие клинических проявлений одной и той же болезни, возникающее вследствие генетической гетерогенности, значительно осложняет диагностику. МГК является одним из методических подходов к изучению генетической гетерогенности наследственных энзимопатий.

Использование МГК для изучения генетической гетерогенности наследственных нарушений обмена. МГК был использован различными исследователями для изучения генетической гетерогенности наследственных заболеваний, относящихся к разнообразным группам гликолипидозов [26, 55], муколипидозов [8, 25, 28, 29, 53], мукополисахаридозов [18], аминокислотурии [61, 62], а также таких болезней, как пигментная ксеродерма [52], хронический гранулематоз [27, 50], атаксия-телангиэктазия [32] и др.

Так, использование комплементационного анализа для изучения генетической природы гетерогенности болезни Гоше, развивающейся при недостаточности кислой β -глюкозидазы, показало, что детская и взрослая формы болезни Гоше, значительно различающиеся по клиническому фенотипу, а также по кинетике, антигенной специфичности и процессингу дефектного фермента [11, 12, 24], обусловлены аллельными мутациями одного и того же гена [26]. В этом случае не наблюдалось восстановления активности β -глюкозидазы в слившихся клетках, полученных от больных с разными формами заболевания.

С помощью гибридизации соматических клеток выяснено, что такие формы мукополисахаридоза типа I, обусловленного дефицитом α -L-идуронидазы, как синдром Гурлер и синдром Шайе, различающиеся по степени фенотипических проявлений, являются результатом различных аллельных мутаций, а больные с синдромом Гурлер и Шайе являются генетическими компаундами вследствие их «двойной» гетерозиготности [5, 18, 38].

Таблица 1

Гибридизация фибробластов больных с разными клиническими формами некомплементационных наследственных энзимопатий

Тип слияния	Ферментативная недостаточность	Источник
Детская и взрослая формы болезни Гоше	β -Глюкозидаза	[26]
Синдромы Гурлер и Шайе	α -L-идуридаза	[18]
Псевдо-Гурлер-полидистрофия и I-клеточная болезнь	N-ацетилглюкозамин-фосфотрансфераза	[25]
Варианты В и В ₁ детской формы G _{M2} -ганглиозидоза	Гексозаминидаза	[55]
Болезни Нимана—Пика типа А и типа В	Сфингомиелиназа	[9]
Детская и взрослая формы G _{M1} -ганглиозидоза	β -Галактозидаза	[21]
G _{M1} -ганглиозидоз и болезнь Моркио В	β -Галактозидаза	[44]
Детская и взрослая формы сиалидоза	Нейраминидаза	[42]
Детская и взрослая формы галактосиалидоза	β -Галактозидаза/нейраминидаза	[42]
Варианты метакроматической лейкодистрофии	Арилсульфатаза А	[21]
Варианты болезни Краббе	Галактоцереброзидаза	[35]
Легкая и тяжелая формы болезни Санфилиппо В	α -N-ацетилглюкозаминидаза	[21]
Детская и взрослая формы гликогеноза типа II	Кислая α -глюкозидаза	[49]
Недостаточности пропионил-КоА-карбоксилазы	Пропионилкарбоксилаза	[62]
Недостаточности аргининосукцинатазы	Аргининосукцинатаза	[37]

МГК позволил также показать, что аллельные мутации одного и того же гена, кодирующего образование α -субъединицы гексозаминидазы, приводят к двум вариантам В и В₁ детской формы G_{M2}-ганглиозидоза [55].

При использовании МГК установлено, что гетерогенность ряда других лизосомных болезней накопления и заболеваний, связанных с недостаточностью пропионил-КоА-карбоксилазы [62] и аргининосукцинатазы [37], также обусловлена межаллельными мутациями одного и того же гена (табл. 1).

Таким образом, приведенные примеры свидетельствуют о существовании некомплементационных заболеваний, генетическая и фенотипическая гетерогенность которых объясняется мутациями множественных аллелей одного генетического локуса.

При изучении гетерогенности наследственных энзимопатий с помощью гибридизации соматических клеток удалось выяснить, что различное клиническое проявление болезни и разные ее формы могут быть обусловлены не только межаллельными мутациями одного и того же генетического локуса, но и мутациями разных структурных генов, кодирующих образование различных субъединиц ферментов, а также других генов, контролирующих многие процессы, участвующие в реализации одной ферментной реакции. Проведение гибридизации соматических клеток больных в таких случаях, как уже отмечалось, приводит к восстановлению недостающей ферментативной активности, реконструкции фермента благодаря объединенному функционированию в гетерокарионе разных генов, т. е. их комплементации.

Наряду с приведенным примером существова-

ния двух вариантов G_{M2}-ганглиозидоза (болезней Тея — Сакса и Зандгоффа), обусловленных мутациями двух разных структурных генов и приводящих к недостаточности одного фермента, показано, что клиническая и биохимическая гетерогенность нарушения обмена кобаламина, вызванного недостаточностью метилмалонил-КоА-мутаза, обусловлена разными мутациями по крайней мере четырех генетических локусов, ответственных за образование апофермента мутаза, синтез коферментов и другие процессы [61]. Среди случаев недостаточности метилмалонил-КоА-мутаза выявлено 5 комплементационных групп, происхождение одной из которых объясняется плейотропным эффектом нескольких мутантных генов [61].

Среди лизосомных болезней накопления известны два типа муколипидозов — тип II (I-клеточная болезнь) и тип III (псевдо-Гурлер-полидистрофия), представляющие собой нейрометаболические нарушения, связанные с дефектом биосинтеза кислых гидролаз и их доставки в лизосомы [45]. Первичным дефектом при обоих типах муколипидоза является, как уже теперь ясно, недостаточность N-ацетилглюкозаминфосфотрансферазы (GlcNAcP-трансферазы), приводящая к нарушению синтеза маннозо-6-фосфатных маркеров в процессинге лизосомных ферментов [4]. При использовании метода клеточной гибридизации показано существование трех комплементационных групп (А, В и С) среди муколипидоза III [28, 40]. На основании результатов определения активности и электрофоретической подвижности 5 лизосомных ферментов после слияния фибробластов от больных с разной формой проявления псевдо-Гурлер-полидистрофии в разных парных сочетаниях установлено, что гетерогенность этого заболевания является результатом мутаций разных генов, приводящих к дефектам процессинга лизосомных ферментов [28]. С помощью МГК установлено, что муколипидоз II и так называемый «классический» вариант муколипидоза III (III А), характеризующиеся разными клиническими проявлениями, обусловлены мутациями разных аллелей одного генетического локуса и составляют одну комплементационную группу [40]. При изучении кинетических свойств остаточной GlcNAcP-трансферазы у больных этой группы, включающей I-клеточную болезнь и классический вариант псевдо-Гурлер-полидистрофии, были получены данные, что причиной этой группы заболеваний является мутация, вероятнее всего, структурного гена [41].

Позднее другими авторами, изучавшими гетерогенность муколипидозов II и III, были выявлены только 2 комплементационные группы [8]. Больные, относящиеся к I-й группе, включающей классические формы муколипидоза II и III и соответствующей, по-видимому, описанной выше группе III А, характеризовались полной или частичной недостаточностью GlcNAcP-трансферазы при использовании как природных, так и синтетических субстратов. У больных 2-й группы, включающей варианты псевдо-Гурлер-полидистрофии, наблюдалась недостаточность GlcNAcP-трансферазы по отношению только к природным лизосомным ферментам в качестве акцепторов фосфатных групп. По мнению авторов проведенного исследования, GlcNAcP-трансфераза состоит из 2 различных

Таблица 2

Гибридизация фибробластов больных с наследственными комплементационными энзимопатиями

Тип слияния	Восстановление активности фермента	Источник
Болезни Тей — Сакса и Зандгоффа	Гексозаминидаза	[1, 19, 59]
Галактосиалидоз, G_{M1} -ганглиозидоз и I-клеточная болезнь	β -Галактозидаза	[46]
Галактосиалидоз, сиалидоз и I-клеточная болезнь	Нейраминидаза	[29, 60]
Метахроматическая лейкодистрофия и множественная сульфатазная недостаточность	Арилсульфатаза А	[13]
Болезни Нимапа — Пика типов А, В и С	Сфингомиелиназа	[21]
Болезнь Санфилиппо А и множественная сульфатазная недостаточность	Гепарансульфатсульфаминогидролаза	[30]
Синдром Гунтера и множественная сульфатазная недостаточность	Сульфондуронид-сульфатаза	[30]
Варианты нарушения обмена кобаламина	Метилмалонил-КоА-мутаза	[61]
Классическая псевдо-Гурлер-полидистрофия и ее варианты	N-ацетилглюкозамин-фосфотрансфераза	[8]

субъединиц — каталитической, которая отсутствует или дефектна у больных I-й группы, и так называемой субъединицы узнавания, ответственной за специфичность фермента — трансферазы только к лизосомным ферментам и дефектной у больных 2-й группы. На основании данных комплементационного анализа предполагается, что 2 субъединицы кодируются 2 разными генами, а мутации, вызывающие I-клеточную болезнь и классическую псевдо-Гурлер-полидистрофию, являются аллельными [8].

Таким образом, приведенные примеры указывают на существование комплементационных наследственных заболеваний, гетерогенность которых может быть обусловлена мутациями разных структурных генов в случае недостаточности субъединичных ферментов, а также мутациями генов, участвующих в пострибосомной модификации того или иного фермента (табл. 2).

Применение МГК при изучении механизмов развития ряда наследственных нарушений обмена веществ у человека. Одним из аспектов применения МГК является его использование при выяснении генетических причин недостаточности одного и того же фермента при разных наследственных заболеваниях. Так, известно, что недостаточность нейраминидазы наблюдается при сиалидозе (отсутствие только нейраминидазной активности), при муколипидозе II (недостаточность нейраминидазы и ряда других лизосомных гидролаз) и при галактосиалидозе (одновременная недостаточность нейраминидазы и β -галактозидазы) [29, 60]. С помощью МГК показано, что эти 3 заболевания являются комплементационными, т. е. обусловлены мутациями разных генов, ответственных за синтез и пострибосомные модификации молекулы нейраминидазы [39, 58]. Аналогично приведенному примеру недостаточность β -галактозидазы свойственна также 3 заболеваниям: G_{M1} -ганглиозидозу, муколипидозу II и галактосиалидозу, которые, как показало использование

МГК, также комплементационны между собой [46]. Восстановление активности β -галактозидазы при слиянии фибробластов больных с 3 указанными заболеваниями в разных парных сочетаниях свидетельствует, что эти болезни обусловлены мутациями генов, ответственных за разные стадии процесса образования нормально функционирующей молекулы β -галактозидазы. Совсем недавно группой исследователей, изучавших свойства очищенной β -галактозидазы из печени больных с G_{M1} -ганглиозидозом, были получены данные о наличии структурных изменений в молекуле фермента, что свидетельствовало о мутации структурного гена β -галактозидазы ири G_{M1} -ганглиозидозе [43].

В то же время интересен тот факт, что такие разные по клинике заболевания, как детская и взрослая формы G_{M1} -ганглиозидоза, относящиеся к группе гликолипидозов, и болезнь Моркио В, представляющая группу мукополисахаридов, принадлежит к одной комплементационной группе [44]. Предполагается, что причиной этих заболеваний, вызванных недостаточностью кислой β -галактозидазы, являются аллельные мутации структурного гена этого фермента [44].

Что касается галактосиалидоза, характеризующегося одновременной недостаточностью активности β -галактозидазы и сиалидазы, то в последние годы стало известно, что это заболевание является результатом мутации гена, ответственного за посттрансляционную модификацию нейраминидазы и β -галактозидазы [42, 39, 22]. Однако в этом случае наблюдаемый дефект пострибосомной модификации отличается от нарушения процесса фосфорилирования лизосомных гидролаз в ходе созревания их молекул, характерного для рассмотренных выше муколипидозов II и III. В ходе многочисленных исследований получены данные, что комбинированная недостаточность β -галактозидазы и нейраминидазы при галактосиалидозе обусловлена дефектом гена, кодирующего образование стабилизирующего белка с молекулярной массой 32 000. Функции этого белка заключаются в препятствовании внутриллизосомной протеолитической деградации мономеров β -галактозидазы, активации нейраминидазы и в образовании комплекса нейраминидазы с мультимером β -галактозидазы [47, 57]. В настоящее время установлено, что гены, кодирующие образование стабилизирующего белка и β -галактозидазы, локализованы соответственно в 22-й и 3-й хромосомах [54, 60], а гены нейраминидазы локализованы в 20-й хромосоме [39]. Эти сведения в свою очередь являются подтверждением результатов проводимых ранее комплементационных анализов, свидетельствующих, что заболевания, связанные с недостаточностью β -галактозидазы и (или) нейраминидазы, вызываются мутациями 3 разных генов.

Применение гибридизации фибробластов позволило установить, что генетический дефект при множественной сульфатазной недостаточности отличается от дефектов, вызывающих недостаточность сульфатаз при болезни Санфилиппо А и болезни Гунтера [30]. Автором этого исследования было предположено, что генетический дефект при множественной сульфатазной недостаточности затрагивает либо регуляторный процесс при фосфорилировании молекул сульфатаз, либо постри-

босомный процессинг этих ферментов и, таким образом, отличается от дефектов структурных генов сульфатаз, вызывающих мукополисахаридоз типа III (болезнь Санфилиппо А) и болезнь Гунтера, обусловленные недостаточностью соответственно гепарансульфатсульфамидазы и α -L-идуроосульфатазы.

Следующий аспект применения МГК заключается в том, что этот метод используется для выяснения генетической природы заболевания, характеризующегося одинаковым клиническим проявлением, но разными биохимическими показателями у разных индивидов. Так, известны случаи наличия у человека всех признаков метахроматической лейкодистрофии при нормальном уровне активности арилсульфатазы А с использованием синтетических субстратов. При гибридизации фибробластов таких индивидов с фибробластами больных с идентифицированной метахроматической лейкодистрофией наблюдается коррекция арилсульфатазы А [33]. Оказалось, что в отмеченном случае имеется дефект не структурного гена сульфатазы, а гена, ответственного за синтез белкового активатора цереброзидсульфатазы.

Аналогично этому случаю можно привести другой пример наличия у человека фенотипических признаков заболевания при нормальном уровне ферментативной активности. Несколько лет назад был описан так называемый АВ-вариант G_{M2} -ганглиозидоза, при котором сохраняется активность обеих форм гексозаминидазы, однако наблюдается накопление G_{M2} -ганглиозида в результате отсутствия белкового активатора для действия гексозаминидазы А на природный субстрат [14]. Опыты по гибридизации фибробластов больных с вариантами В (болезнь Тея — Сакса), В₁ и О (болезнь Зандгоффа) G_{M2} -ганглиозидозов подтвердили различную природу этих заболеваний, обусловленную мутациями разных генов, ответственных за синтез α -субъединицы гексозаминидазы А, каталитическую активность гексозаминидазы А и синтез β -субъединицы [55]. Интересно, что описан еще один вариант G_{M2} -ганглиозидоза, обозначенный вариантом А^{МВ}, при котором сохраняется каталитическая активность обеих форм гексозаминидазы по синтетическим субстратам, имеется белковый активатор, который, однако, не способен связываться с молекулой гексозаминидазы А из-за дефекта ее связывающего активатор центра [31]. Можно, по-видимому, полагать, что А^{МВ}-вариант G_{M2} -ганглиозидоза обусловлена мутацией еще одного гена.

Использование МГК для подтверждения диагноза G_{M2} -ганглиозидозов и изучения реконструкции ферментов в гетерокарионах. Нами был использован МГК для подтверждения биохимического диагноза болезней Тея — Сакса и Зандгоффа, поставленного ранее на основании определения активности гексозаминидазы в фибробластах и лейкоцитах и данных электрофоретического анализа, а также для изучения процессов реконструкции изоферментов гексозаминидазы, недостаточность которой приводит к этим заболеваниям [1].

Результатом гибридизации фибробластов от больных с болезнями Тея — Сакса и Зандгоффа, как уже отмечалось, является образование гетерокарионов, в которых происходит генетическая ком-

плементация, приводящая к реконструкции полноценных форм гексозаминидазы А и В из активных α - и β -субъединиц, кодируемых геномами исходных клеток. При этом образование гексозаминидазы А и В в гетерокарионах в определенной степени зависело от длительности их культивирования. Так, обе формы гексозаминидазы обнаруживались в гетерокарионах по данным изоэлектрофокусирования уже через сутки после слияния клеток, однако их количество было незначительным. Содержание форм гексозаминидазы возрастало по мере культивирования клеток и достигало максимума через 5—7 дней после слияния. При этом соотношение изоформ гексозаминидазы А и В оставалось примерно более или менее постоянным по данным изоэлектрофокусирования. Об этом свидетельствуют также данные, полученные и в одной из многих работ по генетической комплементации фибробластов людей с болезнями Тея — Сакса и Зандгоффа [20]. Причины этого факта пока не выяснены. Можно предполагать, что для эффективного функционирования геномов в гетерокарионах необходим какой-то период времени, после которого содержание реконструированных форм фермента становится постоянным. Кроме того, не исключено, что ассоциация α - и β -субъединиц в нормальных фибробластах и в гибридных клетках может происходить с разной эффективностью. Можно предположить также, что α - и β -субъединицы, имеющиеся соответственно в исходных фибробластах детей с болезнями Тея — Сакса и Зандгоффа, вообще не способны к взаимодействию между собой в слившихся клетках, а реконструирование форм гексозаминидазы является результатом комбинированного функционирования геномов в гетерокарионах. Таким образом, опыты по гибридизации фибробластов подтверждают основные выводы о механизмах развития G_{M2} -ганглиозидозов и могут быть использованы для дальнейшего изучения их гетерогенности. Как видно, МГК может иметь большое значение для изучения процессов реконструкции ферментов во времени, исследования атипичных форм ферментов за счет различных комбинаций в сборке субъединиц, а также других малоизученных вопросов функционирования в клетке ферментов, состоящих из субъединиц, кодируемых различными генетическими локусами.

Изложенное позволяет заключить, что расшифровка специфических генетических дефектов, приводящих к той или иной форме наследственной болезни, имеет важное значение для успешного проведения пре- и постнатальной диагностики этих заболеваний, которые в настоящее время являются одной из причин детской смертности. Из приведенных в обзоре данных видно, что гибридизация соматических клеток довольно широко использовалась в течение ряда лет при выяснении природы гетерогенности и механизмов развития многих наследственных болезней человека, связанных с нарушением обмена веществ и, в частности, лизосомных болезней накопления. Несмотря на внедрение в последние годы в лабораторную практику новейших генно-инженерных методов анализа, способствующих более точному установлению генетических дефектов, лежащих в основе наследственных энзимопатий, их клинической и биохимической гетерогенности, МГК остается в

числе современных методов и является одним из подходов к изучению механизмов развития, наследования и гетерогенности многих наследственных нарушений обмена веществ у человека, а также изучения реконструкции и функционирования в клетке субъединичных ферментов.

ЛИТЕРАТУРА

1. Бейер Е. М., Видершайн Г. Я., Венерт М. // Бюл. экспер. биол.—1984.— № 1.— С. 83—86.
2. Видершайн Г. Я. Биохимические основы гликозидов.— М., 1980.
3. Видершайн Г. Я. // Вестн. АМН СССР.—1986.— № 10.— С. 81—88.
4. Видершайн Г. Я. // Вопр. мед. химии.—1987.— № 5.— С. 20—24.
5. Кобринский Б. А. // Там же.—1982.— № 3.— С. 55—57.
6. Рингерц Н., Сэвидж Р. Гибридные клетки: Пер. с англ.— М., 1979.
7. Barski G., Sorieul S., Cornefert F. // C. R. Acad. Sci. (Paris).—1960.— Vol. 251.— P. 1825—1827.
8. Ben-Yoseph J., Pack B. A., Mitchell D. A. et al. // Enzyme.—1986.— Vol. 35.— P. 106—116.
9. Besley G. T. N., Hoogboom A. J. M., Hoogveen A. et al. // Hum. Genet.—1980.— Vol. 54.— P. 409—412.
10. Beutler E. // Amer. J. hum. Genet.—1979.— Vol. 31.— P. 95—105.
11. Beutler E., Kuhl W. // Proc. nat. Acad. Sci. USA.—1986.— Vol. 83.— P. 7472—7474.
12. Beutler E., Kuhl W., Sorge J. // Ibid.—1984.— Vol. 81.— P. 6506—6510.
13. Chang P. L., Davidson R. G. // Ibid.—1980.— Vol. 77.— P. 6166—6170.
14. Conzelmann E., Kytzia H.-J., Navon R. et al. // Amer. J. hum. Genet.—1983.— Vol. 35.— P. 900—913.
15. Dartington G. J. // Meth. Cell Biol.—1982.— Vol. 26.— P. 297—310.
16. Eisenberg L. R., Migeon B. R. // Somat. Cell Genet.—1979.— Vol. 5.— P. 1079—1089.
17. Figura von K., Hasilik A., Pohlmann R. et al. // Enzyme.—1987.— Vol. 38.— P. 144—153.
18. Fortuin J. J. H., Kleijer W. J. // Hum. Genet.—1980.— Vol. 53.— P. 155—159.
19. Galjaard H., Hoogveen A., de Wit-Verbeek H. A. et al. // Exp. Cell Res.—1974.— Vol. 87.— P. 444—448.
20. Galjaard H., Hoogveen A., de Wit-Verbeek H. A. et al. // Clinical, Biochemical and Genetic Heterogeneity in Lysosomal Storage Diseases.— S.-Gravenhage, 1977.— P. 66—70.
21. Galjaard H., Reuser A. J. J. // Lysosomes in Biology and Pathology / Eds. J. T. Dingle et al.— Amsterdam, 1984.— P. 315—345.
22. Galjaard H., Willemsen R., Hoogveen A. T. et al. // Enzyme.—1987.— Vol. 38.— P. 132—143.
23. Ganshow R. // Science.—1966.— Vol. 153.— P. 84—85.
24. Grabowski G. A., Dinur T., Ostecki K. M. et al. // Amer. J. hum. Genet.—1985.— Vol. 37.— P. 499—510.
25. Gravel R. A., Gravel Y. L., Miller A. L. et al. // Lysosomes and Lysosomal Storage Diseases / Eds. J. W. Callahan, J. A. Lowden.— New York, 1981.— P. 289—298.
26. Gravel R. A., Leung A. // Hum. Genet.—1984.— Vol. 65.— P. 112—116.
27. Hamers M. N., De Boer M., Meerhof L. J. et al. // Nature.—1984.— Vol. 307.— P. 553—555.
28. Honey N. K., Mueller O. T., Little L. E. et al. // Proc. nat. Acad. Sci. USA.—1982.— Vol. 79.— P. 7420—7424.
29. Hoogveen A. T., Verheijen F. W., d'Azzo A. et al. // Nature.—1980.— Vol. 285.— P. 500—502.
30. Hotwiltz A. L. // Proc. nat. Acad. Sci. USA.—1979.— Vol. 76.— P. 6496—6499.
31. Inui K., Grebner E. E., Jackson L. G. et al. // Amer. J. hum. Genet.—1983.— Vol. 35.— P. 551—564.
32. Jaspers N. G., Bootsma D. // Proc. nat. Acad. Sci. USA.—1982.— Vol. 79.— P. 2641—2644.
33. Kihara H., Tsay K. K., Fluhrly A. L. // Hum. Genet.—1981.— Vol. 66.— P. 300—301.
34. Knutton S. // J. Cell Sci.—1979.— Vol. 36.— P. 61—72.
35. Loonen M. C. B., Van Diggelen O. P., Jance H. C. et al. // Neuropediatrics.—1985.— Vol. 16.— P. 137—142.
36. Lucy J. A. // Biological Membranes / Ed. D. Chapman.— New York, 1982.— Vol. 4.— P. 367—415.
37. McInnes R. R., Shih V., Chilton S. // Proc. nat. Acad.

- Sci. USA.—1984.— Vol. 81.— P. 4480—4484.
38. McKusick V. A., Neufeld E. F. // The Metabolic Basis of Inherited Disease / Eds. J. B. Stanbury et al.— New York, 1983.— P. 751—777.
39. Mueller O. T., Henry W. M., Haley L. L. et al. // Proc. nat. Acad. Sci. USA.—1986.— Vol. 83.— P. 1817—1821.
40. Mueller O. T., Honey N. K., Little L. E. et al. // J. clin. Invest.—1983.— Vol. 72.— P. 1016—1023.
41. Mueller O. T., Little L. E., Miller A. L. et al. // Clin. chim. Acta.—1985.— Vol. 150.— P. 175—183.
42. Mueller O. T., Shows T. B. // Hum. Genet.—1982.— Vol. 60.— P. 158—162.
43. Mutoh T., Naoi M., Nagatsu T. et al. // Biochim. biophys. Acta.—1988.— Vol. 964.— P. 244—253.
44. Mutoh T., Naoi M., Takanashi A. et al. // Neurology.—1986.— Vol. 36.— P. 1237—1241.
45. Neufeld E. F., McKusick V. F. // The Metabolic Basis of Inherited Disease / Eds. J. B. Stanbury et al.— New York, 1983.— P. 778—787.
46. Okada S., Kato T., Yabuuchi H. et al. // Biochem. biophys. Res. Commun.—1979.— Vol. 88.— P. 559—562.
47. Palmeri S., Hoogveen A. T., Verheijen F. W. et al. // Amer. J. hum. Genet.—1986.— Vol. 38.— P. 137—148.
48. Pontecorvo G. // Somat. Cell Genet.—1975.— Vol. 1.— P. 397—400.
49. Reuser A. J. J., Koster J. F., Hoogveen A. T. et al. // Amer. J. hum. Genet.—1978.— Vol. 30.— P. 132—143.
50. Roos D., De Boer M., Weening R. S. et al. // Mononuclear Phagocytes / Ed. R. van Furth.— Dordrecht, 1985.— P. 453—461.
51. Sandhoff K., Christomanou H. // Hum. Genet.—1979.— Vol. 50.— P. 107—143.
52. Sato K., Ikenaga M., Sano S. // Med. J. Osaka Univ.—1982.— Vol. 33.— P. 19—28.
53. Shows T. B., Mueller O. T., Honey N. K. et al. // Amer. J. med. Genet.—1982.— Vol. 12.— P. 343—353.
54. Sips H. J., de Wit-Verbeek H. A., Westerveld A. // Hum. Genet.—1985.— Vol. 69.— P. 340—344.
55. Sonderfeld S., Brendler S., Sandhoff K. et al. // Ibid.— Vol. 71.— P. 196—200.
56. Sowers A. E. (Ed.) Cell Fusion.— New York, 1987.
57. Strisciuglio P., Creek K. E., Sly W. S. // Pediat. Res.—1984.— Vol. 18.— P. 167—171.
58. Swallow D. M., Hoogveen A. T., Verheijen F. W. et al. // Ann. hum. Genet.—1981.— Vol. 45.— P. 105—112.
59. Thomas G. M., Taylor H. J., Miller C. S. et al. // Nature.—1974.— Vol. 250.— P. 580—582.
60. Verheijen F. W. Lysosomal Neuraminidase in Human Genetic Diseases.— Alblisserdam, 1986.— P. 158.
61. Willard H. F., Mellman I. S., Rosenberg L. E. // Amer. J. hum. Genet.—1978.— Vol. 30.— P. 1—13.
62. Wolf B., Willard H. F., Rosenberg L. E. // Ibid.—1980.— Vol. 32.— P. 16—25.
63. Zlotogora J. // Ibid.—1987.— Vol. 27.— P. 633—638.

Поступила 13.08.89

USE OF GENETIC COMPLEMENTATION PROCEDURE IN EVALUATION OF HUMAN METABOLIC INHERITED DISEASES

E. M. Baskaeva

Institute of Biological and Medical Chemistry, Academy of Medical Sciences of the USSR, Moscow

Application of genetic complementation procedure for evaluation of heterogeneity and development of a number of human inherited impairments, particularly, lysosomal storage diseases, are reviewed. The genetic complementation procedure is involved in cytobiochemical diagnosis of a number of enzymopathies as well as in studies of subunit containing enzymes reconstruction and their function.

В. С. Якушев, В. И. Курипка, Л. Е. Белоконь,
Е. В. Миронова, Н. В. Крисанова, В. В. Давыдов,
В. П. Скурыгин

ИЗМЕНЕНИЕ КОНЦЕНТРАЦИИ СОМАТОТРОПИНА, ЦИКЛИЧЕСКИХ НУКЛЕОТИДОВ И СОСТОЯНИЕ БЕЛКОВОГО ОБМЕНА В МОЗГЕ И СЕРДЦЕ ПРИ СТРЕССЕ, А ТАКЖЕ НЕКРОЗЕ МИОКАРДА, ВОСПРОИЗВЕДЕННОМ ПОСЛЕ ПЕРЕНЕСЕННОГО СТРЕССА

Запорожский медицинский институт

Эмоциональный и болевой стрессы вызывают нарушения в белковом обмене различных органов [8, 10, 16], а также изменяют секрецию в кровь гормонов, контролирующих белковый обмен [4, 6, 12, 13, 18, 19].

Однако особенности гормональной регуляции синтеза белков в таких органах, как сердце и мозг, при некрозе миокарда (НМ), развивающегося после предварительного перенесенного стресса как самостоятельного фактора, являются не достаточно изученными.

Цель данной работы — изучить, во-первых, динамику поступления в кровь соматотропина и сопоставить с ранее установленной концентрацией инсулина, кортикостерона [18, 19], во-вторых, определить концентрацию циклических нуклеотидов и значения некоторых показателей белкового обмена в коре больших полушарий головного мозга и левом желудочке сердца при стрессе, НМ, а также НМ, воспроизведенном после перенесенного стресса.

МЕТОДИКА

Работу проводили на 322 крысах-самцах Вистар с массой тела 160—180 г. Животные были разделены на 4 группы: 1-ю составили интактные крысы, 2-ю — крысы, у которых воспроизводили стресс [23]; 3-ю — животные, у которых моделировали НМ перевязкой артерии общепринятым методом по Селье и исследовали на 2-е и 7-е сутки после начала опыта: 4-ю — крысы, у которых воспроизводили НМ после перенесенного стресса (ПС) и исследовали в те же сроки, что и предыдущую группу животных.

В крови концентрацию соматотропина и соматомедина изучали радиоиммунохимически с помощью наборов («Sorig Biomedica», Италия).

В коре больших полушарий головного мозга и левом желудочке сердца после их обработки жидким азотом радиоиммунохимически с помощью наборов определяли концентрацию

цию цАМФ («Beeton Dickinson», США) и цГМФ («Institute for reserwich», ЧССР).

Для изучения биосинтеза и распада белков крысам внутрибрюшинно вводили D, L-фенил-2,3-³H-аланин при исследовании мозга в дозе 50 мкКи, а при исследовании сердца в дозе 20 мкКи на 100 г массы. После введения метки у части крыс (3) проводили определение общей (ОР) и удельной радиоактивности (УР) через 2 ч после введения изотопа. У другой группы крыс (3) после 3 дней введения радиометки определяли эти же показатели. Период полураспада белка $t_{1/2}$ определяли по графику снижения ОР в зависимости от выбранного срока наблюдения в полулогарифмических координатах, согласно общепринятым методическим подходам.

При этом в случае опытных групп за начальную точку исследования выбирали 2-е сутки опыта, а за конечную — 5 суток опыта и результаты выражали периодом $t_{1/2}$, характерным для указанного срока опыта. Выбор данного подхода диктовался тем, что необходимо было точнее создать и оценить соответствие между динамикой $t_{1/2}$ (от 2 до 5 сут) и концентрацией соматотропного гормона (СТГ), соматомедина, а также циклических нуклеотидов.

УР белка исследовали на 2-е сутки опыта и выражали в имп/с на 1 мг белка. Концентрацию белка определяли общепринятым методом Лоури. ОР белка выражали в имп/с на суммарный белок (в мг), содержащийся в 1 г исследуемой ткани.

Активность катепсина D [21] определяли спектрофотометрическим методом в надосадочной жидкости и осадке, полученных после центрифугирования гомогената при 18 000 g в течение 15 мин с соблюдением необходимых технических условий. В качестве субстрата был выбран гемоглобин, и активность катепсина D выражали по приросту оптической плотности ТХУ-надосадка. Указанные исследования были проведены на 2-е и 7-е сутки опыта.

Развитие некроза оценивали по данным электрокардиографического и гистологического исследований. Воспроизведение стресса (по своему характеру эмоционально-болевому) в форме невроза тревоги контролировали по числу язв желудка [23], изменениям в тимусе.

В работе применяли счетчики радиоактивности РАК-гамма (LKB, Швеция) и «Бета-1» (СССР).

Полученные данные подвергали статистической обработке.

Результаты и обсуждение

Установлено, что содержание соматотропина на 2-е сутки после ПС уменьшается на 45 % от исходного уровня, а к 7-м суткам опыта нормализуется. При этом развитие НМ после ПС, а также без него характеризуется резко выраженной гипосоматотропинемией на 2-е сутки после начала опыта. Вместе с тем воспроизведение НМ после предварительного стресса характеризуется на 7-е сутки данного опыта концентрацией СТГ на 75 % ниже, чем при обычной модели НМ (табл. 1).

Следует отметить, что перенесенный стресс и НМ сопровождаются выраженным подъемом кортикостерона (КС) в крови, что наблюдалось нами, а также другими авторами [7, 18, 20, 27]. Кроме того, наши результаты свидетельствуют

Таблица 1

Концентрация СТГ в крови и концентрация циклических нуклеотидов (пмоль/г) в коре больших полушарий головного мозга и левом желудочке сердца при стрессе и НМ, воспроизведенном после перенесенного стресса ($M \pm m$)

Показатель	Интактные животные	Стресс, сут		НМ, сут		Стресс+НМ, сут	
		2-е	7-е	2-е	7-е	2-е	7-е
СТГ, мкг/л	4,3±0,3	2,2±0,4*	5,8±0,5	1,8±0,4*	4,4±0,6	1,5±0,1*	1,1±0,1***
Мозг:							
цАМФ	3596±276	2200±462*	1618±252*	2504±324*	2614±324*	2070±328*	2848±85
Сердце:							
цГМФ	31±4,1	90±5,7*	510±80,5*	7,2±1,6*	65,3±15,9*	30,0±10,0	420±86***
цАМФ	1485±149	2570±401*	3301±365*	1432±186	2002±401	1560±103	1980±413

Примечание. Здесь и в табл. 2 и 3: одна звездочка — $p < 0,05$ относительно интактных животных; две — $p < 0,05$ относительно стресса+НМ к НМ ($n=6-8$).

о том, что кортикостеронемия и ее выраженность в целом зависит от того, воздействовал ли предварительно стресс на организм или нет [18]. В частности, отсутствие дополнительного прироста КС указывает на истощение коры надпочечников, что является одним из неблагоприятных сдвигов в регуляции стероидогенеза [13, 15, 20]. В то же время угнетение секреции инсулина в кровь, являющегося постоянным атрибутом самостоятельного влияния стресса [4, 11], по нашим данным [19], не характерно для действия этого же фактора, когда он реализуется в случае последующего возникновения НМ. Можно полагать, что формирование НМ после предварительного ПС сопровождается, помимо активации инсулярного аппарата, угнетением функции коры надпочечников, а также резким ограничением активирующего влияния гипоталамуса на переднюю долю гипофиза [24—26, 28], связанных с секрецией СТГ в кровь. Из полученных результатов можно сделать вывод, что в остром периоде после ПС (до 2 сут), а также в это же время после НМ в различных условиях его воспроизведения [22, 24] стресс выступает как неспецифический фактор, формирующий гипосоматотропинемия. Однако уже к 7-м суткам после ПС при наличии НМ снижение СТГ является специфическим отражением комбинированного влияния исследуемых состояний на фоне неадекватного выброса в кровь КС.

Известно, что изменения секреции СТГ, инсулина и КС в крови, другие гормональные сдвиги, а также гипокальциемия [17] при исследуемых состояниях организма могут влиять на концентрацию циклических нуклеотидов и их соотношение. Как видно из табл. 1, ПС сопровождается уменьшением концентрации цАМФ в коре больших полушарий головного мозга: на 2-е сутки на 39 %, а на 7-е сутки на 55 % по сравнению с исходным уровнем. В эти же сроки отмечается резкое увеличение концентрации цГМФ, особенно на 7-е сутки (в 16 раз). В сердце же, наоборот, содержание цАМФ на 2-е и 7-е сутки опыта повышается соответственно на 73 и 122 % по сравнению с исходной величиной.

Исследование циклических нуклеотидов в коре мозга при НМ и НМ, воспроизведенном после ПС, показывает, что на 2-е и 7-е сутки снижение концентрации цАМФ менее выражено, чем при ПС. Интересно отметить, что при традиционно смоделированном НМ на 2-е сутки опыта концентрация цГМФ снижается в 4,4 раза, а на 7-е сутки его уровень вновь увеличивается в 2 раза по срав-

нению с исходной величиной. При НМ, воспроизведенном после ПС, в мозге на 7-е сутки опыта содержание цГМФ повышается в 13,5 раза по отношению к норме.

В левом желудочке сердца при обоих вариантах воспроизведения НМ концентрация цАМФ достоверно не отличается от интактных животных и ниже, чем при ПС ($p < 0,05$).

Полученные данные показывают, что в коре больших полушарий головного мозга ПС способствует резкому накоплению цГМФ, что отражает уменьшение адренореактивности и увеличение холинреактивности [2, 14]. Можно полагать, что ПС углубляет это соотношение, так как содержание цАМФ к 7-м суткам опыта прогрессивно снижается, а цГМФ — нарастает. При НМ, воспроизведенном после ПС, данная ситуация будет менее выраженной на 2-е сутки и более значительной на 7-е сутки опыта.

В то же время развитие НМ без предварительного воздействия стресса в остром периоде (2-е сутки) сопровождается резким преобладанием адренергических воздействий, что подтверждается значительным уменьшением цГМФ при относительном нарастании концентрации цАМФ. На 7-е сутки это соотношение в незначительной степени снижается.

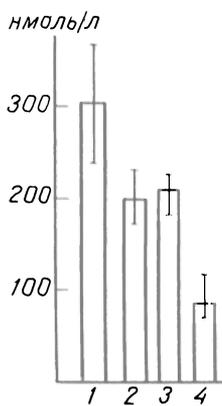
Вероятно, перенесенный стресс оказывает в целом ингибирующее действие на аденилатциклазу наружной клеточной мембраны в нейронах коры головного мозга и способствует активации гуанилатциклазы, локализованной в цитоплазме за счет таких факторов, как активация накопления кальция [17] и процессов перекисного окисления [8, 10]. Однако возможно действие этих факторов в коре мозга в случае НМ реализуется только к концу недельного периода его развития. В сердце же, несмотря на активацию ПОЛ [8], перенесенный стресс, а также развитие НМ не приводят к изменению функции аденилатциклазы.

В конечном итоге в мозге и сердце создаются разные условия для изменения соотношений цАМФ/цГМФ, которые, как известно, влияют на характер лабильности мембран лизосом [3, 5]. Из табл. 2 следует, что в коре больших полушарий головного мозга и в сердце ПС сопровождается повышенной лабильностью лизосом к концу 7-х суток опыта, о чем судили по увеличению неседиментируемой активности катепсина D по сравнению с исходным уровнем. Обращает на себя внимание тот факт, что НМ, воспроизведенный после ПС, не сопровождается лабильностью лизосом мозга и выходом катепсина D в цитозоль.

Таблица 2

Общая и неседиментируемая активность катепсина D в коре больших полушарий головного мозга и сердца при стрессе и НМ, воспроизведенном после перенесенного стресса, мкмоль тирозина/мг белка в ч; $M \pm m$; $n = 5-7$

Показатель	Интактные животные	Сутки после стресса		Сутки после НМ		Сутки после стресса	Сутки после НМ
		2-е	7-е	2-е	7-е	2-е	7-е
Мозг:							
неседиментируемая активность	0,3±0,001	0,01±0,004*	0,06±0,004*	0,04±0,001*	0,007±0,001*	0,02±0,007	0,03±0,007
общая активность	0,06±0,002	0,06±0,003	0,08±0,005*	0,08±0,003*	0,07±0,003*	0,04±0,004*	0,05±0,007
Сердце:							
неседиментируемая активность	0,01±0,001	0,02±0,002*	0,03±0,002*	0,05±0,005	0,02±0,001	0,03±0,008	0,07±0,002
общая активность	0,1±0,01	0,04±0,009*	0,1±0,004	0,08±0,007	0,07±0,01	0,02±0,003	0,06±0,003



Концентрации соматомедина в сыворотке крови у интактных животных (1), на 2-е сутки после перенесенного стресса (2) или НМ (3), а также при воспроизведении НМ после перенесенного стресса (4).

Следует отметить выявленную обратную зависимость между уровнем неседиментируемой активности катепсина D в клетках коры мозга и величиной соотношения цАМФ/цГМФ. В частности, ПС сопровождается резким уменьшением цАМФ/цГМФ и двукратным увеличением неседиментируемой активности катепсина D. При НМ соотношение цАМФ/цГМФ значительно выше, а неседиментируемая активность катепсина D — ниже. В свою очередь сопоставление динамики изменения неседиментируемой активности катепсина D и концентрации цГМФ в ткани левого желудочка сердца свидетельствует о значении последнего в лабильности мембран лизосом миокарда. В итоге могут иметь место изменения интенсивности белкового распада в коре головного мозга и левом желудочке сердца.

Вместе с тем большое значение в регуляции белкового обмена имеет соотношение в крови таких гормонов, как СТГ, инсулин и КС, которые регулируют концентрацию соматомедина, активизирующего белковый синтез [1]. Как видно из представленных результатов, при ПС и НМ наблюдается стойкая тенденция к снижению концентрации соматомедина в целом на 23—24 % по сравнению с исходным уровнем (см. рисунок). Следует отметить, что только в случае ПС при последующем развитии НМ содержание соматомедина снижается на 69 % по сравнению с исходным уровнем. Эти результаты свидетельствуют, что ПС в данных экспериментальных условиях вызывает не только стойкое нарушение секреции СТГ и других гормонов, но и затрагивает образование соматомедина в печени, создавая основу нарушения синтетической фазы белкового обмена. При этом видно, что основное проявление указанного эффекта в полной мере проявляется в органе-мишени — сердце. Анализ выявленных гормональных нарушений и динами-

ки изменения концентрации соматомедина показывает, что ПС в случае последующего развития НМ определяет, по нашему мнению, гормональный гомеостаз, что выражается в изменении отношения КС/инсулин при стойком дефиците секреции СТГ и соматомедина в кровь. Последнее является качественно новым состоянием нейрогуморальной регуляции, так как не выявляется при изолированном воздействии ПС или НМ.

Исследование интенсивности обновления белков в коре мозга показывало, что наибольшая скорость деградации отмечается при НМ ($t_{1/2}$ составляет 46 % от исходного уровня). При этом ПС, являясь фактором активации катаболических процессов, в случае своего предшествующего воздействия при последующем формировании НМ ограничивает распад белка. Так, $t_{1/2}$ при ПС составляет 91 %, а при НМ, воспроизведенном после ПС, — 74 % по сравнению с исходным уровнем. Эти результаты в определенной мере соотносятся с изменением общей активности катепсина D, максимальная активация которого наблюдается при НМ. При ПС активация катепсина D и повышенный уровень его неседиментируемой активности отмечаются только к концу недельного срока эксперимента. Обращает на себя внимание тот факт, что при этих условиях в коре больших полушарий головного мозга резко снижается соотношение цАМФ/цГМФ за счет резкого увеличения концентрации цГМФ. Следует отметить, что подобные сдвиги отмечаются и в том случае, если НМ предшествует ПС. При этом общая активность катепсина D снижается еще в большей степени, а уровень неседиментируемой активности не меняется.

Показано, что ПС сопровождается угнетением биосинтеза белка в коре мозга, так как УР и ОР снижаются в среднем на 15 % по сравнению с исходной величиной (табл. 3). Развитие НМ независимо от того, предшествовал ли ему стресс или нет, сопровождается резкой активацией скорости белкового синтеза, так как величина УР в этих случаях выше в 1,7—1,9 раза по сравнению с исходным уровнем. Однако в том случае, если стресс как самостоятельный фактор предшествовал НМ, общая интенсивность синтеза белков ограничивается. В частности, ОА на 48 % ниже по сравнению с традиционной моделью НМ.

Результаты этих исследований свидетельствуют о том, что ПС, резко активируя гуанилатциклазу, вызывает, вероятно, уменьшение использования ГТФ в биологическом синтезе белка в коре мозга. В то же время большое значение бу-

Таблица 3

$t_{1/2}$ и показатели биосинтеза белка в коре больших полушарий мозга и сердца при стрессе и НМ, воспроизведенном после перенесенного стресса

Группа животных	$t_{1/2}$, дни (между 2-ми и 5-ми сутками)		УР (2 сут)		ОР (2 сут)	
	мозг	сердце	мозг	сердце	мозг	сердце
Интактная	7,0	5,6	806±85	323±26	32 240	98 192
Стресс	6,4	10,0	683±192	262±7,0*	27 320*	79 648
НМ	3,2	5,2	1562±90*	309±12	87 472	99 736
Стресс+НМ	5,2	12,0	1387±145*	182±36*.*	45 771	83 000

дет иметь гормональная перестройка, связанная с изменением типа секреции гормонов, обладающих анаболическим эффектом на фоне неспецифической гиперкортикостеронемии. С этой точки зрения, указанные выше соотношения КС, СТГ и инсулина являются важными и характер их секреции в кровь в зависимости от типа состояния будет определяющим в контроле за синтезом соматомедина.

Исследование аналогичных процессов в сердце показывает, что сам по себе НМ сопровождается в неишемизированном отделе левого желудочка усилением распада белка (см. табл. 3). В частности, $t_{1/2}$ уменьшается в 7,1 раза по сравнению с интактными животными. Однако состояние ПС как при последующем развитии некроза, так и без него сопровождается ограничением распада белков, на что указывает более умеренное увеличение $t_{1/2}$ (соответственно в 1,7 и 2,1 раза по сравнению с исходным уровнем).

Анализ полученных данных свидетельствует о том, что ПС — значительный фактор, влияющий на состояние гормональной регуляции и белоксинтезирующих систем мозга и сердца. В частности, стресс определяет нарушение секреции в кровь СТГ, особенно выраженное при НМ, воспроизведенном после ПС. Можно думать, что кортико-стеронемия в этом случае резко угнетает продукцию соматомедина, а поступающего в большом количестве инсулина в кровь недостаточно для контрэфекта. В случае же только ПС больше проявляется влияние гипоинсулинемии. Однако несмотря на это, стресс, влияя подобным образом на обмен соматомедина, одновременно через характерные гормональные сдвиги играет определяющую роль в формировании соотношения цАМФ/цГМФ. Последнее имеет значение не только для функционального состояния нейронов или миоцитов, но и для структурного состояния мембран лизосом. Обращает на себя внимание тот факт, что усиление катаболических процессов при НМ в коре больших полушарий мозга сочетается с повышением общей активности катепсина D в лизосомах при незначительном увеличении уровня неседиментируемой активности. Это согласуется с достаточно высокой величиной соотношения цАМФ/цГМФ. В сердце же, напротив, отмечается высокий эффект лабильзации мембран лизосом и выход катепсина D в цитозольную фракцию с последующим умеренно выраженным снижением $t_{1/2}$. Однако в случае ПС на фоне уменьшения адренореактивности и увеличения холинреактивности лабильзация лизосомальных мембран в клетках коры мозга не проявляется в значительной мере. При этом четко прослеживается тенденция к уменьшению общей активности катепсина D и увеличению $t_{1/2}$ белков. Оценка интенсивности синтеза и распада белков в коре мозга в случае воздействия стресса становится более понятной, если учитывать состояние возбудимости нейронов. Известно, что такими объективными критериями являются увеличение концентрации цГМФ и ее соотношение с цАМФ [2, 14]. Так, при НМ, воспроизведенном без предварительного воздействия стресса, в коре мозга отношение цАМФ/цГМФ увеличивается за счет резкой убыли цГМФ, что связывают с пониженной нейронной активностью [14], а, следовательно, и возбу-

димостью центров коры головного мозга. По-видимому, в подобных условиях происходит активация синтеза белков. При перенесенном же стрессе и НМ, воспроизведенном после ПС, отмечается резкая стимуляция накопления цГМФ, что отражает повышение нейронной активности и состояние резкой сверхвозбудимости [1]. При этом степень выраженности будет определяться и конкретной динамикой цАМФ. Вероятно, состояние сверхвозбудимости, характерное для ПС, не сопровождается адекватным синтезом белков, что сохраняется и при НМ, воспроизведенном после ПС, несмотря на высокую УА. Данные процессы в конечном итоге могут в определенной степени служить основой молекулярных и функциональных нарушений в мозге при стрессе и его потенцирующих воздействиях при такой патологии, как НМ. Аналогичная ситуация, но выраженная в меньшей степени, во многом характерна и для сердца.

Из изложенного следует, что перенесенный стресс как в мозге, так и в сердце снижает эффективность работы аппарата белкового синтеза. При этом, если в коре мозга процесс обновления белков под влиянием стресса активирован, то для левого желудочка сердца он резко ограничивается при одновременном нарушении синтеза белков. Учитывая функцию сердца, можно полагать, что нарушение процесса обновления белков в условиях развития НМ после ПС окажет отрицательное влияние на эффективное развитие неишемизированным отделом левого желудочка сердца в остром периоде компенсаторной гиперфункции, играющей важную роль в сохранении жизни при инфаркте миокарда [9]. Таким образом, перенесенный стресс как самостоятельная причина, а также при последующем развитии некроза в сердце — важнейший фактор, предопределяющий резкое снижение концентрации СТГ и нарушение синтеза белков в коре больших полушарий головного мозга и в неишемизированном отделе левого желудочка сердца.

ЛИТЕРАТУРА

1. Васильева И. А. // Пробл. эндокринологии. — 1981. — № 1. — С. 81—84.
2. Дорофеев Г. И., Кожемякин Л. А., Ивашкин В. Т. Циклические нуклеотиды и адаптации организма. — Л., 1978.
3. Калинин М. И. // Укр. биохим. журн. — 1984. — Т. 56, № 4. — С. 408—413.
4. Колесова Н. И., Волошина Э. И., Удинцев П. А. // Бюл. Сиб. отд. АМН СССР. — 1984. — № 4. — С. 80—83.
5. Коровкин Б. Ф. // Вестн. АМН СССР. — 1982. — № 9. — С. 69—74.
6. Курбанов В. А. // Кардиология. — 1987. — № 12. — С. 79—82.
7. Мальшев В. В., Петрова В. А., Манухин Б. Н. // Бюл. экпер. биол. — 1985. — № 3. — С. 267—269.
8. Меерсон Ф. З. Адаптация, стресс и профилактика. — М., 1981.
9. Меерсон Ф. З. Гиперфункция. Гипертрофия. Недостаточность сердца. — М., 1968.
10. Микаэлян Э. М., Мхитарян В. Г. // Биол. журн. Армении. — 1985. — Т. 38, № 8. — С. 393—399.
11. Панин Л. Е., Соколов В. П. Психосоматические взаимоотношения при хроническом эмоциональном напряжении. — Новосибирск, 1981.
12. Селье Г. Очерки об адаптационном синдроме: Пер. с англ. — М., 1960.
13. Чирков А. М., Чиркова С. К., Старцев В. Г. Эмоциональный стресс у обезьян. — Л., 1987.
14. Ферренделли Дж., Гросс Р., Киншерф Д., Рубин Е. // Психофармакология циклических нуклеотидов. — М., 1982. — С. 241—258.

15. Филаретов А. А. Принципы и механизмы регуляции гипофизарно-адренокортикальной системы.— Л., 1987.
16. Якушев В. С., Давыдов В. В., Бушueva В. В. и др. // Укр. биохим. журн.— 1985.— Т. 57, № 2.— С. 15—18.
17. Якушев В. С., Миронова Е. В., Курипка В. И. и др. // Физиол. журн.— 1985.— Т. 31, № 6.— С. 36—42.
18. Якушев В. С., Миронова Е. В., Курипка В. И. // Вопр. мед. химии.— 1986.— № 6.— С. 93—96.
19. Якушев В. С., Курипка В. И., Шкопинский Е. Н. и др. // Там же.— 1987.— № 2.— С. 18—25.
20. Armario A., Restepo C., Castellanos T. // Life Sci.— 1985.— Vol. 36, N 22.— P. 2085—2092.
21. Anson M. // J. gen. Physiol.— 1939.— P. 22, N 1.— P. 79—83.
22. Day T. // J. biol. Sci.— 1983.— Vol. 36, N 5—6.— P. 525—530.
23. Desiderato O., Mackinon J., Hisson H. // J. comp. Physiol.— 1974.— Vol. 87, N 4.— P. 204—214.
24. Ericson E., John-Olov J. // Life Sci.— 1985.— Vol. 37, N 13.— P. 1241—1248.
25. Fuxe K., Hokfelt L., Agnafi L. et al. // Psychopharmacology.— New York, 1978.— P. 67—94.
26. Glavin G. // Neurosci. Biol. Rev.— 1985.— Vol. 9, N 2.— P. 233—243.
27. Keller K., Hecht K., Marek H. et al. // Z. ges. inn. Med.— 1980.— Bd 35, N 10.— S. 418—421.
28. Schafer J., Hruck A. // Endocrinology.— 1980.— Vol. 106, N 15.— P. 1377—1385.

Поступила 15.03.89

ALTERATIONS IN CONCENTRATION OF STH, CYCLIC NUCLEOTIDES AND THE STATE OF PROTEIN METABOLISM IN BRAIN AND HEART TISSUES UNDER CONDITIONS OF STRESS AND MYOCARDIUM NECROSIS DEVELOPED AFTER STRESS

V. S. Yakushev, B. I. Kuripka, L. E. Belokon, E. S. Mironova, N. V. Krisanova, V. V. Davidov, V. P. Skurygin

Medical School, Zaporozje

Stress itself as well as the subsequent myocardium necrosis developed after stress were mainly responsible for distinct decrease in concentration of somatotropin, somatomedin and for impairments in protein synthesis accompanied by decrease in proteins half-life in brain hemispheres and in non-ischemized heart left ventricle.

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 1990

УДК 616.522/.527-07:616.153.1:577.152.34+616.154:577.175.853

С. А. Грандо, Б. Т. Глухенький, А. П. Костромин, Ю. Я. Бойко, Н. С. Куценко, Т. А. Коростах

ЗНАЧЕНИЕ КОМПОНЕНТОВ КАЛЛИКРЕИН-КИНИНОВОЙ СИСТЕМЫ В ПАТОГЕНЕЗЕ ПУЗЫРНЫХ ПОРАЖЕНИЙ КОЖИ ПРИ ПУЗЫРЧАТКЕ И ПЕМФИГОИДЕ

Киевский институт усовершенствования врачей Минздрава СССР

Сериновые протеиназы и их ингибиторы, присутствующие в крови и тканях организма, играют важную роль в поддержании гомеостаза. Нарушение равновесия между содержанием (активностью) ферментов протеолиза и блокирующих белков, имеющее место при патологических состояниях различной этиологии, является информативным признаком активации или угнетения ферментативных процессов, происходящих в калликреин-кининовой системе, свертывающей и противосвертывающей системах под влиянием экзо- или эндогенных стимулов. При иммунозависимых воспалительных реакциях кожи сериновые протеи-

назы, в частности активатор плазминогена, продуцируемые как эпидермоцитами и эндотелиоцитами [15, 17], так и гранулоцитами и мононуклеарами, мигрировавшими в кожу [22], обуславливают интенсивность локального протеолиза, что является определяющим фактором в возникновении поражения. Наряду с защитным действием ферментов протеолиза, направленным на элиминацию из организма некротизированных тканей, антигенов и иммунных комплексов, при аутоиммунных буллезных дерматозах эндопротеиназы, активируясь *in situ*, могут непосредственно повреждать собственные клетки и ткани, приводя тем самым к клиническим проявлениям заболевания [28].

Вульгарная пузырчатка (ВП) и буллезный пемфигоид (БП) относятся к органоспецифичным аутоиммунным заболеваниям, при которых в результате фиксации аутоантител в тканях кожи и слизистой оболочки появляются пузыри с серозным содержимым. Иммунное воспаление при ВП локализуется в верхних слоях кожи — в эпидермисе, а при БП — в месте соединения эпидермиса с подлежащей дермой. В патогенезе ВП и БП установлена важная роль активатора плазминогена [18, 26]. Эпидермис пораженной кожи больных обладает повышенным фибринолитическим потенциалом [27]. Глюкокортикоидные препараты, позволяющие сохранить жизнь больным этими потенциально летальными заболеваниями, способны стимулировать продукцию ингибитора активатора плазминогена [28].

Однако в ряде экспериментальных и клинических исследований было показано, что альтерирующее воздействие сериновых протеиназ на ткани кожи не ограничивается вовлечением компонентов плазминоген-плазминовой системы [14]. Выказано предположение об участии активных агентов калликреин-кининовой системы в реализации цитолитического действия гуморальных и клеточных эффекторов аутоиммунной агрессии при ВП и БП [25, 29].

Цель работы — исследовать состояние калликреин-кининовой системы в плазме крови и пузырной жидкости больных ВП и БП, а также выяснить значение компонентов системы в развитии акантолиза (разъединения клеток шиповидного слоя эпидермиса при ВП и эпидермодермального разъединения при БП) на экспериментальной модели дерматоза *in vivo*.

Методика

Под наблюдением находилось 118 больных ВП (39 первичных, 42 при эксацербации заболевания и 37 в состоянии ремиссии) и 78 БП (соответственно 26, 19 и 33 больных). Титр сывороточных аутоантител иммуноглобулинов (Ig) класса G против антигена пузырчатки по данным реакции непрямой иммунофлюоресценции (субстрат — эпителий пищевода гвинейской свинки) у больных ВП с клиническими проявлениями заболевания находился в пределах от 1/640 до 1/1280, а пемфигоидных антител у больных БП — 1/320—1/1280. Пробы крови, как и содержимого свежих нескрытых пузырей, разведенного в соотношении 1:1 физиологическим раствором, собирали в полиэтиленовые пробирки, центрифугировали 15 мин при 2000 об/мин для осаждения клеточных элементов; супернатанты разливали на аликвоты соответственно числу исследуемых показателей калликреин-кининовой системы и хранили при температуре —30 °С.

Опыты проводили на 224 беспородных гвинейских свинках массой 350—500 г. Для индукции пузырных высыпаний.

соответствующих клиническим проявлениям ВП, экспериментальным животным интраперитонеально вводили IgG-фракцию сыворотки крови больных ВП на протяжении 2 сут в суммарной дозе 1,5 г (6 мг/г) с последующим (через 24 ч после окончания цикла интраперитонеальных инъекций IgG-фракции) внутривенным введением 2 мл пузырной жидкости больных этим дерматозом в 10—15 мест выщипанной кожи спины гвинеийских свинок. IgG-фракцию сыворотки крови больных ВП получали сульфат-риваноловым методом [4] в модификации С. В. Гаврилова [2]. Конечная концентрация белка составляла $33,2 \pm 0,2$ мг/мл. Для индукции ВП животным внутривенно в 10—15 мест выщипанной кожи спины вводили 1,5 мл пузырной жидкости больных ВП, содержащей мононуклеарную фракцию лейкоцитов периферической крови тех же больных, выделенную в градиенте плотности фикола—верографина 1,076—1,078. Адекватность пузырных поражений кожи гвинеийских свинок патологическим процессам, происходящим в коже больных ВП и БП, была подтверждена данными гистологических и иммунофлюоресцентных исследований биоптатов кожи животных, которые брали спустя 6—8 ч после появления пузырных элементов под местной анестезией 0,5 % раствором новокаина. Критериями экспериментальной ВП служили: разъединение шиповидных клеток эпидермиса с образованием интраэпидермальных пузырей и отложения IgG больных ВП в межклеточном пространстве росткового слоя эпидермиса; экспериментальной БП — эпидермо-дермальное разъединение кожи с образованием суббазальных пузырей и линейное отложение IgG больных БП в зоне базальной мембраны эпидермиса. Образцы кожи, окрашенные гематоксилином и эозином, исследовали в световом микроскопе, а криостатные срезы размером 4—5 мкм изучали методом прямой иммунофлюоресценции с использованием моноспецифических люминесцирующих антител против IgG человека (фирма "Amersham", Великобритания). В I серии опытов, перед введением гвинеийским свинкам пузырной жидкости больных ВП и БП, в нее добавляли одно из следующих веществ: соевый ингибитор трипсина (в концентрации 1, 3 и 5 мг/мл), омовукоид (0,1 и 0,5 мг/мл), контрикал (0,1, 0,5 и 1 АТгЕ/мл), дексаметазон (0,02, 0,2 и 2 мкг/мл), ϵ -аминокапроновую кислоту (0,01, 0,05 и 0,1 мг/мл), простагландин E_2 (1 и 5 мкг/мл). Во II серии опытов гвинеийским свинкам в течение 2 сут до ожидаемого появления индуцированных буллезных высыпаний в полость сердца (под эфирным наркозом) вводили: контрикал (1 АТгЕ на 1 г массы в сутки) либо ϵ -аминокапроновую кислоту (0,2 мг/г в сутки), либо дексаметазон (0,2 мкг/г в сутки). Перорально применяли пармидин (30 мкг/г в сутки). В III серии опытов те же препараты, что и во II серии, в указанных дозах вводили животным с индуцированными ВП и БП начиная со 2-х суток после появления пузырных

высыпаний на коже. В подгруппах животных, получавших пармидин перорально, также использовали местное применение препарата в виде 5 % мази. Выбор указанных препаратов был обусловлен необходимостью установить вид биологического активного вещества, участвующего в повреждении кожи у больных ВП и БП, а также попыткой выяснить возможность экскреции эндогенных флогогенов клетками воспаления, мигрирующими в очаг буллезного поражения. При интерпретации результатов учитывали сведения о фармакологическом эффекте применяемых ингибиторов: блокирующий эффект глюкокортикоидов, в частности дексаметазона, на функциональную активность клеток воспаления [5], супрессорное влияние простагландина E_2 на эффекторы клеточного иммунитета [20, 24], поливалентный антипротеазный эффект контрикала [11], антикининовое действие пармидина [3], способность соевого ингибитора трипсина и омовукоида угнетать активность активатора плазминогена и других сериновых протеаз [1], а также нестероидное противовоспалительное действие ϵ -аминокапроновой кислоты [13].

Перед взятием крови животных забивали методом интракардиальной воздушной эмболии, которую выполняли под эфирным наркозом.

При изучении состояния калликреин-кининовой системы использовали низкомолекулярный субстрат N- α -бензоил-L-аргинин этиловый эфир (БАЭЭ). Активность прекалликреина (ПКК), калликреина (КК) и общую БАЭЭ-эстеразную активность, характеризующую суммарный потенциал сериновых протеиназ, исследовали спектрофотометрическим методом по скорости гидролиза БАЭЭ [8, 9]. 1 миллиэстеразная единица (мед) активности соответствовала такому количеству фермента в 1 мл плазмы крови или пузырной жидкости, которое катализирует гидролиз БАЭЭ в стандартных условиях с освобождением 1 нмоль N- α -бензоил-L-аргинина за 1 мин. Об антитриптической емкости плазмы крови и пузырной жидкости судили по уровню α_1 -анти-трипсина (α_1 -АТ) и α_2 -макроглобулина (α_2 -МГ). Активность α_1 -АТ и α_2 -МГ определяли унифицированным спектрофотометрическим методом [6] с использованием БАЭЭ. 1 условная ингибиторная единица (ИЕ) соответствовала такому количеству ингибитора, присутствующего в 1 мл плазмы крови или пузырной жидкости, которое тормозит (α_1 -АТ) или связывает (α_2 -МГ) расщепление трипсином 1 мкмоль БАЭЭ за 1 мин. Активность киназазы I (КФ 3.4.15.7) плазмы крови и пузырной жидкости исследовали спектрофотометрическим методом [19] в модификации Т. С. Пасхиной и соавт. [10] с использованием в качестве субстрата гиппурил-L-лизина. 1 миллиединица (мед) активности соответствовала такому количеству фермента в 1 мл плазмы крови или пузырной жидкости, которое расщепляет субстрат гиппурил-L-лизин и освобождает 1 нмоль гиппуриновой кислоты за 1 мин.

Т а б л и ц а 1

Активность калликреин-кининовой системы у больных ВП и БП ($M \pm m$)

Группа обследованных	ПКК	КК	Общая БАЭЭ-эстеразная активность	α_1 -АТ	α_2 -МГ	Киназаза I, мед/мл
	мед/мл			ИЕ/мл		
Больные ВП:						
в начале болезни (n=39)	$136,4 \pm 12,6$ $31,3 \pm 4,9$	$106,9 \pm 12,7$ $225,7 \pm 19,6$	$448,5 \pm 26,8$ $608,9 \pm 53,9$	$69,9 \pm 7,8$ $10,1 \pm 0,6$	$1,4 \pm 0,3$ $0,9 \pm 0,1$	$218,9 \pm 32,8^*$ $286,4 \pm 17,9^*$
при эксацербации (n=42)	$58,5 \pm 7,9$ $12,6 \pm 2,3$	$94,7 \pm 7,3$ $184,9 \pm 12,0$	$444,7 \pm 29,6$ $526,3 \pm 42,8$	$59,3 \pm 4,6$ $21,2 \pm 0,7$	$3,4 \pm 0,2^*$ $2,9 \pm 0,7^*$	$263,8 \pm 42,6^*$ $284,8 \pm 39,0^*$
при ремиссии (n=37)	$204,2 \pm 19,3^*$ —	$14,2 \pm 0,9$ —	$210,8 \pm 26,8^*$ —	$30,8 \pm 4,9^*$ —	$8,3 \pm 1,0$ —	$209,4 \pm 26,4^*$ —
Больные БП:						
в начале болезни (n=26)	$111,3 \pm 8,7$ $14,8 \pm 0,6$	$87,4 \pm 9,0$ $108,3 \pm 11,4$	$300,7 \pm 19,6$ $348,8 \pm 47,5$	$41,7 \pm 5,0$ $17,4 \pm 2,1$	$2,0 \pm 0,3$ $1,4 \pm 0,2$	$342,8 \pm 48,9$ $406,8 \pm 53,9$
при эксацербации (n=19)	$85,3 \pm 6,9$ $26,3 \pm 4,8$	$67,8 \pm 8,6$ $102,9 \pm 14,3$	$288,7 \pm 19,0$ $403,6 \pm 85,6$	$39,4 \pm 2,8$ $20,8 \pm 6,3^*$	$4,1 \pm 0,5^*$ $2,9 \pm 0,6^*$	$286,7 \pm 21,6^*$ $358,9 \pm 44,6$
при ремиссии (n=33)	$212,8 \pm 14,1^*$ —	$8,1 \pm 0,4^*$ —	$226,7 \pm 18,6^*$ —	$27,3 \pm 5,5^*$ —	$5,3 \pm 0,6$ —	$233,4 \pm 10,4^*$ —
Здоровые доноры (n=37)	$226,8 \pm 10,7$ —	$2,8 \pm 0,7$ —	$239,8 \pm 12,4$ —	$26,8 \pm 3,4$ —	$3,9 \pm 0,3$ —	$258,4 \pm 19,2$ —

Примечание. В числителе — показатели в плазме крови, в знаменателе — в пузырной жидкости. Звездочка — $p > 0,05$, остальные — $p < 0,05$ относительно показателей здоровых доноров.

Контролем при исследовании показателей калликреин-кининовой системы у больных ВП и БП служила кровь 37 здоровых доноров, а у экспериментальных животных — кровь 18 интактных гвинейских свинок.

Статистическую обработку полученных данных проводили с использованием *t*-критерия Стьюдента.

Результаты и обсуждение

Результаты исследования состояния калликреин-кининовой системы при ВП и БП в различных стадиях заболеваний (табл. 1) показали, что у первичных больных происходит активное образование калликреина из его неактивного предшественника прекалликреина. На это указывают увеличение уровня КК и снижение содержания ПКК. Нарастание общей БАЭЭ-эстеразной активности отражает активацию различных эндопротеаз, обладающих серинэстеразной активностью. В отличие от плазмы крови, в которой протеолитический потенциал сериновых протеиназ был компенсирован возросшей антипротеазной активностью, в пузырной жидкости больных ВП и БП установлен дефицит ингибиторов протеолиза.

Нарушение равновесия системы эндопротеиназа—ингибитор в месте повреждения кожи проявлялось более выраженным, чем в крови, увеличением активности сериновых протеиназ и снижением уровня α_1 -АТ. Активность α_2 -МГ в плазме крови и пузырной жидкости у первичных больных ВП и БП была достоверно снижена.

У больных ВП и БП с экзацербацией заболеваний состояние калликреин-кининовой системы несколько отличалось от такового у первичных больных. Это выражалось в повышении уровня α_2 -МГ до нормальных значений, обнаруженном как в крови, так и в пузырной жидкости. С учетом того, что обострения буллезных дерматозов у всех обследованных больных были зарегистрированы на фоне иммуносупрессивной терапии глюкокортикоидами, данные об увеличении активности α_2 -МГ в определенной мере подтверждают существующее предположение [23] о том, что глюкокортикоиды стимулируют синтез этого ингибитора протеиназ клетками организма.

В фазе ремиссии ВП и БП, достигнутой в результате комплексной иммуносупрессивной (кортикостероидами и цитостатическими препаратами) и антипротеазной терапии, показатели калликреин-кининовой системы крови больных имели выраженную тенденцию к нормализации. Вместе с тем активность α_2 -МГ превышала нормальные значения.

Полученные данные, по нашему мнению, отражают участие компонентов калликреин-кининовой системы в патогенезе обсуждаемых аутоиммунных дерматозов. Весьма информативным показателем, характеризующим состояние гомеостаза больных ВП и БП, является α_2 -МГ. Прослеженная динамика изменений активности этого поливалентного ингибитора эндопротеиназ в различные фазы заболеваний, позволяет с достаточно высокой долей вероятности предположить, что снижение уровня α_2 -МГ является следствием интенсивного образования неактивных комплексов α_2 -МГ—протеаза [1] и может рассматриваться как фактор, предрасполагающий к прогрессированию пузырного воспалительного процесса в коже.

В процессе исследований не выявлено статистически достоверных изменений кининазной активности плазмы крови и пузырной жидкости больных ВП. Этот факт в определенной мере ставит под сомнение участие брадикинина и других активных кининов в развитии акантолиза. Однако у больных БП в отличие от больных ВП активность кининазы I в пузырной жидкости была достоверно повышена. Увеличение активности кининазы I в очаге поражения при БП может быть вызвано повышением уровня кининов *in situ*. Нельзя исключить, что брадикинин является одним из патогенетических факторов, способствующих привлечению к эпидермодермальному соединению клеток воспаления [21], которые впоследствии участвуют в разрушении базальной мембраны эпидермиса.

Таким образом установлено, что КК и другие эндопротеазы, обладающие БАЭЭ-эстеразной активностью, участвуют в формировании пузырного поражения кожи.

Для выяснения индуцирующего воздействия активных агентов калликреин-кининовой системы на межклеточное и эпидермо-дермальное разъединение кожи в экспериментах на гвинейских свинках было изучено влияние различных природных и синтетических ингибиторов эндогенных флогогенов на цито- и гистологический потенциал пузырной жидкости больных ВП и БП.

Результаты I серии опытов показали, что возникновение клинических проявлений ВП у гвинейских свинок полностью предотвращалось добавлением в пузырную жидкость больных соевого ингибитора трипсина (5 мг/мл) и овомукоида (0,1 и 0,5 мг/мл), частично — контрикала (1 АТгЕ/мл) и ϵ -аминокапроновой кислоты (0,1 мг/мл). Дексаметазон в сверхфармакологической концентрации (2 мкг/мл) блокировал акантолиз у 4 из 10 животных. Простагландин E_2 (5 мкг/мл) не оказывал ингибирующего воздействия на индукцию проявлений ВП на коже животных.

В опытах с использованием пузырной жидкости больных БП были получены аналогичные результаты, за исключением обнаруженного блокирующего действия простагландина E_2 (1 и 5 мкг/мл) на эпидермо-дермальное разъединение.

Результаты II серии опытов показали, что системное применение контрикала и дексаметазона в терапевтических дозах полностью предотвращало развитие экспериментальных буллезных дерматозов. Как и в предыдущей серии опытов, ϵ -аминокапроновая кислота предупреждала развитие пузырных элементов лишь у меньшей половины животных в подгруппах с моделями ВП и БП. Пармидин не влиял на индуцирование ВП, но блокировал появление симптомов БП у 6 из 11 животных.

Результаты I серии экспериментов свидетельствуют о том, что ингибиторы сериновых протеиназ (соевый ингибитор трипсина и овомукоид) по сравнению с антипротеазным препаратом, обладающим широким спектром антипротеазной активности (контрикал), нестероидным противовоспалительным средством ϵ -аминокапроновой кислотой, глюкокортикоидом и простагландином E_2 , оказывают наиболее выраженное блокирующее действие на развитие акантолиза и эпидермо-

дермального разъединения при их введении в кожу гвинейских свинок совместно с пузырьной жидкостью больных ВП и БП. Сравнивая результаты I и II серии опытов, можно предположить, что цито- и гистологический потенциал пузырьной жидкости реализуется преимущественно сериновыми протеиназами, так как полностью нейтрализуется ингибиторами с узкой специфичностью. В то же время нельзя исключить, что в формировании пузырьного очага поражения, помимо сериновых протеиназ, участвуют и другие чувствительные к контрикалу и ϵ -аминокапроновой кислоте протеазы, деструктивное действие которых на клетки и ткани кожи проявляется вторично — в результате дегрануляции клеток воспаления, мигрировавших в кожу как в «шоковый» орган. Способность простагландина E_2 , внесенного в пузырьную жидкость больных БП, содержащую суспензию мононуклеаров, отменять эпидермо-дермальное разъединение у экспериментальных животных указывает на то, что возможным источником сериновых протеиназ, участвующих в разрушении базальной мембраны, являются эффекторные клетки иммунной системы, сенсibilизированные к антигену пемфигоида. Предпосылками для такого предположения стали сведения о супрессорном влиянии простагландина E_2 на киллерные клетки [20] и макрофаги [24], а также о том, что при нанесении летального удара по клеткам-мишеням на мембранах цитотоксических лимфоцитов появляются трипсиноподобные протеиназы, секретируемые этими эффекторными клетками. Одним из аспектов более эффективного действия дексаметазона при его системном применении в отличие от локального, возможно, является влияние препарата на продукцию α_2 -МГ и других белков острой фазы воспаления, оказывающих иммуносупрессивное действие [16].

Эта гипотеза в определенной мере была подтверждена в III серии опытов при исследовании компонентов калликреин-кининовой системы в плазме крови гвинейских свинок с эксперимен-

тальными буллезными дерматозами (табл. 2). Как видно, изменения в прекалликреин-калликреиновой системе на высоте развития пузырьных поражений кожи животных соответствовали таковым у больных ВП и БП. Снизился уровень активности ПКК и повышался уровень КК. Общая БАЭЭ-эстеразная активность плазмы крови также достоверно возрастала. Однако в отличие от больных пузырьными дерматозами у животных с индуцированными ВП и БП уровень α_1 -АТ и α_2 -МГ статистически не отличался от нормы. Все животные с экспериментальными ВП и БП погибли. Учитывая обнаруженные нами глубокие сдвиги равновесия между активностью эндопротеиназ и их ингибиторов в плазме крови подопытных животных, погибших на 10—12-й день после появления пузырей, можно предположить, что практически 100 % смертность больных ВП и БП в «докортикостероидную эру» [12] в определенной степени могла зависеть от некупирующегося протеолитического «взрыва», возникающего в организме таких больных. Исходя из того что функции α_1 -АТ при воспалении обусловлены образованием неактивного комплекса с протеиназами гранулоцитов [7], можно допустить, что в патогенезе аутоиммунных буллезных дерматозов также принимают участие протеолитические ферменты, экскретируемые клетками воспаления, мигрирующими в очаг пузырьного воспаления.

Состояние калликреин-кининовой системы у животных с ВП и БП, получавших системную терапию, резко отличалось от такового у нелеченых (см. табл. 2). Применение контрикала и ϵ -аминокапроновой кислоты способствовало нормализации показателей активности прекалликреин-калликреиновой системы у экспериментальных животных. Как показали исследования, пероральное применение пармидина в дозе 30 мг/г в сутки в сочетании с наружным в виде 5 % мази, которую наносили на эрозии, образовавшиеся после вскрытия пузырей, оказывало выра-

Таблица 2

Активность калликреин-кининовой системы в плазме крови гвинейских свинок с экспериментальными буллезными дерматозами ($M \pm m$)

Условия опыта	ПКК	КК	Общая БАЭЭ-эстеразная активность	α_1 -АТ	α_2 -МГ	Кининаза I, мг/мл
	мг/мл			ИЕ/мл		
Интактные животные (18)	200,8 \pm 24,9	6,7 \pm 0,9	212,4 \pm 29,3	32,6 \pm 4,8	4,8 \pm 0,6	277,8 \pm 36,6
Экспериментальные животные, не получающие лечения:						
ВП (15)	19,4 \pm 3,8*	388,4 \pm 66,3*	628,9 \pm 72,6*	37,3 \pm 5,9	6,1 \pm 1,2	225,4 \pm 34,8
БП (12)	44,6 \pm 7,3*	246,3 \pm 34,5*	599,4 \pm 66,8*	30,6 \pm 2,8	5,0 \pm 0,9	381,4 \pm 30,0*
Животные, получающие контрикал, 1 АТгЕ/г в сутки:						
ВП (9)	185,1 \pm 21,2	10,5 \pm 3,1	246,2 \pm 31,0	28,7 \pm 2,9	3,9 \pm 0,5	273,4 \pm 29,6
БП (10)	173,6 \pm 34,9	8,2 \pm 1,6	217,3 \pm 22,6	31,9 \pm 4,6	4,2 \pm 0,7	292,6 \pm 31,4
ϵ -аминокапроновая кислота, 0,2 мг/г в сутки:						
ВП (10)	166,8 \pm 19,7	17,8 \pm 3,4*	279,6 \pm 42,7	34,8 \pm 5,1	5,1 \pm 0,4	305,8 \pm 44,8
БП (9)	212,4 \pm 19,7	11,6 \pm 3,8	261,8 \pm 35,2	30,2 \pm 3,3	4,0 \pm 0,2	274,9 \pm 33,6
дексаметазон, 0,2 мг/г в сутки:						
ВП (10)	206,5 \pm 48,4	8,8 \pm 0,6	254,8 \pm 26,5	25,7 \pm 5,9	6,9 \pm 0,4*	266,5 \pm 35,4
БП (11)	248,9 \pm 31,7	5,9 \pm 0,3	202,3 \pm 19,6	36,5 \pm 3,2	7,4 \pm 0,8*	285,7 \pm 22,7
пармидин перорально 30 мг/г в сутки + наружно 5 % мазь:						
ВП (12)	109,7 \pm 12,9*	108,7 \pm 9,3*	321,7 \pm 45,8*	34,7 \pm 4,2	5,3 \pm 0,6	394,7 \pm 33,8*
БП (11)	162,4 \pm 28,8	64,9 \pm 7,3*	264,7 \pm 31,4	31,8 \pm 2,9	4,7 \pm 0,3	401,4 \pm 27,6*

Примечание. Звездочка — $p < 0,05$, остальные — $p > 0,05$; в скобках — число животных.

женное терапевтическое действие лишь у животных с экспериментальными БП. В отличие от гвинейских свинок с индуцированной ВП, которые, несмотря на системное и наружное применение пармидина, погибали в 100 % случаев, 8 из 11 животных с проявлениями БП остались живы, а у 3 из 8 выживших наблюдалась реэпителизация эрозий. В результате применения пармидина в большей степени изменялась кининазная активность и в меньшей — активность трипсиноподобных ферментов плазмы крови. Полученные результаты являются косвенным подтверждением участия активных кининов в патогенезе БП.

Полученные результаты позволяют сделать следующие выводы. 1. Нарушение равновесия между ферментативными и ингибиторными процессами в калликреин-кининовой системе при ВП и БП характеризуется повышением активности калликреина и других сериновых протеиназ, с одной стороны, и снижением уровня их ингибиторов — с другой. 2. Соевый ингибитор трипсина и овомукоид полностью блокируют цито- и гистолитический потенциал пузырьной жидкости больных ВП и БП; ϵ -аминокапроновая кислота и контрикал предотвращают появление пузырных высыпаний на коже лабораторных животных и нормализуют активность ирекалликреин-калликреиновой системы, а дексаметазон, кроме того, увеличивает уровень α_2 -МГ в плазме крови гвинейских свинок. 3. При пемфигоиде в отличие от пузырьчатки источником сериновых протеиназ, вызывающих эпидермо-дермальное разъединение, являются мононуклеары, мигрирующие в кожу больных. В повреждении базальной мембраны также могут участвовать активные кинины, чувствительные к пармидину. 4. Обнаруженные особенности нарушения состояния калликреин-кининовой системы при пузырьчатке и пемфигоиде указывают на целесообразность применения антипротеазных препаратов в дополнение к глюкокортикоидам всем больным аутоиммунными буллезными дерматозами. Больным БП также необходимо проводить антикининовую терапию пармидином.

ЛИТЕРАТУРА

1. Веремеенко К. Н., Голобородько О. П., Кизим А. И. Протеолиз в норме и при патологии.— Киев, 1988.
2. Гаврилов С. В. Циркуляция в организме и диагностическое значение комплекса «Вирус гриппа А—антитело»: Автореф. дис. ... канд. мед. наук.— Киев, 1982.
3. Гребенников В. А. // Вестн. дерматол.— 1982.— № 10.— С. 46—49.
4. Зильбер Л. А. Иммунохимический анализ.— М., 1968.
5. Машковский М. Д. Лекарственные средства.— М., 1988.— Т. 1.
6. Нартикова В. Ф., Пасхина Т. С. // Вопр. мед. химии.— 1979.— № 4.— С. 494—499.
7. Оглобина О. Г. // Там же.— 1984.— № 1.— С. 3—13.
8. Пасхина Т. С., Кринская А. В. // Там же.— 1974.— № 6.— С. 660—663.
9. Пасхина Т. С., Кринская А. В. // Современные методы в биохимии.— М., 1977.— С. 157—163.
10. Пасхина Т. С., Яровая Г. А., Лауфер А. Л. и др. // Вопр. мед. химии.— 1970.— № 2.— С. 152—161.
11. Сыновец А. С., Левицкий А. П. Ингибиторы протеолитических ферментов в медицине.— Киев, 1985.
12. Горсуев Н. А., Шеклаков П. Д., Романенко В. Н. Буллезные дерматозы.— М., 1979.
13. Тринус Ф. П., Мохорт Н. А., Клебанов Б. М. Нестероидные противовоспалительные средства.— Киев, 1975.
14. Anhalt G. J., Patel H. P., Labib R. S., Proud D. // J. Immunol.— 1986.— Vol. 136.— P. 113—117.
15. Brown J. M., Chambers D. A. // Clin. Res.— 1982.— Vol. 30.— P. 578.
16. Dickinson A. M., Shenton B. K., Alomran A. H. et al. // Clin. Immunol. Immunopath.— 1985.— Vol. 36.— P. 259—260.
17. Emeis J. J., van den Hoogen C. M., van Hinsberg V. W. M. // Progress in Fibrinolysis.— Edinburgh, 1985.— Vol. III.— P. 167.
18. Fabbri P., Lotti T., Panconesi E. // Int. J. Derm.— 1985.— Vol. 24.— P. 422—425.
19. Folk I. E., Peiz K. A., Carnoll W. R. et al. // J. biol. Chem.— 1960.— Vol. 235.— P. 2272—2277.
20. Gatti G., Cavello R., Sartofì M. L. et al. // Immunopharmacology.— 1986.— Vol. 11.— P. 119—128.
21. Germain L., Barabe J., Galeano C. // J. Neuroimmunol.— 1986.— Vol. 13.— P. 135—142.
22. Granelli-Piperno A., Vassalli J.-D., Reich E. // J. exp. Med.— 1977.— Vol. 146.— P. 1693—1697.
23. Hirata Y. // Fukuoka Acta med.— 1985.— Vol. 76.— P. 365—375.
24. Meerpohl H. G., Bauknecht T. // Prostaglandins.— 1986.— Vol. 31.— P. 961—972.
25. Mogovero H. S. Jr., Meier H. S., Newball H. H. et al. // Clin. Res.— 1982.— Vol. 30.— P. 596.
26. Naito K., Morioka S., Ogawa H. // J. invest. Derm.— 1982.— Vol. 79.— P. 303—306.
27. Panconesi E., Fabbri P., Lotti T. et al. // Ital. Gen. Rev. Derm.— 1982.— Vol. 19.— P. 19—28.
28. Singer K. H. // Ann. Rev. Immunol.— 1985.— Vol. 3.— P. 87—108.
29. Woo T. Y., Hogan V. A., Patel H. P. et al. // J. invest. Derm.— 1983.— Vol. 81.— P. 115s—121s.

Поступила 04.04.89

ROLE OF THE KALLIKREIN-KININ SYSTEM COMPONENTS IN PATHOGENESIS OF BULLOUS SKIN INJURIES UNDER CONDITIONS OF PEMPHIGUS AND PEMPHIGOID

S. A. Grando, B. T. Glukhenky, A. P. Kostromin, Yu. Ya. Boiko, N. S. Kulsenko, T. A. Korostash

Chair of Dermato-Venerology, Institute for Postgraduate Training of Physicians, Kiev

Importance of kallikreinogenases in acantholysis and epidermo-dermal separation was shown, when the kallikrein-kinin patterns were studied in blood plasma and blister fluids of 118 patients with pemphigus, of 78 patients with pemphigoid as well as of 224 guinea pigs. Under conditions of pemphigoid, as distinct from pemphigus, serine proteinases were mainly produced by active immunocytes responsible for destruction of epidermal basement membrane; activation of kinins was observed in skin impairments.

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 1990

УДК 579.871.1:579.222.3:577.152.3141.083.1

Д. В. Юсупова, Г. П. Бенинг, Р. Б. Соколова, Р. В. Федоров

ДЕЗОКСИРИБОНУКЛЕАЗА ДИФТЕРИЙНЫХ БАКТЕРИЙ: ДИНАМИКА ОБРАЗОВАНИЯ И НЕКОТОРЫЕ СВОЙСТВА

Казанский университет, Казанский институт усовершенствования врачей

В 1963 г. в культуральной жидкости токсигенных дифтерийных бактерий обнаружен фермент, деградирующий ДНК — дезоксирибонуклеаза (ДНКаз). Описаны некоторые свойства фермента, частично очищенного фракционированием сульфатом аммония [1, 6].

Цель настоящей работы — изучение динамики биосинтеза ДНКазы дифтерийными бактериями по

фазам роста клеточной популяции, разработка метода очистки фермента и изучение его свойств.

Методика

В работе использовали штамм *Corynebacterium diphtheriae* PW-8 Массачусетс. Бактерии выращивали на среде триптического переваривания с энтерокиназой pH 8,2—8,4. Глубинное выращивание проводили в 15-литровом ферментере с 7,5 л питательной среды при постоянном перемешивании (1500 об/мин) с аэрацией (1,5 л воздуха в минуту) при температуре 35 °С. Пробы отбирали через определенные интервалы времени в процессе выращивания. В каждой пробе определяли количество микробных клеток по оптическому стандарту мутности. В надосадочной жидкости после удаления клеток определяли ДНКазную, РНКазную, фосфодиэстеразную (ФДЭазную), фосфомоноэстеразную (ФМЭазную) активность, pH и содержание белка. ДНКазную активность определяли в микровискозиметре Оствальда и по продуктам гидролиза высокополимерной ДНК, растворимым в 2 % HClO₄ [2]. Реакционная смесь объемом 1 мл содержала 1 мг ДНК, 0,05 М трис-HCl-буфер pH 7,5, 0,007 М MgSO₄ и 0,1 мл ферментной фракции, при необходимости предварительно разведенной таким образом, чтобы наблюдалась прямая зависимость скорости превращения субстрата от концентрации фермента. Реакционную смесь инкубировали 15—30 мин при 37 °С. Реакцию останавливали добавлением 4 % раствора охлажденной HClO₄ в объеме, равном объему реакционной смеси. Кислоторастворимый материал удаляли центрифугированием на холоде при 6000 g в течение 20—30 мин. В надосадочной жидкости после разведения в 10—20 раз измеряли оптическое поглощение при 260 nm на спектрофотометре СФ-16. За единицу активности принимали количество фермента, которое дает природ оптической плотности в опытных образцах по сравнению с контрольными (реакционная смесь без фермента) на 1 опт. ед. за 1 ч инкубации в пересчете на 1 мл ферментной фракции (F₂₆₀, ед·мл⁻¹·ч).

РНКазную активность определяли по накоплению кислоторастворимых продуктов гидролиза РНК. Состав реакционной смеси и условия те же, что и при определении ДНКазной активности. ФДЭазную и ФМЭазную активность определяли по действию на модельные субстраты бис-*n*-нитрофенилфосфат кальция и *n*-нитрофенилфосфат натрия соответственно [7]. Состав реакционной смеси: 0,75 мл 0,2 % раствора субстрата в 0,2 М трис-HCl-буфере pH 8,6, содержащем 0,02 MgCl₂, 0,25 мл исследуемого материала. Реакцию останавливали добавлением 2 мл 0,4 н. NaOH, оптическое поглощение измеряли при 400 nm. За единицу активности принимали количество фермента, катализирующее отщепление 1 мкМ *n*-нитрофенола за 1 ч при 37 °С.

Белок во фракциях, полученных после хроматографии, определяли по оптическому поглощению при 280 nm в 1-сантиметровой кювете спектрофотометра СФ-16 (за единицу белка принимали оптическое поглощение раствора, равное единице при E₂₈₀), в других случаях — по Лоури [8].

Удельную скорость роста бактерий (μ) вычисляли по формуле [5]:

$$\mu = \frac{dm}{dt} \cdot \frac{1}{m},$$

где m — число клеток, t — время (в ч). Удельную скорость синтеза ДНКазы (ϵ) вычисляли по формуле:

$$\epsilon = \frac{dA}{dt} \cdot \frac{1}{A},$$

где A — величина активности фермента, рассчитанная на микробную клетку.

Для получения фермента использовали культуральную жидкость, полученную на 24-й час выращивания в ферментере штамма PW-8 Массачусетс. Предварительно с помощью метода Дерриена была определена та степень насыщения культуральной жидкости сульфатом аммония, при которой происходит наиболее полное осаждение ДНКазы и достигается предварительная очистка от балластных белков. Клетки удаляли фильтрованием через бумажный фильтр, надосадочную жидкость фракционировали сульфатом аммония до степени насыщения 0,70 на холоде. Через 24 ч центрифугировали при 3000 g в течение 20 мин, маточный раствор отбрасывали, а осадок обрабатывали при комнатной температуре дважды следующим образом: тщательно размешивали с насыщенным до 0,40 раствором сульфата аммония pH 8,0 (из расчета 10 мл на 1 г белка осадка) и центрифугировали при 2500 g в течение 20 мин. Надосадочную жидкость отбрасывали. Затем осадок

размешивали с 20 мл раствора сернистого аммония с насыщением 0,30 (pH 8,0), центрифугировали при 8500 g в течение 30 мин и надосадочную жидкость собирали — в ней сосредоточена ДНКазы. Белки осаждали доведением надосадочной жидкости насыщенным раствором сульфата аммония pH 8,0 до насыщения 0,50 и собирали центрифугированием при 8500 g в течение 20 мин. Осадок, полученный таким образом, максимально осаждали с помощью фильтровальной бумаги от излишка маточного раствора и растворяли в 2 мл 0,05 М трис-HCl-буфера pH 7,5. Для дальнейшей очистки ДНКазы использовали сефадекс G-75 средний и ДЭАЭ-сефадекс А-25 средний.

Сухой препарат сефадекса G-75 оставляли при комнатной температуре в воде на 24 ч для полного набухания геля, уравнивали 0,1 М раствором сульфата аммония в 0,05 М трис-HCl-буфере pH 7,5 и помещали в колонку размером 2,5×45,4 см, затем настилали 1,8 мл ферментного раствора в 0,1 М (NH₄)₂SO₄, содержащем 0,05 М трис-HCl-буфер pH 7,5. Элюцию проводили тем же раствором. Фракции собирали с помощью автоматического коллектора со скоростью 39 мл/ч при комнатной температуре.

Фракцию с ДНКазной активностью после сефадекса G-75 сразу наносили на колонку с сефадексом А-25. До заполнения колонки сефадекс обрабатывали 15 объемами 0,5 н. HCl в течение 30 мин, затем дистиллированной водой до pH 4,0—5,0, 0,5 н. NaOH и снова дистиллированной водой до нейтральной реакции и уравнивали 0,04 М трис-HCl-буфером pH 7,5. Уравновешенным сефадексом А-25 заполняли колонку размером 1×30 см и наносили на нее фракцию после гель-фильтрации на сефадексе G-75, не допуская нагрузки колонки более 300 опт. ед. поглощающего при 280 nm материала. Элюцию проводили в линейном градиенте концентрации (NH₄)₂SO₄: резервуар — 300 мл 0,2 М (NH₄)₂SO₄ в растворе 0,04 М трис-HCl-буфера pH 7,5; смеситель — 300 мл 0,04 М трис-HCl-буфера pH 7,5. Скорость элюции 20 мл/ч при температуре 4 °С.

Представление о характере действия фермента дает количественная и качественная оценка продуктов глубокого ферментного гидролиза нуклеиновых кислот. Реакционную смесь, содержащую ДНК — 1 мг/л, трис-HCl-буфер pH 7,5—0,032 М, MgCl₂ — 0,007 М, ДНКазу — 0,01 ед/мл, инкубировали при 37 °С в течение 24 ч. Конец реакции устанавливали по прекращению прироста оптического поглощения кислоторастворимых продуктов при E₂₆₀. Затем для денатурации белков и прекращения действия ферментов к реакционной смеси добавляли смесь хлороформа и изоамилового спирта (9:1), встряхивали на холоде в течение 1 ч, центрифугировали при 10 000 g в течение 20 мин и собирали верхний водный слой, содержащий продукты гидролиза: смесь олигонуклеотидов разной длины. Анализ гидролизата начинали с фракционирования его на олигонуклеотиды, однородные по длине цепи по методу Томлинсона и Тенера [9]. Поскольку 7 М мочевины почти полностью исключает вторичное взаимодействие гетероциклов с монообменником, преобладающее взаимодействие, от которого зависит последующая элюция, — это сорбция за счет отрицательно заряженных фосфатных групп нуклеотидов. Поэтому разделение происходит строго в зависимости от числа фосфатных групп олигонуклеотидов.

Порцию гидролизата, содержащую 100—200 опт. ед. (при 260 nm) нуклеотидного материала, разбавляли до 200 мл 7 М раствором мочевины, содержащим 0,005 М трис-HCl-буфер pH 7,5, наносили на колонку с сефадексом А-25 размером 0,8×20 см. Элюирование проводили в линейном градиенте концентрации NaCl со скоростью 28 мл/ч при комнатной температуре. Смеситель содержал 500 мл 0,005 М трис-HCl-буфера в 7 М мочевины pH 7,5, резервуар 500 мл того же раствора, содержащего 0,3 М NaCl. Оптическую плотность в каждой фракции измеряли при 260 nm на СФ-16 в 1-сантиметровой кювете против исходного буферного раствора. Во фракциях с максимальной плотностью снимали спектры в области 225—325 см в интервалом 5 nm и по полученным спектрам оценивали состав оснований во фракциях, сравнивая со спектром исходного гидролизата в 7 М мочевины.

Место атаки фосфодиэфирных связей ДНКазой устанавливали по положению концевого фосфата в продуктах ферментативного гидролиза ДНК. Для этого моно- и динуклеотидные фракции гидролизатов обрабатывали после обессушивания по Рушицкому и соавт. [10] фосфатазой *E. coli* и 5'-нуклеотидазой ядра гюрзы в присутствии 0,5 М глицина. В этих условиях происходит отщепление концевого неорганического фосфата (Ф_n). Количественное содержание Ф_n определяли по методу Лоури и Лопеца [8].

В работе использовали препараты ДНК, выделенные из тимуса телянка по методу Кэя в модификации Бенинга [3], дрожжевую РНК — препарат суммарной РНК после очистки

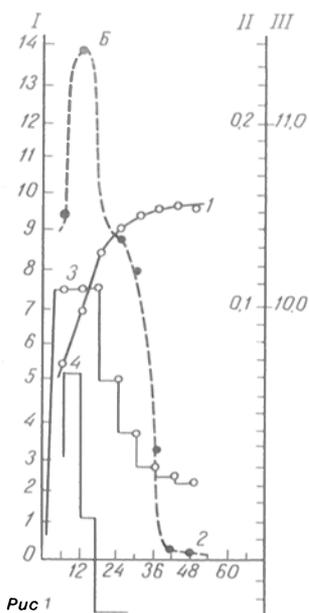


Рис 1

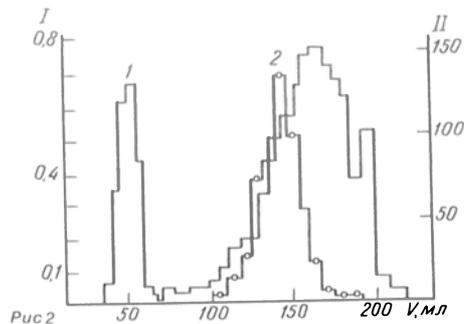


Рис 2

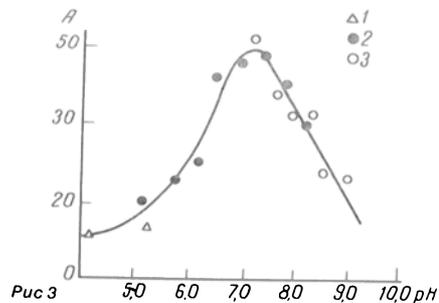


Рис 3

Рис. 1. Кинетика роста и синтеза ДНКазы у дифтерийных бактерий в условиях глубинного выращивания.

1 — lg числа клеток; 2 — активность ДНКазы (в ед. · 10⁻⁹ микробных клеток); 3 — удельная скорость роста культуры (μ); 4 — удельная скорость синтеза ДНКазы (ε). По оси ординат: I — активность ДНКазы (в виск. ед. · 10⁻⁹ микробных клеток); II — удельная скорость роста (μ · ч⁻¹); удельная скорость синтеза ДНКазы (ε · ч⁻¹); III — lg числа клеток, по оси абсциссе — время выращивания (в ч).

Рис. 2. Разделение ДНКазы дифтерийных бактерий на колонке с сефадексом G-75.

I — белок; 2 — ДНКазы. По оси ординат: I — оптическая плотность при E₂₈₀; II — активность ДНКазы (в виск. ед. · мл⁻¹); по оси абсциссе — элюиционный объем (в мл).

Рис. 3. Зависимость активности ДНКазы от pH.

1 — ацетатный буфер; 2 — трис-малеатный буфер; 3 — трис-HCl-буфер.

от низкомолекулярных примесей на сефадексе G-75, натриевую соль *n*-нитрофенилфосфата — препарат фирмы «Feinchemie K.-H. Kallies K. G.», модельный субстрат бис-*n*-нитрофенилфосфат кальция, синтезированный по методу Йошида [7], сефадексы G-75 средний, ДЭАЭ-сефадекс А-25 средний фирмы «Фармация» (Швеция).

Результаты и обсуждение

Исследования показали, что в процессе роста дифтерийных бактерий штамм RW-8 Массачусетс в культуральной жидкости накапливается ДНКаза. РНКазная, ФМЭазная и ФДЭазная активность не обнаруживается.

Изучение динамики биосинтеза ДНКазы по фазам роста клеточной популяции дифтерийных бактерий свидетельствовало, что в условиях глубинного выращивания в ферментере наиболее высокая удельная скорость синтеза ДНКазы наблюдается в период максимальной удельной скорости роста культуры, в экспоненциальную фазу роста (рис. 1).

ДНКазы, обнаруженная в культуральной жидкости, была подвергнута очистке по трехэтапной

схеме. На первом этапе культуральную жидкость фракционировали сульфатом аммония, что позволило добиться 7-кратной очистки фермента. Дальнейшая очистка (второй этап) проводилась на колонке с сефадексом G-75. Результаты разделения представлены на рис. 2. Как видно, ДНКазы элюируются вместе с низкомолекулярными белками в элюиционном объеме 150 мл и отделяется от основной массы высокомолекулярных белков (элюиционный объем 56 мл). Третий этап очистки (хроматография на сефадексе А-25) позволяет разделить ДНКазу от остальных белков в силу разницы в сродстве к анионообменнику и добиться очистки ДНКазы в 500 раз при удельной активности 1500 ед. на 1 мг белка. Фракции с максимальной активностью ДНКазы объединяли и использовали для изучения свойств фермента, так как они не содержали РНКазной, ФДЭазной и ФМЭазной активности.

Изучение некоторых свойств фермента и условий его действия показало, что они не отличаются от установленных ранее [1] для сульфат-аммонийной фракции фермента.

Как видно на рис. 3, максимальная активность ДНКазы наблюдается при pH 7,0—7,4. Результаты изучения влияния некоторых двухвалентных ионов металлов на активность ДНКазы при pH 7,4 с 0,04 М трис-малеатным буфером представлены в таблице, из которой видно, что в отсутствие двухвалентных ионов металлов ДНКазы очень медленно деполимеризует ДНК. Эта остаточная активность полностью подавляется ЭДТА.

Специфичность по отношению к вторичной структуре ДНК определяли, сравнивая динамику гидролиза ДНКазой нативной и денатурированной нагреванием ДНК. Показано, что накопление кислоторастворимого материала в пробе с денатурированной теплом ДНК происходит в 1,5 раза быстрее, чем с нативной ДНК. Следовательно, ДНКазы проявляет несколько большую специфичность к денатурированной ДНК. Характер действия ДНКазы на субстрат изучали, сравнивая кинетику падения вязкости раствора ДНК с на-

Активность ДНКазы *Cog. diphtheria* в присутствии различных активаторов и ингибиторов

Исследуемые соединения	Концентрация, М	Активность, ед./мл
Контроль	—	2,4
ЭДТА	0,005	0
MgSO ₄	0,0075	52
MgCl ₂	0,005	28
MnSO ₄	0,005	26
MgSO ₄ +ЭДТА	0,005+0,002	18
MgSO ₄ +ЭДТА	0,005+0,01	0
CoCl ₂	0,005	21
FeSO ₄	0,0015	11
ZnSO ₄	0,005	1,4
NiSO ₄	0,005	0
CaCl ₂	0,005	0
CuSO ₄	0,005	0
MgSO ₄ +CuSO ₄	0,005+0,005	3,0
MgSO ₄ +цитрат Na	0,005+0,03	0
MgSO ₄ +H ₃ PO ₃	0,005+0,4	29

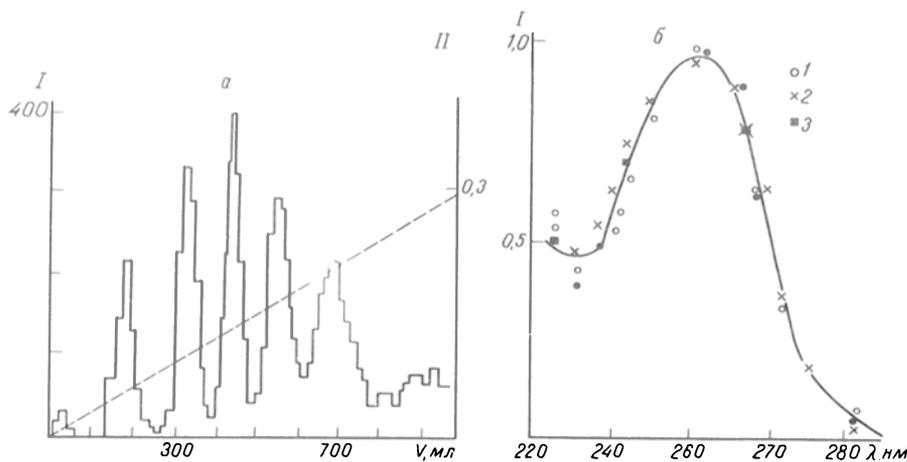


Рис. 4. Хроматографическое разделение продуктов ферментного гидролиза ДНК по методу Томлинсона и Тенера и спектры поглощения исходной ДНК и фракций гидролизата после разделения.

1 — мононуклеотиды; 2 — динуклеотиды; 3 — тринуклеотиды. По оси ординат: I — оптическое поглощение при 260 нм; II — концентрация NaCl (в М); по оси абсцисс: а — элюционный объем (в мл); б — длина волны (в нм).

коплением кислоторастворимого материала, состоящего из коротких нуклеотидов. Резкое снижение вязкости раствора ДНК почти до вязкости растворителя сопровождается лишь незначительным освобождением кислоторастворимых продуктов. При снижении вязкости ДНК вдвое образуется около 0,5 % кислоторастворимых нуклеотидов, что говорит о типичном эндонуклеолитическом характере действия изучаемой ДНКазы.

При фракционировании продуктов гидролиза ДНК на колонке с сефадексом А-25 (рис. 4) установили, что гидролизат представляет собой смесь олигонуклеотидов. Нуклеотидные фракции были идентифицированы по концентрации элюирующего раствора и по соотношению концевой фосфат/общий фосфат. Распределение фракций гидролизата по степени полимерности было следующим: мононуклеотиды — 6,6 %, динуклеотиды — 10,8 %, три-, тетра-, пента-, гекса- и более полимерные олигонуклеотиды 16,6, 16,9, 16,9, 11,9 и 20,3 % соответственно.

Для установления механизма гидролиза двуспиральной ДНК ДНКазой проводили сопоставление кривых динамики снижения вязкости растворов ДНК и динамики накопления кислоторастворимых продуктов гидролиза под действием исследуемого фермента и ферментов с известным механизмом ферментативной атаки: панкреатической ДНКазы

(двуударный механизм атаки), селезеночной ДНКазы (одноударный механизм). Условия реакции и состав реакционной смеси те же, что указаны для определения ДНКазной активности вискозиметрическим методом и по продуктам гидролиза ДНК. Измерение вязкости ДНК проводили при 37 °С в течение 1 ч каждые 5 мин. Накопление кислоторастворимого материала в процессе ферментативного гидролиза ДНК определяли одновременно с вискозиметрией в реакционной смеси того же состава и при тех же условиях: через 5 мин отбирали по 1 мл инкубируемой смеси, осаждали охлажденной HClO₄ и дальнейшее определение проводили, как описано выше. Ферментный раствор добавляли в реакционную смесь в таком разведении, чтобы обеспечить равномерное снижение вязкости раствора ДНК до вязкости, близкой к вязкости растворителя (время истечения воды 7—8 с), в течение 1 ч. Представленные на рис. 5 экспериментальные данные свидетельствуют об одноударном механизме атаки ДНК ДНКазой дифтерийных бактерий. Распределение разрывов цепи ДНК рассчитывали по статистическим формулам [4], исходя из количества олигонуклеотидов разной степени полимерности.

Количество моно- и динуклеотидов, которое согласно статистическому распределению разрывов может быть образовано при данной глубине гидролиза (сумма мольных долей 26,8 %), в 1,3 и 1,1 раза превосходит действительно образованное количество. Начиная с тринуклеотидов экспериментально найденная доля олигонуклеотидов несколько больше теоретически рассчитанной. Это позволяет сделать заключение, что ДНКазы дифтерийных бактерий обладает строго эндонуклеолитическим типом атаки ДНК и вероятность разрывов в середине полинуклеотидной цепи значительно выше, чем у ее края.

Для установления места атаки фосфодиэфирных связей ДНК материал мононуклеотидной и динуклеотидной фракции гидролизатов ДНК ДНКазой дифтерийных бактерий обрабатывали 5'-нуклеотидазой яда гюрзы в присутствии 0,5 М глицина. В этих условиях должен отщепиться только 5'-концевой неорганический фосфат. В опыте он был обнаружен в количестве 0,83 мкМ в моно- и 0,59 мкМ в динуклеотидной фракции гидролизата. То обстоятельство, что 5'-нуклеотидаза яда гюрзы количественно освобождает фосфат из мононуклеотидов и концевой фосфат из динуклео-

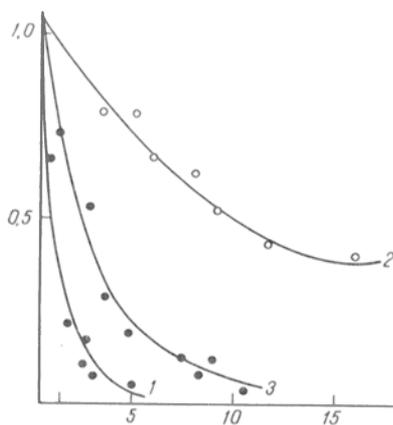


Рис. 5. Изменение вязкости раствора ДНК относительно количества кислоторастворимых продуктов гидролиза под действием ДНКазы дифтерийных бактерий (1), панкреатической ДНКазы (2), селезеночной ДНКазы (3).

По оси ординат — относительная вязкость (P_2/P_1); по оси абсцисс — содержание кислоторастворимых продуктов (в %).

тидов, свидетельствует о том, что ДНКазы производят разрыв фосфодиэфирной связи у третьего углеродного атома дезоксирибозного кольца и продукты гидролиза ДНК ДНКазой имеют концевой фосфат в 5'-положении.

Для установления специфичности к химической природе оснований, прилегающих к атакуемой фосфодиэфирной связи, анализировали моно-, ди- и тринуклеотидные фракции гидролизата ДНК. Для указанных фракций и исходного гидролизата ДНК были сняты спектры поглощения при длинах волн от 220 до 325 нм (см. рис. 4). Видно, что спектры нуклеотидных фракций незначительно отличаются как друг от друга, так и от спектра исходного гидролизата в области длин волн короче 250 нм и практически совпадают в более длинноволновой области. Это говорит о сходстве состава оснований во всех указанных фракциях и в гидролизате. Следовательно, ДНКазы дифтерийных бактерий не обладают заметно выраженной специфичностью к природе оснований, соседних с разрываемой фосфодиэфирной связью.

Таким образом, *Corynebacterium diphtheriae* PW-8 выделяет в культуральную жидкость лишь один нуклеолитический фермент — ДНКазу эндонуклеолитического типа. ЭкзоДНКазы, РНКазы, ФДЭазы и ФМЭазы в культуральной жидкости не обнаруживаются. ДНКазы синтезируются клетками в экспоненциальную фазу роста. По свойствам фермент относится к типичным нейтрально-щелочным ДНКазам (оптимум pH около 7,5, абсолютная потребность в Mg^{2+} , одноударный механизм атаки субстрата). ДНКазы дифтерийных бактерий катализируют реакцию гидролиза фосфодиэфирных связей между фосфором и третьим углеродным атомом в кольце дезоксирибозы нативной или денатурированной ДНК, причем глубина гидролиза достигает 30—35 % всех фосфодиэфирных связей ДНК.

Другие эфиры фосфорной кислоты, в том числе РНК, устойчивы к действию фермента. ДНКазы характеризуются приблизительно статистическим распределением разрывов фосфодиэфирных связей при повышенной устойчивости концевых участков молекулы, отсутствием выраженной специфичности к природе оснований, прилегающих к разрываемой связи, образованием 5'-концевых фосфатных групп и несколько большим предпочтением к денатурированной ДНК.

ЛИТЕРАТУРА

1. Бенинг Г. П., Мессина О. В., Юсупова Д. В. // Биохимия. — 1964. — Т. 29, № 2. — С. 241—245.
2. Бенинг Г. П. // Учен. записки Казан. ун-та. — 1964. — Т. 124, кн. 1. — С. 17—23.
3. Бенинг Г. П. // Бактериальные нуклеазы и их действие на ооухольевый рост. — Казань, 1969. — С. 226—231.
4. Бенинг Г. П. Исследование биохимических свойств экстрацеллюлярной дезоксирибонуклеазы *Corynebacterium diphtheriae*: Автореф. дис. ... канд. наук. — Казань, 1968.
5. Иерусалимский Н. Д. Основы физиологии микробов. — М., 1963.
6. Мессина О. В., Юсупова Д. В., Шамсутдинов Н. С. // Журн. микробиол. — 1963. — № 1. — С. 20—25.
7. Ioshida J. // J. Biochem. (Tokyo). — 1941. — Vol. 34. — P. 23—26.
8. Lowry H., Lopez L. // J. Biol. Chem. — 1946. — Vol. 162. — P. 421.
9. Tomlinson R., Tener G. // Biochemistry (Wash.). — 1963. — Vol. 2. — P. 697—706.

10. Rushitsky L. W., Sober H. A. // Biochim. biophys. Acta. — 1962. — Vol. 55. — P. 217—306.

Поступила 13.04.89

DEOXYRIBONUCLEASE FROM CORYNEBACTERIUM DIPHThERIAE: DYNAMICS OF SYNTHESIS AND SOME PROPERTIES

D. V. Yusupova, G. P. Bening, R. B. Sokolova, R. V. Fedorov

Chair of Microbiology, State University, Chair of Microbiology, Institute for Postgraduate Training of Physicians, Kazan

Diphtheritic bacteria of PW-8 Massachusetts strain produced into cultural medium only one nucleotidase — endoDNAase. The enzyme was synthesized by the cells during the exponential phase of growth. The DNAase was purified 500-fold and exhibited properties specific to neutral-alkaline DNAases (pH optimum about 7.5, absolute requirements for Mg^{2+} , single-step mechanism of substrate hydrolysis). The following properties were typical for the enzyme: absence of distinct specificity to structure of bases surrounding the hydrolyzed bond, formation of 5'-end phosphate groups and slightly higher preference to denatured DNA.

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 1990

УДК 612.128+612.351.11:014.46:633.82

В. В. Николаевский, О. Ф. Юркова, И. К. Иванов, В. Г. Гержилова

ОСОБЕННОСТИ ВЛИЯНИЯ РАСТИТЕЛЬНЫХ АРОМАТИЧЕСКИХ ВЕЩЕСТВ НА АКТИВНОСТЬ НЕКОТОРЫХ ФЕРМЕНТОВ В КРОВИ И ПЕЧЕНИ КРЫС

НИИ физических методов лечения и медицинской климатологии им. И. М. Сеченова Минздрава УССР, Ялта

Установлено, что присутствующие в атмосфере растительные ароматические вещества (РАВ) устраняют нарушения сердечно-сосудистой, дыхательной, нервной систем, мобилизуют внимание, повышают работоспособность, способствуют повышению адаптационных возможностей организма и т. д. Нередко их используют для санации атмосферы помещений [5, 6, 11].

В последние годы повсеместно отмечается снижение концентрации РАВ в атмосфере, что негативно отражается на здоровье и работоспособности людей [4].

Несмотря на многочисленные публикации об использовании РАВ в медицине, механизм их действия до настоящего времени изучен недостаточно полно. Имеются предположения о воздействии растительных ароматических фракций на функционирование цитоплазматических мембран и процессы метаболизма [3]. Однако единого мнения по этому вопросу нет, что затрудняет целенаправленное использование РАВ при различных нарушениях регуляторных процессов.

Учитывая изложенное, мы исследовали действие РАВ на активность некоторых ферментов, участвующих в окислительно-восстановительных процессах.

Методика

Работа проведена на крысах-самцах линии Вистар. Исследованы 4 группы животных, находившихся в течение 3 мес в атмосфере с различным содержанием РАВ. Животные находились в атмосфере, лишенной РАВ, и в такой же атмосфере,

по с добавлением в нее эфирного масла монарды в дозе $0,58 \pm 0,05$ мг/м³ атм (природные концентрации). Контрольная группа животных содержалась в обычной атмосфере вивария. Условия содержания и пищевой режим животных во всех группах были стандартными.

В эритроцитах определяли активность глюкозо-6-фосфатдегидрогеназы (Г-6-ФДГ; КФ 1.1.1.49), лактатдегидрогеназы (ЛДГ; КФ 1.1.1.27), в плазме крови — ЛДГ, внемитохондриальной малакдегидрогеназы (МДГ; КФ 1.1.1.37), ацетилэстеразы (КФ 3.1.1.6), в гомогенате печени — Г-6-ФДГ, ЛДГ, МДГ, ацетилэстеразы. Навеску печени измельчали в стеклянном гомогенизаторе с охлажденным физиологическим раствором в соотношении 1:4. Гомогенат центрифугировали 20 мин при 7000 об/мин. Активность ферментов определяли в надосадочной жидкости. Гепаринизированную кровь (50 ЕД гепарина на 1 мл крови) центрифугировали в течение 10 мин при 1500 об/мин. Из эритроцитной массы, дважды отмытой от плазмы крови физиологическим раствором, готовили гемолизат в соотношении 1:25.

Активность Г-6-ФДГ определяли по методу А. Kornberg и В. Ноггескег в модификации [2]. В кювету объемом 3 мл вносили 0,1 мл 0,1 М MgCl₂, 0,2 мл $1,5 \cdot 10^{-3}$ М НАДФ (фирма «Реанал»), 0,2 мл 0,02 М раствора глюкозо-6-фосфата (натриевая соль), 0,05 мл источника фермента. Объем смеси доводили до 3 мл 0,05 М трис-буфером pH 7,6. Отсчет оптической плотности проводили на спектрофотометре «Спектропот-195» (ВНР) при 340 нм в течение 5 мин с интервалом 1 мин. В качестве контроля использовали реакционную смесь того же состава с заменой субстрата реакции дистиллированной водой.

Активность ЛДГ определяли по методу [7]. Исследуемая проба включала 0,1 мл 0,0015 М НАД·Н, 0,1 мл 0,01 М раствора пирувата натрия в ^{1/15} М фосфатном буфере pH 7,7, источник фермента 0,05 мл, общий объем 3 мл создавался внесением фосфатного буфера.

Активность внемитохондриальной МДГ определяли по методу [15]. Исследуемая проба содержала 0,1 мл 0,0015 М НАД·Н, 0,1 мл 0,0076 М щавелевоуксусной кислоты, 0,05 мл ферментного раствора. Объем смеси доводили до 3 мл фосфатным ^{1/15} М буфером pH 7,7.

Активность ацетилэстеразы определяли по методу [1] в нашей модификации. В кювету вносили 0,1 мл пара-нитрофенилацетата (1 мг на 1 мл этилового спирта) и источник фермента в количестве 0,03 мл. Общий объем доводили фосфатным ^{1/15} М буфером pH 7,7 до 3 мл. При расчете ферментативной активности учитывали увеличение оптической плотности реакционной смеси за счет аутогидролиза субстрата. Отсчет оптической плотности проводили при 400 нм в течение 5 мин с интервалом 1 мин. Активность ЛДГ, Г-6-ФДГ, МДГ выражали в микромолях на 1 мг белка или на 1 г гемоглобина, ацетилэстеразы — в единицах на 1 мг белка. Количество белка в пробах определяли по методу [14].

Результаты и обсуждение

Как видно из результатов исследований, представленных в таблице, у животных, находившихся в условиях атмосферы, лишенной РАВ, преобладали гликолитические процессы. Об этом свидетельствует увеличение в печени крыс активности ЛДГ — терминального фермента анаэробного метаболизма (от $23,3 \pm 3,6$ мкМ на 1 мг

белка у животных контрольной группы до $32,3 \pm 0,3$ мкМ на 1 мг белка в группе животных, содержащихся в атмосфере с дефицитом РАВ). По-видимому, НАД·Н, образующийся в процессе гликолиза, в основном используется для восстановления пирувата, на что также может указывать активация МДГ печени, которая катализирует реакцию окисления малата с образованием восстановленной формы пиридиннуклеотидного кофермента [13].

Подтверждением интенсификации анаэробных обменных процессов может служить также значительное увеличение в печени активности фермента пентозофосфатного пути окисления глюкозы — Г-6-ФДГ, основная роль которого состоит в поддержании окислительно-восстановительных процессов и генерировании НАДФ·Н, а также в защите эритроцитов от повреждающего действия свободных радикалов [10]. Эти изменения, по-видимому, направлены на поддержание окислительно-восстановительных реакций в условиях угнетения аэробного окисления за счет интенсификации других путей энергообразования.

На фоне угнетения аэробного метаболизма в условиях дефицита РАВ снижалась активность ЛДГ и Г-6-ФДГ в эритроцитах по сравнению с контрольными показателями ($p < 0,001$). Принимая во внимание зависимость метаболизма эритроцитов от состояния их мембран [10], можно предположить, что увеличение проницаемости эритроцитов в условиях атмосферы с отсутствием в ней РАВ является одной из причин снижения активности указанных ферментов. Возможно, также имеет место угнетение ферментативной активности за счет больших энергетических затрат для обеспечения нормальной функции эритроцитов [9].

Подтверждением предположения о дестабилизации мембранных структур является снижение в печени активности растворимого фермента микросом — ацетилэстеразы и увеличение содержания данной формы эстераз в плазме крови.

Сопоставление результатов исследований в группах животных, находившихся в атмосфере с различным содержанием РАВ, позволило выявить существенные различия в абсолютной величине ферментативной активности. Введение РАВ в воздушную среду способствовало нормализации ферментативных реакций. Летучие фракции эфирного масла монарды повышали активность Г-6-ФДГ эритроцитов и снижали актив-

Активность ферментов в эритроцитах, плазме крови и гомогенате печени крыс, находившихся в условиях различных газовых сред

Газовая среда	Г-6-ФДГ	Печень			Эритроциты		Плазма крови	
		ЛДГ	МДГ	ацетилэстераза, ед.	Г-6-ФДГ	ЛДГ	МДГ, мкМ	ацетилэстераза, ед.
Естественная атмосфера	$7,56 \pm 0,6$	$23,3 \pm 3,6$	$26,0 \pm 2,5$	$678,6 \pm 129$	$11,2 \pm 0,9$	$53,9 \pm 2,3$	$1,59 \pm 0,15$	$81,8 \pm 13,3$
Атмосфера без РАВ <i>p</i>	$11,5 \pm 0,8^*$ <0,001	$32,3 \pm 0,3$	$31,3 \pm 2,1$	$5562,7 \pm 137$	$7,5 \pm 0,87^*$ <0,01	$43,8 \pm 4,9$	$1,8 \pm 0,28$	$94,7 \pm 13,4$
Атмосфера с летучими фракциями эфирного масла монарды <i>p₁</i>	$7,25 \pm 1,2$ <0,02	$23,6 \pm 2,7$ <i>p₁</i> < 0,05	$25,2 \pm 5,5$	$4925,7 \pm 157$	$8,7 \pm 1,0$	$37,5 \pm 2,2$	$1,6 \pm 0,21$	$72,5 \pm 9,05$

Примечание. Одна звездочка — различия достоверны между группами животных, находившихся в естественной атмосфере и в атмосфере без РАВ; две — различия достоверны между группами животных, находившихся в атмосфере без РАВ и в атмосфере с летучими фракциями эфирного масла монарды.

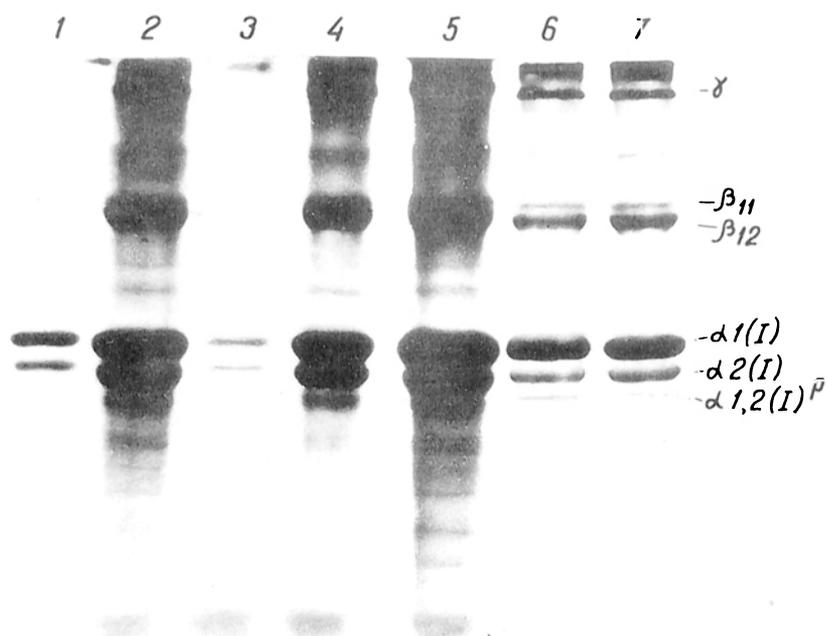


Рис. 1. Электрофорез в градиентном (5—10 %) ПААГ коллагенов, экстрагированных из кожи больных с СЭД II типа.
1—4, 6, 7 — больные 1.9.11., 3.9.11., 2.9.11., 4.9.11., 5.9.11., 6.9.11 с СЭД II типа; 5 — контроль.

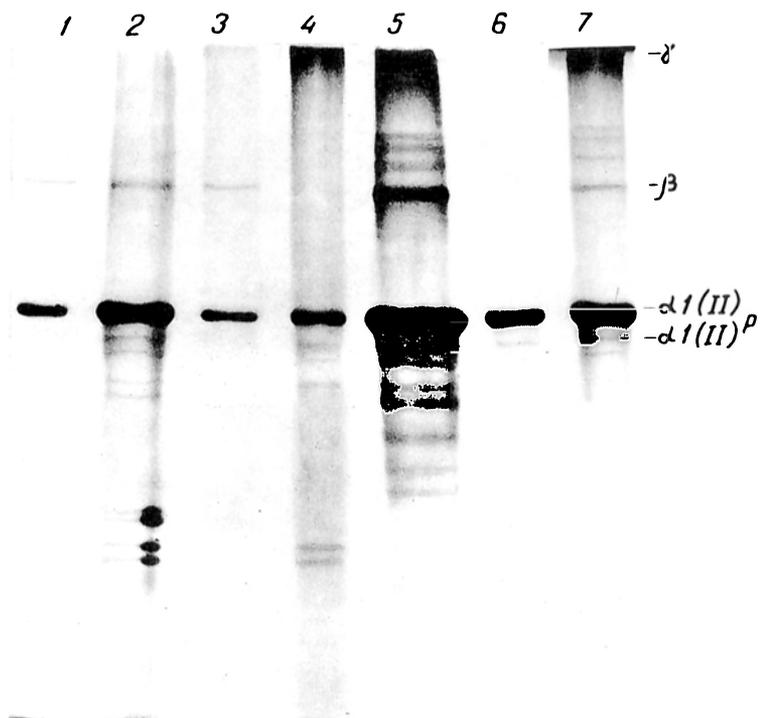


Рис. 2. Электрофорез в градиентном (5—10 %) ПААГ коллагенов, экстрагированных из реберного хряща больных с СЭД II типа, имеющих ВДГК.
1 — контроль; 2—7 — больные 3.9.11., 1.9.11., 6.9.11., 8.9.11., 7.9.11., 9.9.11., с СЭД II типа.

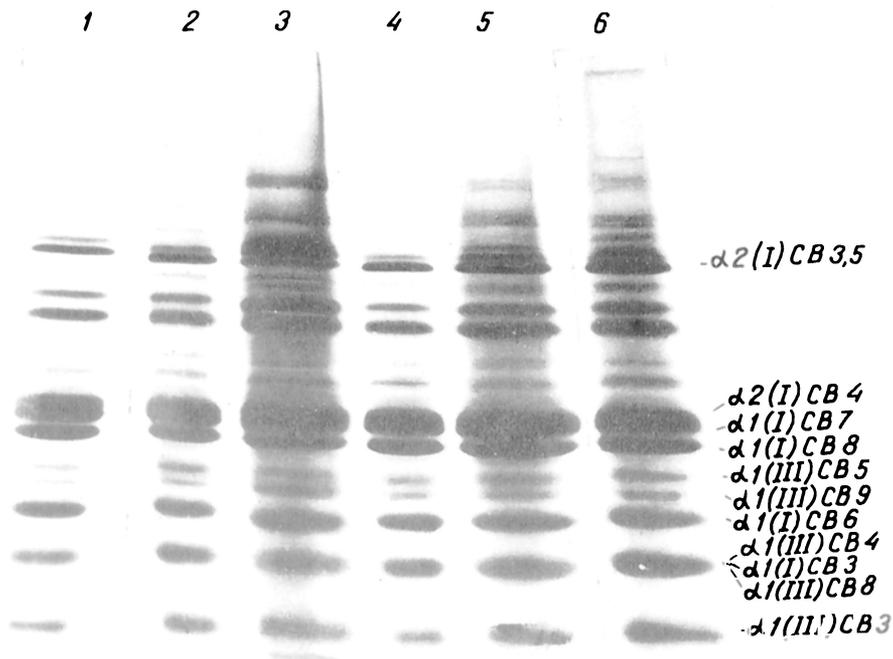


Рис. 3. Электрофорез в градиентном (10–25 %) ПААГ пептидов, полученных после обработки бромцианом коллагенов кожи больных с СЭД II типа.

1 – контроль; 2–6 – пептиды коллагенов кожи больных 1,9,11., 2,9,11., 3,9,11., 1,9,11., 5,9,11., с СЭД II типа.

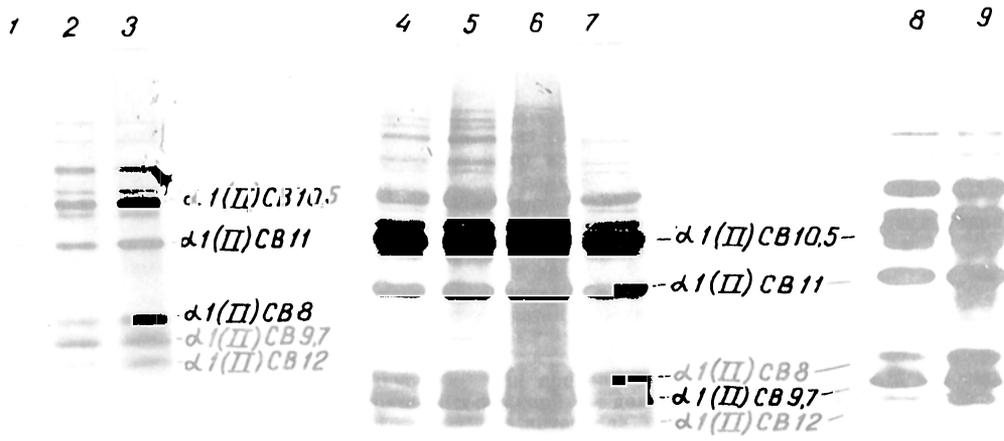


Рис. 4. Электрофорез в градиентном (10–25 %) ПААГ пептидов, полученных после обработки бромцианом коллагенов реберного хряща больных с СЭД I типа, имеющих ВДГК.

1, 7, 8 – контроль; 2–6, 9 – пептиды коллагенов реберного хряща больных 1,9,11., 6,9,11., 7,9,11., 8,9,11., 3,9,11., 9,9,11., с СЭД I типа.

ность ЛДГ, МДГ и Г-6-ФДГ печени до контрольных показателей.

Можно предполагать наличие процессов, способствующих стабилизации клеточных мембран под действием эфирных масел, свидетельством чего является снижение активности ацетилэстеразы плазмы крови на 23 %.

Таким образом, длительное пребывание в атмосфере без РАВ сопровождается угнетением аэробного метаболизма и переходом обмена на преимущественно анаэробный путь. Введение летучих компонентов РАВ в воздушную среду дает возможность корректировать эти нарушения.

ЛИТЕРАТУРА

1. Асатиани В. С. // Ферментные методы анализа.— М., 1969.— С. 434—435.
2. Асрия И. С. // Вопр. мед. химии.— 1967.— № 6.— С. 623—626.
3. Гродзинский А. М. // Фитонциды в эргономике.— Киев, 1986.— С. 53.
4. Гуровский Н. П., Егоров А. Д. // Косм. биол.— 1976.— № 6.— С. 3—14.
5. Макаричук Н. М., Кривенко В. В., Акимов Ю. А. и др. // Фитонциды. Роль в биогеоценозах, значение для медицины.— Киев, 1981.— С. 189—192.
6. Дмитриев М. Т., Грановский Э. И., Мицихин В. А. и др. // Здравоохран. Казахстана.— 1984.— № 10.— С. 42—44.
7. Кочетов Г. А. Практическое руководство по энзимологии.— М., 1980.— С. 70—72.
8. Литвинова Л. И. // Гиг. и сан.— 1982.— № 4.— С. 13—16.
9. Симановский Л. П., Перцева М. Н., Лившиц Н. М. // Биохимия.— 1968.— Т. 33.— С. 942—945.
10. Сторожок С. А. // Вопр. мед. химии.— 1983.— № 6.— С. 31—34.
11. Галдыкин О. Е. // Фитонциды: Роль в биогеоценозах, значение для медицины.— Киев, 1981.— С. 201—204.
12. Токин Б. П. // Фитонциды: Экспериментальные исследования, вопросы теории и практики.— Киев, 1975.— С. 5—20.
13. Хоменко А. Г., Высотина И. В., Колосовская В. П. // Вопр. мед. химии.— 1983.— № 3.— С. 83—88.
14. Lowry O. H., Rosbrough N. J., Farr A. L., Randall R. J. // J. biol. Chem.— 1951.— Vol. 193.— P. 265—275.
15. Ochoa S. // Meth. Enzymol.— 1955.— Vol. 1.— P. 753.

Поступила 14.04.89

SPECIFIC EFFECTS OF VEGETABLE AROMATIC SUBSTANCES ON ACTIVITY OF SOME ENZYMES IN RAT BLOOD AND LIVER TISSUE

V. V. Nikolaevsky, O. F. Yurkova, I. K. Ivanov, V. G. Gerzhikova

I. M. Sechenov Institute of Physiotherapy and Medical Climatology, Ministry of Public Health of the Ukrainian SSR, Yalta

Enzymatic activity was studied in blood plasma, erythrocytes and liver tissue homogenate of rats treated with vegetable aromatic substances. 60 rats were kept within 3 months in atmosphere containing naturally occurring concentrations of monarde ester oil. Control animals were maintained in usual atmosphere of vivarium. In liver tissues of control animals glycolytic processes predominated as shown by the data on increased activities of lactate- and glucose-6-phosphate dehydrogenases. At the same time, activity of soluble microsomal enzyme acetyl esterase was decreased in liver tissue, while activity of these esterases was increased in blood plasma, thus suggesting that membrane structures were destabilized. Aromatic fractions of monarde ester oil, introduced into atmosphere, contributed to normalization of the enzymatic reactions studied.

© Ю. А. БОГДАРИН, Е. Н. БАДЕЙНОВА, 1990

УДК 616.39:547.922]-008.61-07:616.36-008.839.15

Ю. А. Богдарин, Е. Н. Бадейнова

ВЛИЯНИЕ АЛИМЕНТАРНОЙ ГИПЕРХОЛЕСТЕРИНЕМИИ НА УРОВНИ ЛИПИДОВ И ЭССЕНЦИАЛЬНЫХ ЖИРНЫХ КИСЛОТ В ЭНТЕРОГЕПАТИЧЕСКОЙ ЦИРКУЛЯЦИИ У КРОЛИКОВ

Лаборатория биохимии Горьковского НИИ педиатрии

Изучение энтерогепатической циркуляции липидов разных классов, в том числе желчных и жирных кислот, является принципиально важным при рассмотрении вопроса о формировании липидных комплексов, способных к отложению в кровеносных сосудах и желчных протоках, в слизистой оболочке желчного пузыря, энтероцитах, гепатоцитах и клетках других органов при их холестеринизации [3, 4]. Изменение физиологического статуса организма, влияние разнообразных стрессорных воздействий, гиподинамия, высококалорийная жирная пища и т. п. — все это факторы риска холестериноза, разновидностью которого является желчнокаменная болезнь [7].

В настоящей работе рассматриваются показатели липидного обмена в жидкостях, органах и тканях, обеспечивающих энтерогепатическую циркуляцию комплексов липидов у кроликов при алиментарной гиперхолестеринемии.

Методика

В работе использованы 16 кроликов-самок массой 1,2—2,5 кг. Гиперхолестеринемия вызывалась у 7 кроликов путем включения 2 % холестерина в состав рациона в течение 3 мес ежедневно. Животных забивали под внутривенным наркозом (2 % раствор гексенала). В клетках (гепатоцитах и энтероцитах) и жидкостях — притекающей к кишечнику крови (ПКК), оттекающей от кишечника крови (ОКК), химусе и желчи — анализировали содержание основных липидных фракций: нейтральных липидов [11] и фосфолипидов [10] методом тонкослойной хроматографии на силикагеле с последующей денситометрией на микрофотометре ИФО-451. Клетки печени и слизистой оболочки верхнего отдела тонкого кишечника получали, используя ЭДТА и дитиотрейтол [6]. Для разделения нейтральных липидов применяли две системы: эфир — бензол — этанол — уксусная кислота (40:50:2:0,2, по объему) и эфир — гексан (6:94, по объему), для фосфолипидов — систему хлороформ — метанол — вода (65:25:4, по объему). Стандартами служили холестерин и жирные кислоты. В составе липидных фракций изучаемых образцов определяли спектры жирных кислот методом газожидкостной хроматографии [2], в сыворотке крови липопротеиды разделяли методом электрофореза в полиакриламидном геле [8], в пузырной желчи определяли уровень и фракционный состав желчных кислот на пластинках "Silufol" с последующей спектрофотометрией на СФ-26 [5]. Результаты анализа состава липидов выражали в микрограммах на 1 г (клетки) и в миллимолях на 1 л (жидкости), состав жирных кислот — в процентах от суммы всех кислот. При статистической обработке данных использовали критерий *t* Стьюдента.

Результаты и их обсуждение

При содержании кроликов на диете с холестерином в химусе натошак поддерживается повышенный уровень суммарных нейтральных липидов, превышающий исходный у интактных кроликов в 4,2 раза — $1,56 \pm 0,14$ и $6,54 \pm 0,82$ мМ/л ($p < 0,001$). В наибольшей степени повышается

Содержание липидных фракций в гепатоцитах и энтероцитах и некоторых жидкостях у кроликов при гиперхолестеринемии ($M \pm m$)

Фракция липидов		Химус	Желчь	ПКК	Энтероциты	ОКК	Гепатоциты
МГ	К	0,02±0,001	0,11±0,04	0,010±0,002	0,66±0,09	0,010±0,001	0,71±0,23
	ГХ	0,03±0,010	0,78±0,30*	0,04±0,01*	0,52±0,10	0,05±0,02	1,05±0,43
СЖК	К	0,06±0,02	0,41±0,10	0,27±0,02	0,68±0,15	0,08±0,01	0,96±0,19
	ГХ	0,07±0,03	1,27±0,24*	0,07±0,02*	0,35±0,10	0,21±0,03*	1,38±0,18
ХС	К	0,47±0,07	5,04±0,72	0,59±0,11	2,19±0,30	0,51±0,08	4,76±1,7
	ГХ	4,52±0,43*	39,9±4,7*	3,57±0,38*	9,14±1,43*	2,88±0,38*	18,74±2,9*
ДГ	К	0,58±0,07	1,21±0,22	0,17±0,07	3,33±0,24	0,23±0,02	5,91±0,33
	ГХ	0,72±0,11	4,59±0,56*	0,29±0,08	5,19±0,74	0,33±0,06	9,6±2,8
ТГ	К	0,12±0,02	2,9±0,4	0,84±0,05	9,36±1,23	0,93±0,4	15,35±1,6
	ГХ	0,53±0,08*	9,76±1,8*	0,92±0,09	4,59±0,92	0,16±0,07	12,2±0,58
ЭХ	К	0,31±0,04	2,79±0,54	1,31±0,15	0,16±0,03	1,23±0,07	2,32±0,16
	ГХ	0,67±0,22*	16,8±2,7*	3,25±0,36*	0,89±0,05*	3,52±0,42*	5,6±0,42*
ЛФХ	К	0,21±0,01	0,35±0,06	0,14±0,01	0,44±0,10	0,14±0,01	0,15±0,03
	ГХ	0,19±0,04	1,86±0,22*	0,10±0,02	1,05±0,3	0,10±0,02	0,69±0,07*
СФМ	К	0,41±0,02	0,84±0,10	0,15±0,02	3,0±0,4	0,09±0,01	2,6±0,23
	ГХ	0,13±0,04*	0,53±0,12	0,13±0,01	3,13±0,8	0,10±0,02	4,20±0,83
ФХ	К	0,85±0,08	12,1±0,35	0,63±0,05	11,68±0,70	0,66±0,05	17,91±0,8
	ГХ	0,28±0,07*	7,21±0,84*	0,42±0,05*	12,71±1,25	0,38±0,07*	10,40±2,73
ФЭА	К	0,36±0,04	0,90±0,12	0,13±0,01	5,1±0,40	0,10±0,01	4,63±0,3
	ГХ	0,054±0,01*	0,80±0,17	0,12±0,02	2,89±0,45*	0,10±0,02	2,42±0,4*

Примечание. ЛФХ — лизофосфатидилхолин, СФМ — сфингомиелин, ФХ — фосфатидилхолин, ФЭА — фосфатидилэтанолламин, МГ — моноглицериды, СЖК — свободные жирные кислоты, ХС — холестерин, ДГ — диглицериды, ТГ — триглицериды, ЭХ — эфиры холестерина, К — контроль, ГХ — гиперхолестеринемия. Звездочка — $p < 0,05$.

уровень холестерина — 9,6 раза, триацилглицеридов (ТГ) — в 4,4 раза и эфиров холестерина (ЭХ) — в 2,1 раза (табл. 1). Одновременно в кишечном содержимом в 2,9 раза уменьшается содержание общих фосфолипидов: с $1,94 \pm 0,19$ мМ/л у интактных кроликов до $0,67 \pm 0,08$ мМ/л у опытных ($p < 0,05$) за счет снижения концентраций всех фосфолипидов, кроме фракции лизофосфатидилхолина (ЛФХ), уровень которого не изменился.

Липиды желчи, состав которых формируется в гепатоцитах, при гиперхолестеринемии претерпевают изменения, аналогичные изменениям в химусе. Количество нейтральных липидов увеличивается от исходного ($12,4 \pm 0,91$ мМ/л) в 5,8 раза за счет повышения уровня всех компонентов и особенно холестерина, моноглицеридов (МГ) и ЭХ, а содержание фосфолипидов снижается от исходного ($14,67 \pm 0,77$ мМ/л) до $10,7 \pm 0,9$ мМ/л ($p < 0,05$) за счет уменьшения фракции фосфатидилхолина (ФХ), составляющего не менее 80 % содержания фосфолипидов желчи кроликов, свиней и человека [9]. Одновременно в 5,3 раза повышается уровень ЛФХ, причем при гиперхолестеринемии его доля среди фосфолипидов желчи увеличивается от исходных $2,3 \pm 0,4$ до $18,1 \pm 2,8$ % ($p < 0,001$).

Одной из наиболее важных в энтерогепатической циркуляции липидов является функция энтероцитов, синтезирующих холестерин [14, 20], обеспечивающих пассивное и активное всасывание, перестройку разных классов липидов и составляющих их жирных кислот [15]. При этом наименее изученным звеном остается формирование артериовенозного градиента между уровнем липидов в зависимости от условий функционирования клеток слизистой оболочки тонкого кишечника. В результате метаболических преобразований липидов в энтероцитах, получивших с ПКК

пластический и энергетический материал, при гиперхолестеринемии изменяется липидный состав ОКК. Общее количество нейтральных липидов в ПКК и ОКК возрастает в 2,5—2,7 раза по сравнению с исходными показателями, определенными у интактных кроликов (в ПКК $3,19 \pm 0,29$ мМ/л, в ОКК $2,99 \pm 0,33$ мМ/л). В их составе увеличивается количество МГ, холестерина и ЭХ, уровень которых в ПКК и ОКК одинаков (см. табл. 1). Параллельно повышается концентрация нейтральных липидов в энтероцитах — с $30,01 \pm 2,3$ мг/г у интактных животных до $55,65 \pm 6,5$ мг/г при гиперхолестеринемии; происходят накопление холестерина и ЭХ и изменение количественного и качественного состава липидов крови. Клетками слизистой оболочки задерживаются ТГ, так как их количество в ОКК по сравнению с уровнем в ПКК уменьшается ($p < 0,001$). При этом абсолютного накопления ТГ в энтероцитах при гиперхолестеринемии не отмечается, по-видимому, из-за преобладания процесса ресинтеза ТГ над его аккумуляцией.

В наших опытах соотношение уровня холестерина и ТГ в ОКК и ПКК возрастало в среднем от 0,6 до 3,6, что в 2 раза выше данных, полученных в аналогичных экспериментах Hunt и соавт. [16]. Различия, очевидно, связаны с составом диеты, из которой нами исключалась грубая растительная пища в виде сена, адсорбирующего и выводящего холестерин из организма.

У кроликов с гиперхолестеринемией увеличивается выведение с ОКК свободных жирных кислот (СЖК), тогда как у интактных животных в энтероцитах отмечается их утилизация: в ОКК определяется меньше СЖК, чем в ПКК. Подобная реакция энтероцитов на избыток холестерина в пище не случайна. Клетки слизистой оболочки кишечника освобождаются от СЖК, избыток которых может оказывать детергентное воздействие

на клеточные мембраны [17], путем выведения СЖК с ОКК, а также включения их в ЭХ. Увеличение количества МГ, холестерина и ЭХ в ПКК может быть связано с усиленным выведением их гепатоцитами, где так же, как в энтероцитах, отмечается накопление холестерина и ЭХ.

Известно, что избыток холестерина отрицательно влияет на синтез фосфолипидов в печени [20], где наряду со снижением уровня сфингомиелина (СФМ) и тенденцией к уменьшению количества ФХ, повышается содержание фракций ЛФХ (см. табл. 1). Согласно результатам работы Sekas и соавт. [21], фракция 2-ЛФХ составляет не менее 18 % содержания фосфолипидов в крови и лишь 0,5 % в составе фосфолипидов печени большинства животных. В наших опытах получены сходные результаты. Повышение уровня ЛФХ в печени при гиперхолестеринемии, вероятно, объясняется усилением активности лецитин: холестеринацилтрансферазы (КФ 2.3.1.43). Как отмечалось выше, высокий уровень ЛФХ в печени способствует накоплению этой фракции в пузырной желчи, в результате чего создаются предпосылки для формирования липидных комплексов, в которых преобладают малорастворимые компоненты [3]. Однако образования холестериновых камней в желчном пузыре у кроликов при гиперхолестеринемии не наблюдается. Ни у одного из 7 кроликов в наших опытах не было выявлено уменьшения общего количества желчных кислот, обеспечивающих солюбилизацию липидов в пузырной желчи: $123,5 \pm 17,28$ мМ/л в контроле и $156,36 \pm 16,32$ мМ/л при гиперхолестеринемии ($p < 0,05$).

Об отсутствии изменения уровня желчных кислот в желчи или даже увеличении их количества при алиментарной гиперхолестеринемии у кроликов сообщалось ранее [1]. Расчеты соотношений уровней фосфолипидов, холестерина и желчных кислот желчи в треугольной системе координат по Admirand и Small [19] свидетельствуют об отсутствии условий для выпадения холестерина из мицелл или везикул желчи в осадок. В то же время в интима кровеносных сосудов у кроликов с гиперхолестеринемией отмечается отложение холестерина, чему способствуют увеличение в крови фракции липопротеидов низкой плотности (ЛПНП) и практически полное исчезновение из крови липопротеидов высокой плотности (ЛПВП; табл. 2).

В настоящее время наряду с тремя известными параметрами (холестерин, фосфолипиды, желчные кислоты) в систему расчета вероятности камнеобразования вводят 4-й фактор — уровень жирных кислот [19], который у больных с желчными камнями значительно (в 6 раз) снижен. При этом большое значение придается эссенциальным жир-

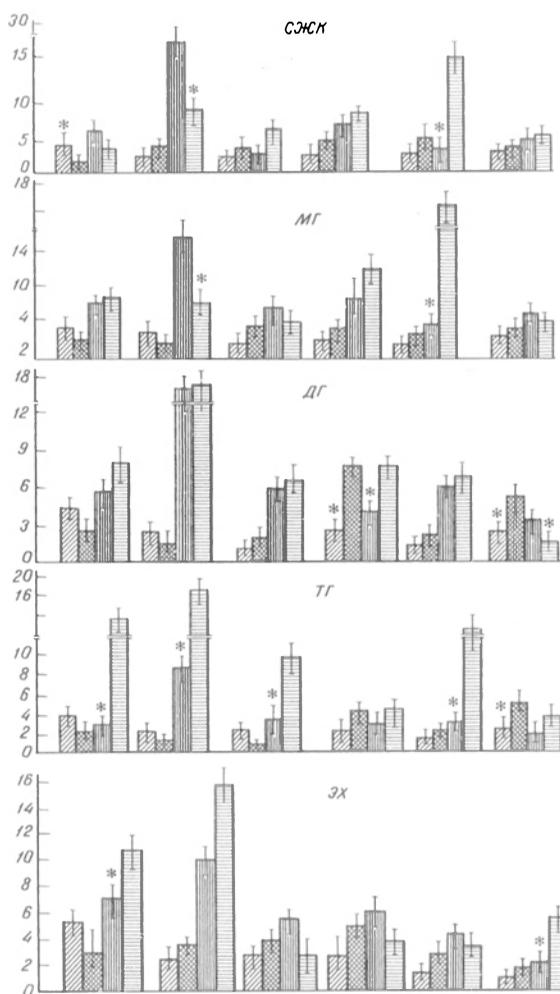


Рис. 1. Содержание линолевой и арахидоновой кислоты (в %) в составе нейтральных липидов у кроликов с гиперхолестеринемией.

Здесь и на рис. 2: 1 — линолевая кислота, контроль; 2 — то же, гиперхолестеринемия; 3 — арахидоновая кислота, контроль; 4 — то же, гиперхолестеринемия. Звездочка — $p < 0,05$.

ным кислотам ω -6 ряда — линолевой (18:2) и арахидоновой (20:4), которым отводится антиатерогенная роль, способность снижать концентрацию холестерина в периферической крови [13].

На рис. 1 и 2 представлены данные об относительном содержании в липидах двух из трех эссенциальных жирных кислот, в крови и тканях кроликов является минимальным или эта кислота во фракции фосфолипидов вообще отсутствует [15]. В составе фракций нейтральных липидов гепатоцитов интактных кроликов содержание линолевой кислоты не превышает 3,5 %, уровень арахидоновой кислоты в каждой фракции в 1,5—2 раза выше. Содержание линолевой кислоты в фосфолипидах сохраняется в пределах от $1,80 \pm 0,46$ % (СФМ) до $7,80 \pm 1,02$ % (ФЭА), а арахидоновой — в пределах от $0,96 \pm 0,28$ % (ФЭА) до $4,2 \pm 0,47$ % (ЛФХ). Следовательно, в печени кроликов происходит равнозначное распределение эссенциальных жирных кислот по фракциям нейтральных липидов и фосфолипидов. В общих липидах желчи содержится от 2 до 3,5 % линолевой кислоты. Фосфолипиды желчи включают 5,8—8,6 % арахидоновой кислоты, тогда как нейтральные липи-

Таблица 2

Содержание липопротеидов (в %) в крови кроликов при гиперхолестеринемии ($M \pm m$)

Класс липопротеидов	Интактные животные		Животные с гиперхолестеринемией	
	ОКК	ПКК	ОКК	ПКК
ЛПНП	$7,0 \pm 3,81$	$10,53 \pm 5,7$	$26,66 \pm 5,87^*$	$34,46 \pm 7,8^*$
ЛПВП	$45,67 \pm 6,64$	$47,36 \pm 8,86$	$4,88 \pm 5,89^1$	$4,60 \pm 1,29^*$

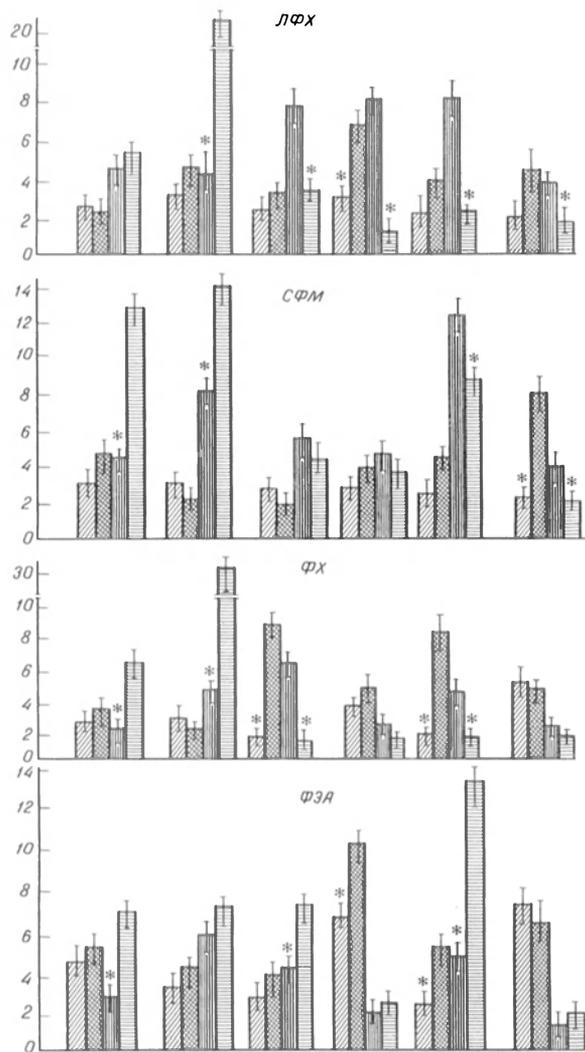


Рис. 2. Содержание линолевой и арахидоновой кислот (в %) в составе фосфолипидов у кроликов с гиперхолестеринемией.

ды — от 9 % (ТГ) до 26 % (СЖК). Высокий уровень арахидоновой кислоты в составе нейтральных липидов желчи, по-видимому, не случаен. Механизм, с помощью которого происходят перераспределение жирно-кислотного состава липидов печени и накопление в желчи арахидоновой кислоты, мало изучен. Основываясь на классификации липидов по растворимости [3], можно предположить, что преобладание в полярных липидах жирных кислот с длинной цепью обеспечивает им равновероятное с фосфолипидами включение в раствор желчи в виде мицелл. Фосфолипиды химуса содержат от $2,80 \pm 0,63$ % (ЛФХ) до $4,5 \pm 0,8$ % (ФЭА) линолевой кислоты и от $2,50 \pm 0,61$ % (ФХ) до $4,9 \pm 0,7$ % (СФМ) арахидоновой кислоты, причем уровень последней во всех липидных фракциях кишечного содержимого меньше, чем в липидах желчи. Вероятно, что арахидоновая кислота избирательно абсорбируется энтероцитами, которые специфически влияют на поглощение и ресинтез липидов пищи, как и сама диета оказывает влияние на липидный профиль слизистой оболочки [18]. Действительно, уровень линолевой и арахидоновой кислот в липидах энтероцитов сравним с их уровнем в липидах химуса. Наибольший интерес представляет изменение

содержания эссенциальных жирных кислот в составе фосфолипидов в ПКК, клетках слизистой оболочки тонкого кишечника и в ОКК, так как такая последовательность изучения позволяет характеризовать роль стенки кишечника при развившемся в организме состоянии гиперхолестеринемии. Во всех фракциях фосфолипидов в ПКК и ОКК интактных кроликов содержание арахидоновой кислоты (3,8—12,0 %) превышает уровень линолевой кислоты (1,4—3,2 %), что менее выражено для фракций нейтральных липидов.

Увеличенное содержание холестерина в организме кроликов при гиперхолестеринемии приводит к повышению содержания в химусе арахидоновой кислоты в СФМ, ФХ, ФЭА, СЖК и ТГ, не изменяет уровня линолевой кислоты в фосфолипидах и снижает ее содержание в СЖК и ЭХ. Одновременно в фосфолипидах желчи отмечаются повышение уровня линолевой кислоты в ЛФХ и значительное накопление арахидоновой кислоты в ЛФХ, СФМ и особенно в ФХ, ТГ и ЭХ. Напротив, во фракциях СЖК и МГ наблюдается снижение уровня арахидоновой кислоты. По-видимому, это является следствием интенсивного ее синтеза из линолевой кислоты в гепатоцитах и последующего выведения в составе липидов в желчь. В то же время гепатоциты в большинстве липидных фракций сохраняют эссенциальные кислоты на контрольных, определенных у интактных кролика, уровнях, за исключением фракции СФМ, где наряду с увеличением содержания линолевой кислоты уменьшается количество арахидоновой и фракций ЭХ, где уровень арахидоновой кислоты повышен. Избыточное потребление холестерина привело к перераспределению содержания линолевой и арахидоновой кислот в составе липидов ПКК и ОКК. Наряду с тенденцией к увеличению количества линолевой кислоты во фракции ЛФХ и повышением ее концентрации в ФХ во всех фракциях нейтральных липидов сохраняется исходный уровень этой кислоты. Содержание арахидоновой кислоты возрастает во фракциях СЖК, МГ, ФЭА и снижается во фракциях ЛФХ и ФХ крови. Приведенные результаты в целом тождественны данным, полученным в эксперименте на крысах и свидетельствуют, что гиперхолестеринемия вызывает уменьшение содержания линолевой и повышение уровня арахидоновой кислоты, причем максимальные изменения отмечены в ЭХ [12]. Вследствие подобных разнонаправленных изменений жирных кислот в составе общих липидов в крови кроликов в норме и при гиперхолестеринемии не выявляются достоверные различия между уровнями линолевой и арахидоновой кислот. Следовательно, жирно-кислотный анализ общих липидов крови кроликов в условиях холестеринизации для оценки данного состояния малоинформативен.

Таким образом, проведенный нами анализ уровня основных липидных фракций в системе кишечного-печеночной циркуляции желчи позволил выявить специфическое влияние гепатоцитов и энтероцитов на формирование липидных комплексов холестерина, крови и желчи у кроликов при гиперхолестеринемии.

Отсутствие холестериновых камней в желчном пузыре у кроликов при алиментарной гиперхолестеринемии можно объяснить специфическим соотношением четырех липидных компонентов, удерживающих их в растворе.

живающих холестерина в растворе желчи: на фоне высокой концентрации холестерина и сниженного уровня фосфолипидов не происходит изменения количества желчных кислот, увеличено содержание СЖК и в большинстве липидных фракций повышен уровень арахидоновой кислоты.

ЛИТЕРАТУРА

1. *Абдурахманов Ф. А.* Некоторые стороны метаболизма холестерина и желчных кислот при нарушениях липидного обмена: Автореф. дис. ... д-ра мед. наук.— Л., 1967.
2. *Богдарин Ю. А., Бояринов Г. А., Горбунова Л. В.* // Лаб. дело.— 1982.— № 9.— С. 17—20.
3. *Галлер Г., Ганефельд М., Яросс В.* Нарушения липидного обмена: Диагностика, клиника, терапия: Пер. с нем.— М., 1979.
4. *Ганиткевич Я. В.* Роль желчи и желчных кислот в физиологии и патологии организма.— Киев, 1980.
5. *Иванов А. И.* // Лаб. дело.— 1973.— № 8.— С. 504—506.
6. *Канаева И. П., Карякин А. В., Аленичева Т. В.* и др. // Цитология.— 1975.— № 5.— С. 545—551.
7. *Лопухин Ю. М., Арчаков А. И., Владимиров Ю. А., Коган Э. М.* Холестериноз.— М., 1983.
8. *Магарчева Е. Я.* // Вопр. мед. химии.— 1973.— № 6.— С. 652—655.
9. *Alvaro D., Angelico M., Cantafora A.* et al. // *Biochim. biophys. Acta.*— 1986.— Vol. 878.— N 2.— P. 216—224.
10. *Edwards R. W.* // *J. Chromatogr.*— 1978.— Vol. 154.— P. 183—191.
11. *Freeman C. P., West D.* // *J. Lipid Res.*— 1966.— Vol. 7.— P. 324—327.
12. *Gard M. L., Snoswell A. M., Sabine I. R.* // *Nutr. Rep. int.*— 1985.— Vol. 32, N 1.— P. 117—127.
13. *Garlon G. A.* // *BNF Nutr. Bul.*— 1985.— N 3.— P. 152—164.
14. *Herold G., Scheider A., Ditschuneit H., Stange E. F.* // *Biochim. biophys. Acta.*— 1984.— Vol. 796, N 1.— P. 27—33.
15. *Horrobin D. F., Huang Y. S., Cunnane S. C., Manku M. S.* // *Lipids.*— 1984.— Vol. 19, N 10.— P. 806—811.
16. *Hunt C. E., Duncan L. A.* // *Brit. J. exp. Path.*— 1985.— Vol. 66, N 1.— P. 35—46.
17. *Katz A. M., Messinco F. C.* // *J. molec. cell. Cardiol.*— 1982.— Vol. 14, N 9.— Suppl. 3.— P. 119—122.
18. *Kuksis A., Myher J. I.* // *J. Chromatogr.*— 1986.— Vol. 379.— P. 57—90.
19. *Mingrone G., Greco A. V., Bertuzzi A.* // *Comput. biomed. Res.*— 1986.— Vol. 19, N 4.— P. 311—318.
20. *Perrodin M., Lutton C.* // *Reprod. Nutr. Develop.*— 1985.— Vol. 25, N 4.— P. 647—657.
21. *Sekas G., Patton G. M., Lincoln E. C., Robins S. J.* // *J. Lab. clin. Med.*— 1985.— Vol. 105, N 2.— P. 190—194.

Поступила 31.05.88

EFFECT OF ALIMENTARY HYPERCHOLESTEROLEMIA ON CONTENT OF LIPIDS AND ESSENTIAL FATTY ACIDS IN RABBIT ENTEROHEPATIC CIRCULATION

Yu. A. Bogdarin, E. N. Badeynova

Laboratory of Biochemistry, Institute of Pediatrics, Gorki

Patterns of lipid metabolism were estimated in biological fluids and tissues involved in enterohepatic circulation of bile lipid complexes in female rabbits with alimentary hypercholesterolemia. Cholesterol gallstones were not found in gallbladder of rabbits with alimentary hypercholesterolemia. A number of reasons was responsible for the phenomenon, including specific ratio of four lipid components, which contributed to maintaining bile cholesterol in soluble form; concentration of bile acids was unaltered simultaneously with high contents of cholesterol and a decrease in phospholipids level, while content of free fatty acids was increased and the content of arachidonic acid was elevated in majority of lipid fractions.

© Л. П. ГРИНИО, 1990

УДК 616.832-009.54-055.5/7-055.1-07:616.74-008.931:577.152.273]-053.13-074

Л. П. Гринио

ИССЛЕДОВАНИЕ ЭМБРИОНАЛЬНЫХ МЫШЦ ЧЕЛОВЕКА ПРИ МИОПАТИИ ДЮШЕННА

Институт общей патологии и патофизиологии АМН СССР, МГУ им. Ломоносова

Одной из наиболее тяжелых форм миопатий является первичная миопатия Дюшенна, наследуемая рецессивно сцепленно с X-хромосомой. Патогенез этого заболевания неясен, терапия малоэффективна; заболевание характеризуется необычайно высоким уровнем активности в крови креатинкиназы (КК), особенно на ранних стадиях развития болезни, часто до проявления клинических признаков болезни [1, 2].

Предполагается, что высокая активность фермента в крови связана как с высоким синтезом фермента в мышечной ткани, так и со свободным выходом КК через мембрану клетки [1].

Как рано появляются означенные изменения КК, неясно [1, 4, 9]. Поэтому в настоящей работе исследованы скелетные мышцы эмбрионов мужского пола от 6 до 20 нед беременности, взятые при абортации у женщин — достоверных носителей патологического гена, обнаруженных и обследованных ранее [3].

Методика

Под нашим наблюдением было 24 семьи, 25 больных, 6 носителей патологического гена с миопатией Дюшенна и 8 эмбрионов мужского пола, взятых при абортации у женщин, имеющих больных сыновей с миопатией Дюшенна и повторю беременных на разных сроках. Так как заболевание сцепленно с X-хромосомой, то болеют мужчины, а передают заболевание женщины.

Активность КК измеряли потенциометрическим методом [12], она выражается в мкмоль АДР/мин·л=МЕ/л.

В таблице показаны результаты исследования КК у здоровых детей, у носителей и у больных миопатией мальчиков на разных стадиях болезни; причем I стадия соответствует первым клиническим проявлениям, II — развернутой картине болезни, а III — тяжелым проявлениям болезни с обездвиженностью.

Как показывают данные таблицы, у здоровых детей величина каталитической активности достаточно низка и никогда не превышала 100 МЕ/л, у вероятных носителей повышение активности КК в крови выявлялось в 83 % случаев. Результаты исследования КК у больных показывают, что наиболее высокие величины зарегистрированы в ранней стадии болезни.

Результаты исследования КК в семьях с миопатией Дюшенна

Контингент обследованных	Возраст, годы	Активность КК, МЕ/л
Здоровые мальчики (n=10)	3—14	63±8
Носители патологического гена (n=6)	28—40	271±30
Больные миопатией Дюшенна:		
I стадия (n=1)	3—5	6025±651
II » (n=15)	6—14	2427±329
III » (n=6)	11—16	497±53

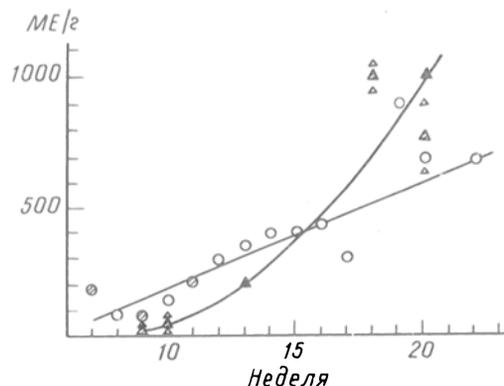


Рис. 1. Креатинкиназная активность в экстракте скелетных мышц эмбрионов человека у носителей патологического гена формы Дюшенна и у нормальных женщин без этого гена. По оси ординат — активность КК (в МЕ на 1 г белка мышечной ткани). В сувернатанте определяли концентрацию белка микробиуретовым методом и креатинкиназную активность. По оси абсцисс — развитие эмбрионов (в нед.). Круг — норма, приведенная из статьи С. Foxall и А. Emery [8]. Заштрихованный треугольник — мышцы, подозрительные на форму Дюшенна эмбрионов (данные автора). Черный треугольник — мышцы, подозрительные на форму Дюшенна эмбрионов Foxall и Emery [8]. Рисунок показывает, что креатинкиназная активность у эмбрионов с формой Дюшенна появляется раньше, чем в норме.

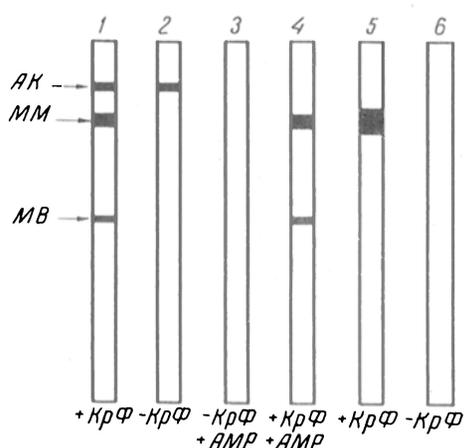


Рис. 2. Электрофоретическая картина изоферментов КК в экстракте скелетных мышц 20-недельного эмбриона человека с формой Дюшенна.

Выявлены 2 изофермента ММ- и МВ-типов и сопутствующая им аденилаткиназа (АК), типичные для этого периода развития. Электрофоретическая картина экстракта — 1 и 4 и коммерческого препарата ММ-формы [5, 6].

Высокий уровень активности фермента в предклинической стадии свидетельствует о раннем нарушении обмена КК, что позволяет предполагать начало миодистрофического процесса на ранней стадии развития мышц.

Как видно на рис. 1, в мышцах эмбрионов 8—10 нед уровень активности КК несколько ниже, чем в контрольных мышцах здоровых эмбрионов, он как бы запаздывает. У эмбрионов 18—20 нед в скелетных мышцах появляется более высокая активность КК, чем у здоровых плодов.

Представлял интерес анализ изоферментов КК (рис. 2). Электрофоретическое исследование экстракта мышц патологического 20-недельного эмбриона методом диск-электрофореза в ПААГ в системе Девиса показало наличие 2 изоферментов ММ- и МВ-типов, причем ММ-форма была в преобладающем количестве. Креатинкиназную активность определяли в системе, сопряженной с гексокиназой, глюкозо-6-фосфатдегидрогеназой, фенолазине метасульфатом и нитроглубым тетразо-

лием. Таким образом, в изоферментном составе не выявлено качественных изменений фермента. Результаты и обсуждение

Предыдущие исследования эмбриональных мышц у позвоночных показали, что КК появляется одновременно с формированием миосинтезия из миобластов [4, 6]. Изучение эмбриональных мышц у человека посредством светового и электронного микроскопа показало, что сначала появляются миобласты, а из них формируются многоклеточные образования; основная дифференцировка скелетных мышц происходит между 8-й и 16-й неделями развития [5—9, 10], когда развиваются миофибриллы. Появление КК совпадает с этим периодом, причем сначала представлены все 3 изоэнзима — ВВ, МВ, ММ, а после 16-й недели развития уже преобладает ММ-изоэнзим [9—11].

В оценке появления и распределения изоэнзимов нет полного согласия, и часть авторов пишут о нарастании изоэнзима ММ к концу 16-й недели [7], другие авторы пишут о появлении ММ к этому периоду [9]. Возможно, что разница в оценке связана как с ошибками определения сроков развития эмбриона, так и с методикой исследования [5—7, 10, 11].

Очень мало работ, посвященных изучению эмбрионов, подозрительных на миопатию Дюшенна. Нам удалось найти 4 работы, причем в каждой было по 1 или 2 случая, исследованных авторами [6, 9]. Так, Knight и соавт. обнаружили КК в скелетных мышцах после 16-й недели, а P. Larson, D. Park — после 20-й недели развития эмбриона [6].

Все перечисленные авторы пишут о связи организации миофибрилл и активности КК, необходимой для сократительных движений эмбриональных мышц [7, 11].

Наши данные подтверждают постепенное увеличение фермента в скелетных мышцах эмбриона человека от 8-й до 20-й недели развития (см. рис. 1). Они показывают также, что уже на ранних этапах формирования скелетных мышц у эмбрионов, подозрительных на заболевание, имеются отклонения от обычного развития: сначала запаздывание образования КК, а затем чрезмерная ее активность на 20-й неделе. Однако в формировании изоэнзимов нет разницы со здоровыми эмбрионами (см. рис. 2).

Таким образом, проведенные исследования показывают нарушения в сократительном аппарате миофибрилл, отражением является изменение активности КК уже на ранних этапах развития эмбриона. Видимо, клинические признаки болезни появляются при достаточно большом распаде миофибрилл, поэтому неудачны попытки симптоматического лечения больных детей.

Автор приносит благодарность сотрудникам кафедры биохимии МГУ (зав. — акад. С. Е. Северин) Л. В. Белоусовой, С. Н. Федосову, Е. Л. Москвитиной.

ЛИТЕРАТУРА

1. Белоусова Л. В., Гринио Л. П., Федосов С. Н., Москвитина Е. Н. // *Вопр. мед. химии.* — 1987. — № 1. — С. 138—140.

2. Гринио Л. П. Клинические формы, вопросы патогенеза и медико-генетического консультирования дюшенновской миодистрофии: Дис. ... д-ра мед. наук.— М., 1975.
3. Гринио Л. П. // *Вопр. мед. химии.*— 1966.— № 6.— С. 600—603.
4. Askanas V., Shadiq S., Milhorat A. // *International Congress on Muscle Diseases.*— Amsterdam, 1973.— P. 113—124.
5. Dawkins R., Smith P., Papadimitriou J. H., Holt P. G. // *Ibid.*— P. 377—383.
6. Eppenberger H., Richterich R. // *Develop. Biol.*— 1964.— Vol. 10.— P. 1—16.
7. Fidzianska A. // *Ann. med. Sect. pol. Acad. Sci.*— 1973.— Vol. 18.— P. 14—16.
8. Foxall C., Emery A. // *J. neurol. Sci.*— 1975.— Vol. 24.— P. 483.
9. Goto I., Nagamine M. et al. // *Arch. Neurol. (Chic.)*— 1969.— Vol. 20.— P. 422—429.
10. Kar N., Pearson C. // *Amer. J. clin. Path.*— 1965.— Vol. 43.— P. 207—209.
11. Ochoa J., Mair W. // *Symposium on Current Research in Muscular Dystrophy, 4th: Proceedings.*— London, 1968.— P. 223—239.
12. Rosalki S. // *Nature.*— 1965.— Vol. 207.— P. 414.
13. Schapira G., Dreyfus G., Shapira F. // *Enzym. Biol. Clin.*— 1970.— Vol. 11.— P. 8—31.

Поступила 13.04.89

HUMAN EMBRYONAL MUSCLES UNDER CONDITIONS OF DUSHENN MYOPATHY

L. P. Grinio

Institute of General Pathology and Pathophysiology, Academy of Medical Sciences of the USSR, Moscow

Activity of skeletal muscle creatine kinase (main test in diagnosis of Duchenn myopathy) was studied in 9 embryos of 8-20 weeks old obtained from women which have got sons with this myopathy. It is well known that the enzymatic activity is increased at the beginning of the myodystrophy. This fact was detected in 20 weeks old embryos of male sex, while isoenzyme composition was unaltered. The data obtained suggest that impairments occurred in contractile apparatus of myofibrils as a result of which activity of creatine kinase was altered within the early steps of ontogenesis.

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 1990

УДК 616.379-008.64-053.2.07:1616.155.1-008.939.15-39-02:616.153.1

Л. А. Сальникова, Н. В. Мусатова, Н. И. Лопатина

АКТИВНОСТЬ АНТИОКИСЛИТЕЛЬНЫХ ФЕРМЕНТОВ И ПЕРЕКИСНОЕ ОКИСЛЕНИЕ ЛИПИДОВ В ЭРИТРОЦИТАХ ДЕТЕЙ, БОЛЬНЫХ САХАРНЫМ ДИАБЕТОМ

Кафедра биологической химии Ленинградского педиатрического медицинского института

При сахарном диабете (СД) имеет место значительное нарушение снабжения тканей кислородом [1, 4, 9]. Изменение баланса кислорода в клетках сказывается на скорости образования его свободных радикалов, участвующих в инициации перекисного окисления липидов (ПОЛ) биологических мембран [2, 27]. Было установлено увеличение содержания продуктов ПОЛ у больных СД [3, 5, 7, 8, 21]. Интенсивность процессов ПОЛ регулируется антиокислительной защитной системой организма. Важное место в этой системе занимают антиокислительные ферменты — супероксиддисмутаза (СОД; КФ 1.15.1.1) и каталаза (КТ; КФ 1.11.1.6). СОД катализирует реакцию дисмутации супероксид-анион-радикала. В ходе

реакции образуется перекись водорода, разрушение которой катализируют КТ и глутатионпероксидаза [2, 27]. Внутривенное введение СОД крысам предотвращало ПОЛ и снижало процент гибели животных с аллоксановым диабетом [15]. Отмечен повышенный уровень эндогенной СОД в эритроцитах крыс с аллоксановым диабетом [13]. Однако у людей, больных СД, уровень эндогенных антиоксидантов, играющих центральную роль в метаболизме кислорода в тканях, исследован недостаточно [3, 18, 26, 28].

Целью работы было охарактеризовать изменения активности основных антиокислительных ферментов — СОД, КТ и содержание продуктов ПОЛ в эритроцитах в зависимости от степени тяжести и компенсации СД у детей.

Методика

Обследованы 65 здоровых детей и 124 ребенка (56 мальчиков и 68 девочек) с инсулинзависимым СД. Исследования проводили в двух возрастных группах: 3—12 и 13—14 лет. По степени тяжести заболевания выделяли СД легкой формы, средней тяжести, тяжелой формы. Степень компенсации СД определяли в соответствии с принятыми критериями [18]. Длительность заболевания у детей составляла от 1,5 до 10 лет и более. Обследовали также небольшую группу первично поступивших больных с диагнозом «СД впервые выявленный». Всем детям назначали соответствующую диету и инсулинотерапию. Адекватность инсулинотерапии достигалась комбинированным назначением препаратов инсулина короткого и пролонгированного действия в режиме 2—3-разового введения с учетом времени приема пищи. Суточную дозу инсулина, как принято в настоящее время [10, 18], рассчитывали в зависимости от возраста ребенка, его массы, содержания кетоновых тел в крови и моче. Обычно доза не превышала 1 ЕД на 1 кг массы тела, и соотношение дневной и ночной доз инсулина составляло 2:1. Для контроля за течением заболевания проводили ежедневное исследование глюкозурии и уровня гликемии натощак, систематически определяли гликемические и глюкозурические профили согласно имеющимся рекомендациям [10, 14, 18].

Кровь для исследования собирали с гепарином путем венопункции. Эритроциты трижды отмывали от плазмы физиологическим раствором при центрифугировании (4 °С, 6000 g). Активность СОД измеряли по скорости торможения реакции восстановления нитросинего тетразолия (НСТ) в присутствии НАД·Н₂ и феназинметасульфата. Активность фермента выражали в условных единицах, считая, что 50 % торможение процесса восстановления НСТ, вызванное препаратом СОД за 10 мин инкубации, соответствует 1 усл. ед. Поскольку содержание гемоглобина и количество эритроцитов подвержено колебаниям, мы одновременно оценивали изменения активности фермента в расчете на 1 мг гемоглобина и на 1 мл эритроцитов [6, 17, 25]. Для определения активности КТ использовали спектрофотометрический метод [23]. Об активности КТ судили по степени разрушения перекиси водорода в ммольях за 1 мин и выражали ее в международных единицах на 1 г гемоглобина и 1 мл эритроцитов [23]. Продукты ПОЛ с конъюгированным типом связи и диенкетонной конфигурацией определяли спектрофотометрически при длинах волн 232 и 273 нм и выражали в единицах оптической плотности на 1 мл эритроцитов [16]. Результаты исследования обрабатывали методом математической статистики с расчетом среднего арифметического (*M*) и средней квадратичной ошибки среднего арифметического (*m*) [11].

Результаты и их обсуждение

Активность СОД эритроцитов у детей с СД претерпевает закономерные изменения в зависимости от возрастной группы, степени тяжести и компенсации заболевания. Активность фермента у детей в возрасте 3—12 лет с декомпенсацией СД не отличалась от значений активности, найденных у здоровых детей того же возраста (табл. 1, 2). Другие авторы, исследовавшие экстрацеллюляр-

Таблица 1

Активность СОД эритроцитов у детей с СД

Степень тяжести и компенсации СД	Возраст, годы	Число обследованных	Активность СОД ($M \pm m$)	
			усл. ед. на 1 мг гемоглобина	усл. ед. на 1 мл эритроцитов
Здоровые дети	3—12	47	$1,06 \pm 0,04$	$256,9 \pm 10,00$
	13—14	11	$1,39 \pm 0,04$	$323,0 \pm 8,70$
Легкая форма декомпенсации	3—12	4	$1,01 \pm 0,21$	$203,43 \pm 61,94$
	p		$>0,2$	$>0,2$
компенсация	3—12	6	$1,55 \pm 0,16$	$356,95 \pm 62,51$
	p		$<0,005$	$0,1$
p_1			$<0,05$	$<0,05$
Средняя тяжесть декомпенсации	3—12	34	$1,10 \pm 0,04$	$258,50 \pm 11,50$
	p		$>0,2$	$>0,2$
компенсация, субкомпенсация	13—14	18	$1,08 \pm 0,08$	$242,70 \pm 15,64$
	p		$<0,01$	$<0,001$
p	3—12	14	$1,48 \pm 0,09$	$286,4 \pm 10,25$
	p		$<0,001$	$<0,05$
p_1			$<0,001$	$0,05, <0,1$
p	13—14	6	$1,40 \pm 0,08$	$322,48 \pm 15,79$
	p		$>0,2$	$>0,2$
p_1			$<0,01$	$<0,01$
Тяжелая форма декомпенсации	3—12	4	$1,04 \pm 0,16$	$263,89 \pm 59,07$
	p		$>0,2$	$>0,2$
субкомпенсация	13—14	14	$1,21 \pm 0,07$	$274,82 \pm 18,00$
	p		$<0,05$	$<0,025$
p	13—14	3	$1,70 \pm 0,24$	$371,47 \pm 50,46$
	p		$>0,2$	$>0,2$
p_1			$0,05, <0,1$	$0,05, <0,1$

Примечание. Здесь и в табл. 2 и 4: p — достоверность различий по сравнению со здоровыми детьми; p_1 — достоверность различий между показателями активности в зависимости от степени компенсации СД.

ную СОД в плазме крови детей с СД, также не обнаружили изменений в ее активности по сравнению с контрольной группой [28]. Активность же СОД эритроцитов, по их данным, была несколько сниженной по сравнению со здоровыми детьми [26]. Однако эти авторы не учитывали возрастных особенностей, степень тяжести и компенсации СД. В наших исследованиях дети 13—14 лет с декомпенсированным СД среднетяжелой и тяжелой форм имели такие же показатели активности СОД, как и дети 3—12 лет, больные СД, и более низкие значения активности фермента

Таблица 2

Активность СОД эритроцитов у детей с СД, выявленным впервые

Степень компенсации	Возраст, годы	Число обследованных	Активность СОД ($M \pm m$)	
			усл. ед. на 1 мг гемоглобина	усл. ед. на 1 мл эритроцитов
Декомпенсация	3—12	11	$1,09 \pm 0,10$	$269,62 \pm 17,52$
	p		$>0,2$	$>0,2$
p	13—14	4	$1,22 \pm 0,10$	$289,77 \pm 13,48$
	p		$>0,1$	$0,05, <0,1$
Субкомпенсация	3—12	6	$1,43 \pm 0,08$	$296,36 \pm 21,63$
	p		$<0,001$	$=0,2$
p_1			$<0,02$	$>0,2$

в сравнении со здоровыми детьми той же возрастной группы (см. табл. 1). Достижение субкомпенсации и компенсации у детей с СД легкой и средней степени, тяжелой форм и СД, выявленным впервые, сопровождалось достоверным повышением активности СОД при расчете на 1 мг гемоглобина. В этом случае активность фермента у детей 3—12 лет была даже выше, чем у здоровых детей того же возраста (см. табл. 1, 2). Различия в активности СОД при расчете на 1 мл эритроцитов не были достоверными в зависимости от степени компенсации заболевания у детей с СД средней тяжести, тяжелой формы III степени и СД, выявленным впервые. Отмечена и при этом способе расчета некоторая тенденция к возрастанию активности СОД у детей с компенсацией СД (см. табл. 1). У детей 13—14 лет с компенсированным СД активность фермента не отличалась от показателей у здоровых детей. Очевидно, особенности изменений активности СОД в этой возрастной группе связаны со стимуляцией всей эндокринной системы, в частности с интенсификацией продукции половых гормонов в пубертатный период. В предыдущих наших исследованиях обнаружено повышение активности СОД эритроцитов у здоровых детей по сравнению с другими возрастными группами, но существенных различий в активности в зависимости от пола отмечено не было [17]. У больных СД тяжелой формы в стадии субкомпенсации имела место тенденция к повышению активности фермента по сравнению с соответствующими значениями у больных в состоянии декомпенсации (см. табл. 1).

Активность КТ эритроцитов у детей с СД не изменялась при разной степени тяжести и компенсации заболевания и не отличалась от активности КТ у здоровых детей ($p > 0,2$; табл. 3).

Исследование продуктов ПОЛ показало различие в содержании конъюгированных диенов и диенкетонов в мембране эритроцитов в зависимости от степени компенсации СД. Были обнаружены более низкие значения содержания диен-

Таблица 3

Активность КТ эритроцитов у детей с СД

Степень тяжести и компенсации СД	Число обследованных	Активность каталазы, МЕ · 10 ⁴ ($M \pm m$)	
		на 1 г гемоглобина	на 1 мл эритроцитов
Здоровые дети	65	$14,70 \pm 0,30$	$3,31 \pm 0,10$
Легкая форма: декомпенсация	4	$14,93 \pm 2,18$	$2,96 \pm 0,59$
	6	$14,76 \pm 1,49$	$3,35 \pm 0,64$
Средняя тяжесть: декомпенсация	45	$15,79 \pm 0,66$	$3,38 \pm 0,17$
	19	$15,84 \pm 1,01$	$3,45 \pm 0,18$
Тяжелая форма: декомпенсация	16	$13,49 \pm 0,88$	$3,12 \pm 0,20$
	4	$16,18 \pm 2,35$	$3,56 \pm 0,67$
Выявленный впервые: декомпенсация	13	$15,23 \pm 1,23$	$3,67 \pm 0,37$
	9	$14,82 \pm 1,53$	$3,21 \pm 0,38$

Примечание. Достоверность различий показателей активности фермента в каждой группе детей по сравнению с соответствующими значениями контрольной группы $>0,2$; достоверность различий в зависимости от степени компенсации СД $>0,2$.

Содержание продуктов ПОЛ у детей с СД (в ед. опт. пл. на 1 мл эритроцитов, $M \pm m$)

Степень компенсации СД	Число обследованных	Конъюгированные диены	Диенкетоны
Декомпенсация	18	$81,15 \pm 11,29$	$29,16 \pm 2,81$
Субкомпенсация/компенсация <i>p</i>	16	$65,40 \pm 8,43$ >0,2	$20,70 \pm 2,89$ <0,05

кетонов у детей в состоянии субкомпенсации, чем при декомпенсации СД ($p < 0,05$). Различия в содержании конъюгированных диенов у детей с декомпенсацией и субкомпенсацией СД оказались статистически недостоверными (табл. 4). По данным литературы, у взрослых больных отмечалась активация процессов ПОЛ вне зависимости от степени компенсации диабета по сравнению с контрольной группой [7, 20].

Сообщалось также, что содержание конечного продукта ПОЛ — малонового диальдегида — в эритроцитах детей с СД зависит от степени его компенсации [21]. Наши данные не противостоят литературным. Снижение интенсивности ПОЛ в результате лечения инсулином может объясняться увеличением активности СОД. Фермент разрушает супероксид-анион-радикалы, являющиеся инициаторами свободнорадикальных реакций в организме [2, 27]. Увеличение активности СОД у обследованных нами детей с субкомпенсацией и компенсацией СД может быть связано со снижением разрушения фермента. По данным литературы, инсулин воздействует на СОД печени крыс на стадии как синтеза фермента (в сторону его уменьшения), так и распада (тормозя его) [12]. Полученные изменения в активности СОД могут быть также обусловлены уменьшением доли ее гликозилированной формы при компенсации СД. Установлено, что развитие заболевания у людей сопровождается неферментативной реакцией гликозилирования многих белков, в том числе и СОД [22, 24, 29]. Содержание гликозилированной формы СОД у больных СД возрастало в 1,5 раза. Повышение содержания такой формы фермента коррелировало со снижением активности СОД [22].

Хотя недостаточность инсулина не сопровождается значительными изменениями в активности антиоксидантных ферментов, нельзя полностью исключить регулирующее действие инсулина на антиоксидантную систему и соответственно на ПОЛ. Это предположение подтверждается тем, что активность СОД и содержание продуктов ПОЛ в эритроцитах у обследованных нами детей зависели от степени компенсации инсулинзависимого СД. Одновременное определение этих показателей может быть рекомендовано в качестве дополнительного теста для контроля за лечением детей с СД. Методы определения активности СОД и содержания диенкетонов не являются трудоемкими, не требуют специального оборудования и могут быть использованы в работе клинико-биохимических лабораторий.

1. *Браславская Г. М., Штейгардт Ю. И.* // Тер. арх.— 1980.— № 8.— С. 83—86.
2. *Владимиров Ю. А., Арчаков А. И.* Перекисное окисление липидов в биологических мембранах.— М., 1972.
3. *Грибаускас П. С., Норкус А. В., Чернышукене Р. Ч.* и др. // Пробл. эндокринолог.— 1986.— № 4.— С. 46—49.
4. *Галенок В. А., Диккер В. Е., Никонова И. К., Гостинская Е. В.* // Там же.— 1985.— № 1.— С. 25—29.
5. *Данилишина В. С., Жулкевич И. Д.* // Там же.— 1987.— № 4.— С. 15—18.
6. *Дубинина Е. Е., Сальникова Л. А., Раменская Н. П.* и др. // Вопр. мед. химии.— 1984.— № 5.— С. 28—33.
7. *Ефимов А. С., Науменко В. Г.* // Пробл. эндокринолог.— 1985.— № 1.— С. 6—9.
8. *Зверихановский Ф. А., Жулкевич И. В., Данилишина В. С., Жулкевич Г. Д.* // Там же.— 1987.— № 4.— С. 15—18.
9. *Ибраева М. Т., Даленов Е. Д., Балашов В. А.* и др. // Здравоохран. Казахстана.— 1986.— № 5.— С. 23—25.
10. *Касаткина Э. П.* // Пробл. эндокринолог.— 1986.— № 1.— С. 42—45.
11. *Кокунин В. А.* // Укр. биохим. журн.— 1975.— № 6.— С. 776—779.
12. *Комов В. П., Иванова Е. Ю.* // Вопр. мед. химии.— 1983.— № 5.— С. 79—82.
13. *Мажуль Л. М.* // Там же.— 1987.— № 2.— С. 41—44.
14. *Мазовецкий А. Г., Лауринавичус А. В., Завадский П. С.* и др. // Пробл. эндокринолог.— 1988.— № 3.— С. 32—37.
15. *Мхитарян В. Г., Агаджанов М. И., Геворкян Д. М.* и др. // Вестн. АМН СССР.— 1982.— № 9.— С. 15—19.
16. *Плацер Э., Видланова М., Кужела Л.* // Чехосл. мед. обозр.— 1970.— № 1.— С. 30—41.
17. *Сальникова Л. А., Дубинина Е. Е., Ефимова Л. Ф.* Супероксиддисмутазы и каталазы эритроцитов у онтогенезе человека // Рукоп. деп. в ВИНИТИ № 977—82 Деп.
18. *Смирнова О. М.* // Пробл. эндокринолог.— 1987.— № 6.— С. 40—44.
19. *Старосельцева Л. К., Косилова Е. С., Смурова Т. Ф.* и др. // Там же.— 1986.— № 1.— С. 19—22.
20. *Суханова Л. Я., Куликова Л. А., Галенок В. А.* и др. // Там же.— 1988.— № 2.— С. 16—17.
21. *Юсумбова А. М., Исрафалова П. М.* // Педиатрия.— 1987.— № 5.— С. 94.
22. *Arai Katsura, Iizuka Susumu, Tada Yoshiro et al.* // Biochim. biophys. Acta.— 1987.— Vol. 924, N 2.— P. 292—296.
23. *Beutler E.* Red Cell Metabolism. A Manual of Biochemical Methods.— New York, 1975.
24. *Fernandez-Cano M., Rubio R., Villaverde C.* et al. // Endocrinologia.— 1987.— Vol. 34, N 3.— P. 83—88.
25. *Fried R.* // Biochimie.— 1975.— Vol. 57, N 5.— P. 657—660.
26. *Hagglof B., Marklund S. L., Holgren G.* // Acta endocr. (Kbh.).— 1983.— Vol. 102, N 2.— P. 235—239.
27. *Lonsdale D.* // Year book of Nutritional Medicine, 1986.— New Canaan (Ct), 1986.— P. 85—113.
28. *Marklund S. L., Hagglof B.* // Clin. chim. Acta.— 1984.— Vol. 142, N 3.— P. 299—305.
29. *Vlassara H., Brawnice M., Cerami A.* // Clin. Chem.— 1986.— Vol. 32, N 10.— P. 337—341.

Получена 31.01.89

ACTIVITY OF ANTIOXIDANT ENZYMES AND LIPID PEROXIDATION IN ERYTHROCYTES OF CHILDREN WITH DIABETES MELLITUS

L. A. Sal'nikova, N. V. Musatova, N. I. Lopatina

Chair of Biochemistry, Pediatric Medical School, Leningrad

Alterations in superoxide dismutase activity, observed in erythrocytes of children with insulin-dependent form of diabetes mellitus, depended on the age of patients, severity and degree of the disease compensation. Content of lipid peroxidation products was also dissimilar in compensated and decompensated forms of diabetes mellitus. Activity of catalase in erythrocytes of patients was similar to corresponding values of healthy children and did not depend on the disease stage and severity. Estimation of superoxide dismutase activity and content of diene ketons were most suitable patterns for monitoring treatment of diabetes in children.

Г. Н. Фильченков

АССОЦИАЦИЯ [³H]-ДЕКСАМЕТАЗОНА ЦИТОПЛАЗМАТИЧЕСКИМИ РЕЦЕПТОРНЫМИ БЕЛКАМИ И ИХ ТРАНСЛОКАЦИЯ В ЯДРА КЛЕТОК ПЕЧЕНИ ПРИ СТАРЕНИИ

Институт радиобиологии АН Белорусской ССР, Минск

Как известно, молекулярный механизм действия глюкокортикоидных и других стероидных гормонов зависит от цитоплазматических рецепторных белков, которые в комплексе с гормоном оказывают влияние на функцию генома клетки-мишени [5].

Возрастное снижение функциональной активности органов-мишеней может быть связано с изменением цитоплазматической рецепции стероидных гормонов [7]. При этом имеются противоречивые сведения, свидетельствующие как о снижении [8, 9], так и о повышении [10, 11] цитоплазматической рецепции в клетках печени, выражающиеся в изменении числа мест связывания и их сродства к глюкокортикоидам [9, 12].

Отсутствие единого мнения, вероятно, связано с наличием в цитоплазме гепатоцитов различных стероидсвязывающих белков, а также возрастных особенностей их транслокации в ядро клеток, что в конечном итоге определило необходимость проведения настоящего исследования. Особое внимание обращено на изучение отдельных пулов цитоплазматических белков, связывающих глюкокортикоидные гормоны и способных транслоцироваться в ядро.

Методика

В экспериментах использовали белых беспородных крыс-самцов — молодых (6—7 мес) и старых (22—26 мес). Декапитацию животных проводили между 8 и 9 ч утра.

Цитоплазматическую фракцию гепатоцитов получали после перфузии печени охлажденным до 0—4 °С буферным раствором: 0,01 М трис-HCl, 0,145 М NaCl, pH 7,4. Печень помещали в гомогенизатор тефлон — стекло в соотношении печень — буфер 1:3 по объему. Гомогенизационный буфер включал 0,02 М трис-HCl, 0,01 М дитиотрейтол, 10 % (по объему) глицерин, pH 7,5. Полученный гомогенат центрифугировали при 105 000 g в течение 60 мин на центрифуге ВАК-601 (ГДР).

Ядра получали после гомогенизации печени (объемное соотношение 1:8) в буферном растворе, содержащем 0,25 М сахарозу, 0,003 М KCl, 0,005 М CaCl₂, 0,01 М трис-HCl, pH 8,3. Затем гомогенат фильтровали через 3—4 слоя марли, насливали на 2,3 М раствор сахарозы с 5 мМ CaCl₂ и центрифугировали 10 мин при 2000 g, где ядра осаждались на подушке 2,3 М сахарозы. Надосадок удаляли с помощью водоструйного насоса, а осадок перемешивали с 2,3 М сахарозой, доводя ее концентрацию с ядрами разведением до 1,9 М с повторным наложением этой суспензии на подушку, состоящую из 5—6 мл 2,3 М сахарозы с 5 мМ CaCl₂. Осадок ядер получали после центрифугирования при 100 000 g в течение 60 мин (ротор SW-28, центрифуга «Beckman-52 M»).

Для оценки параметров связывания рецепторных белков цитоплазмы гепатоцитов применяли [³H]-дексаметазон (фирмы «Amersham» с удельной радиоактивностью 40 Ci / ммоль) в концентрации 0,1—100 нМ. После инкубации белка (0,9—26,0 мг/мл) с указанной концентрацией гормона при 0—4 °С в течение 3 ч несвязавшийся стероид удаляли добавлением в пробирку по 0,1 мл/4 мг суспензии угля, покрытого декстраном. После 5 мин инкубации на холоду уголь осаждали центрифугированием. Уровень рецепторного связывания в

цитоплазме гепатоцитов определяли по разнице общего связывания меченого гормона и связывания того же стероида с прогретым цитозолем в течение 30 мин при 37 °С [18].

Для изучения гормонрецепторного взаимодействия с изолированными ядрами гепатоцитов цитозольный блок в различных концентрациях помещали в инкубационную среду, содержащую разные объемы буферного раствора, доводя этот объем до 0,9 мл и вводя 100 нМ [³H]-дексаметазона. После 3-часовой инкубации при 0—4 °С несвязавшийся стероид удаляли активированным углем. Затем часть супернатанта (0,2 мл) помещали во флакон для определения радиоактивности, а остальное количество комплексов переносили в предварительно охлажденные пробирки. К 0,4 мл цитозоля, содержащего различные концентрации белка и комплексов гормон — белок, прибавляли равное количество суспензии ядер гепатоцитов (4·10⁶) и инкубировали 1 ч при 0—4 °С. Пробирки регулярно встряхивали, а затем центрифугировали. После осаждения ядер надосадочную жидкость в объеме 0,2 мл отбирали для измерения радиоактивности. По разнице содержания гормонрецепторных комплексов (ГРК) в надосадочной жидкости до и после внесения ядер в среду инкубации судили о количестве комплексов, транслоцируемых в ядро. Параллельно определяли связывание [³H]-дексаметазона цитозолем, прогретым при 37 °С в течение 30 мин, с последующей инкубацией неспецифически образованных комплексов с ядрами гепатоцитов. Количество радиоактивности, поглощенное ядрами из прогретого цитозоля, учитывали как неспецифическое ядерное связывание, которое вычитали из общего. Наибольшее количество элиминирующихся комплексов из цитозоля в ядра, достигнутое в результате разведения цитозоля в пробирках буферным раствором, рассматривали как результат активации ГРК [19], считая его функционально-рецепторным пулом. В последующем при данном разведении цитозольного белка, но в присутствии различных концентраций [³H]-дексаметазона (0,1—100 нМ) в течение 3 ч инкубации при 0—4 °С получали заданные концентрации активированных ГРК, которые затем инкубировали с ядрами по методике, изложенной выше.

Спрявление концентрационных значений связывания гормона в координатах Скетчарда [13] для анализа гормонрецепторного взаимодействия, а также ассоциацию ГРК ядрами осуществляли математически с применением метода наименьших квадратов [6]. Концентрацию цитоплазматического белка определяли методом Лоури [12].

Результаты и обсуждение

Для количественной характеристики стероидсвязывающих свойств рецепторных белков цитоплазмы клеток печени молодых и старых животных использовался [³H]-дексаметазон, который не взаимодействует с нерепторными белками цитоплазмы и в отличие от кортикостерона и кортизола с большей аффинностью связывается с цитоплазматическими рецепторными молекулами гепатоцитов [15]. Это дает возможность определить не только свободную фракцию рецепторных связывающих участков цитоплазмы, но, вероятно, и общий пул рецепторных молекул за счет вытеснения кортикостерона меченым дексаметазоном. С учетом имеющихся в литературе данных о времени максимального насыщения цитоплазматических рецепторов [9] и времени замещения кортикостерона [16] проведено изучение связывания [³H]-дексаметазона цитозолем при длительности инкубации 3 и 20 ч (рис. 1). При этом было установлено, что при инкубации в течение 3 ч связывание [³H]-дексаметазона рецепторными белками равно или выше, чем при инкубации в течение 20 ч, причем это было характерно для цитоплазмы животных обеих возрастных групп при концентрациях белка от 0,9 до 26 мг/мл. Следовательно, инкубация [³H]-дексаметазона с цитозолем в течение 3 ч была достаточной, чтобы, по-видимому, вытеснить кортикостерон из его комплексов с рецепторами.

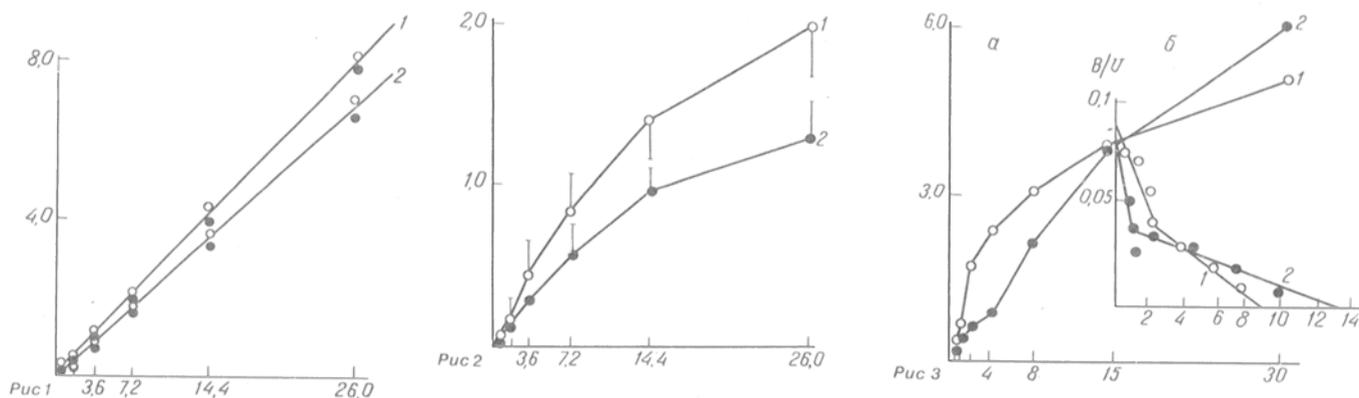


Рис. 1. Зависимость специфического связывания [³H]-дексаметазона от концентрации цитоплазматического белка клеток печени крысы.

1 — гормонбелковое взаимодействие в течение 3 ч при 0—2 °С, 2 — то же через 20 ч. Концентрация вносимого [³H]-дексаметазона — 100 нМ. По оси ординат — связанный [³H]-дексаметазон · 10⁻⁹ М; по оси абсцисс — концентрация белка, мг/мл. Светлые кружки — 6—7-месячные крысы, темные — 24—26-месячные.

Рис. 2. Зависимость специфического связывания цитоплазматических [³H]-дексаметазон-рецепторных комплексов (ГРК) ядрами клеток печени от концентрации цитоплазматического белка гепатоцитов.

1 — 6—7-месячные крысы, 2 — 24—26-месячные. По оси абсцисс: концентрация белка, мг/мл; по оси ординат — ядерное связывание · 10⁻⁹ М.

Рис. 3. Специфическое связывание [³H]-дексаметазона цитоплазматическими рецепторными белками клеток печени крысы.

а — концентрационное насыщение белков цитозоля [³H]-дексаметазоном; б — анализ связывания гормона цитоплазматическими белками в координатах Скетчарда. В/У — отношение связанного [³H]-дексаметазона к его свободной концентрации. 1 — 6—7-месячные крысы (концентрация белка 2,5 мг/мл), 2 — 24—26-месячные (концентрация белка 2,73 мг/мл). По оси абсцисс: а — концентрация [³H]-дексаметазона · 10⁻³ М; б — связанный [³H]-дексаметазон · 10⁻¹⁰ М; по оси ординат: а — связанный [³H]-дексаметазон · 10⁻¹⁰ М.

В последующих опытах выясняли влияние различных концентраций цитоплазматического белка, полученных путем разведения цитозоля буферным раствором, на величину гормонбелкового взаимодействия с ядрами гепатоцитов. Оценку связывания ГРК ядрами определяли по элиминации этих комплексов из цитоплазмы клеток печени. Прямой анализ связывания ГРК ядрами был бы менее точным из-за частичной потери связанных ГРК во время промывки ядер буфером и из-за неполной экстракции стероида этанолом. В представленном подходе с целью выявления возрастных особенностей активированного функционального пула ГРК применяли цитозоль, полученный из печени молодых и старых животных, а чтобы исключить влияние возможных возрастных изменений ядерных структур, использовали только ядра гепатоцитов молодых животных.

На рис. 2 приведены кривые зависимости связывания ядрами цитоплазматических ГРК молодых и старых крыс от концентрации белка в пробах. Как видно, прямо пропорциональную зависимость связывания ГРК ядрами наблюдали при концентрациях белка 1,8—3,6 мг/мл (разведение 30 % цитозоля 1:10—1:20). При меньших разведениях цитоплазмы ядерное связывание стремится к насыщению, вероятно, из-за повышения от-

носительной концентрации в пробах компонентов цитоплазмы, ингибирующих активацию и транслокацию [17]. При этом ядерное связывание ГРК старых крыс ниже, чем ГРК молодых животных, что особенно заметно при меньших разведениях цитозоля. Это позволяет предположить, что в цитоплазме старых крыс может быть выше концентрация ингибиторов как активации, так и транслокации.

В последующих опытах установлено, что кривые насыщения рецепторных участков связывания при возрастающих концентрациях меченого стероида, как уже было показано ранее другими авторами [18], являются двухкомпонентными (рис. 3). При анализе этих данных в координатах Скетчарда выявлено 2 класса участков связывания, существенно различающихся по их сродству к [³H]-дексаметазону. В табл. 1 суммированы параметры связывания дексаметазона высоко- и низкоаффинными рецепторами цитоплазмы гепатоцитов молодых и старых крыс. Как следует из этих данных, с возрастом суммарное содержание высоко- и низкоаффинных рецепторов практически не изменяется, концентрация высокоаффинных рецепторных молекул достоверно выше у молодых животных, тогда как низкоаффинный пул этих белков на такое же количество мест свя-

Таблица 1

Показатели специфического связывания [³H]-дексаметазона цитоплазматическими белками гепатоцитов с высокой и низкой степенью сродства у животных разного возраста

Возраст животных, мес	Степень сродства [³ H]-дексаметазона			
	высокая		низкая	
	константа ассоциации · 10 ⁸ М ⁻¹	количество мест связывания · 10 ⁻¹³ моль на 1 мг белка	константа ассоциации · 10 ⁷ М ⁻¹	количество мест связывания · 10 ⁻¹³ моль на 1 мг белка
6—7 (n=6)	3,0 ± 0,6	1,10 ± 0,07	4,5 ± 0,3	4,00 ± 0,18
24—26 (n=6)	5,3 ± 0,4*	0,60 ± 0,07*	3,2 ± 0,2*	4,39 ± 0,25

Примечание. Здесь и в табл. 2 и 3: звездочка — $p < 0,05$ относительно 6—7-месячных животных.

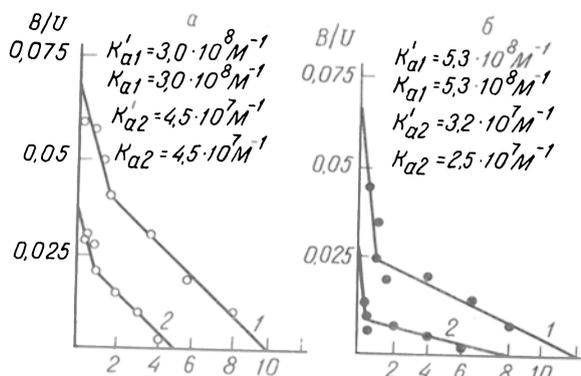


Рис. 4. Возрастные особенности транслокации активированных $[^3\text{H}]$ -дексаметазон-рецепторных комплексов в ядра гепатоцитов, анализируемые в координатах Скетчарда.

1 — концентрации активированных ГРК до внесения ядер в инкубационную среду, 2 — остаточная концентрация ГРК после их транслокации в ядро: а — 6–7-месячные крысы, б — 24–26-месячные. По оси абсцисс — концентрация связанного $[^3\text{H}]$ -дексаметазона $\cdot 10^{-10}$ М.

зывания для синтетического лиганда выше в цитоплазме клеток печени старых самцов. Обращает на себя внимание и тот факт, что с возрастом несколько повышается сродство к дексаметазону высокоаффинной фракции рецепторных молекул, тогда как сродство низкоаффинных рецепторов снижается.

Более детальный анализ кинетических характеристик гормонрецепторного взаимодействия проведен с участием ядер гепатоцитов (рис. 4), который показал, что пул высокоаффинных рецепторов в цитоплазме как молодых, так и старых животных гомогенен. Об этом свидетельствует тот факт, что относящиеся к высокоаффинному связыванию отрезки прямых на координатах Скетчарда, характеризующие связывание $[^3\text{H}]$ -дексаметазона белками цитоплазмы до и после инкубации с ядрами, практически параллельны для молодых и для старых животных. Следовательно, инкубация с ядрами привела к уменьшению количества высокоаффинных рецепторов в цитоплазме, однако оставшиеся проявляют точно такое же сродство к дексаметазону, какое отмечали до инкубации с ядрами.

Иная ситуация наблюдается для низкоаффинных рецепторов. У молодых животных инкубация с ядрами ведет к уменьшению концентрации этих рецепторов без изменения их сродства к дексаметазону, а у старых отмечается как повышение концентрации остаточного пула низкоаффинных рецепторов в объеме инкубации после осаждения ядер, так и уменьшение их сродства к дексаметазону. Этот результат можно объяснить, вероятно, тем, что пул низкоаффинных рецепторов в цитоплазме печени старых крыс гетерогенен. Наряду с рецепторами, близкими по свойствам или идентичными низкоаффинным рецепторам цитоплазмы печени молодых крыс ($K_{a1} = 4,5 \cdot 10^7 \text{ M}^{-1}$), присутствуют молекулы, связывающие дексаметазон с меньшим сродством ($K_{a2} = 2,5 \cdot 10^7 \text{ M}^{-1}$). Следовательно, определенная $K_{a2} = 3,1 \cdot 10^7 \text{ M}^{-1}$ является кажущейся константой ассоциации гетерогенного пула низкоаффинных рецепторов. При этом наиболее низкоаффинные рецепторы, появляющиеся при старении, в меньшей мере способны транслоцироваться в ядро, что подтверждается данными после инкубации цитозоля с ядрами.

Таблица 2

Возрастные особенности связывания цитоплазматических высокоаффинных $[^3\text{H}]$ -дексаметазон-рецепторных комплексов с ядрами клеток печени

Возраст, животных, мес	Содержание ГРК в цитоплазме гепатоцитов до инкубации их с ядрами $\cdot 10^{-13}$ моль на 1 мг белка	Содержание ГРК в цитоплазме гепатоцитов после инкубации их с ядрами $\cdot 10^{-13}$ моль на 1 мг белка	Убыль ГРК за счет связывания ядрами $\cdot 10^{-13}$ моль на 1 мг белка
6—7 (n=4)	1,10 \pm 0,07	0,49 \pm 0,03	0,61 \pm 0,02
24—26 (n=4)	0,60 \pm 0,07*	0,26 \pm 0,01*	0,34 \pm 0,01*

Таблица 3

Возрастные особенности связывания цитоплазматических низкоаффинных $[^3\text{H}]$ -дексаметазон-рецепторных комплексов с ядрами клеток печени

Возраст, животных, мес	Содержание ГРК в цитоплазме гепатоцитов до инкубации их с ядрами $\cdot 10^{-13}$ моль на 1 мг белка	Содержание ГРК в цитоплазме гепатоцитов после инкубации их с ядрами $\cdot 10^{-13}$ моль на 1 мг белка	Убыль ГРК за счет связывания ядрами $\cdot 10^{-13}$ моль на 1 мг белка
6—7 (n=4)	4,0 \pm 0,2	1,7 \pm 0,1	2,3 \pm 0,2
24—26 (n=4)	4,4 \pm 0,3	2,6 \pm 0,2*	1,8 \pm 0,2

Как видно из табл. 2 и 3, с возрастом существенно снижается транслокация в ядро высокоаффинных ГРК, что может быть связано с уменьшением их концентрации в цитоплазме. Транслокация низкоаффинных ГРК составляет почти ту же величину, что и для молодых самцов. Важен тот факт, что пул рецепторных белков у молодых животных, относящийся к низкоаффинным ГРК, до и после инкубации их с ядрами имеет одну и ту же константу сродства ($4,5 \cdot 10^7 \text{ M}^{-1}$) и количество связывающих мест $4,0 \cdot 10^{-13}$ моль на 1 мг белка, тогда как в цитоплазме гепатоцитов старых крыс аналогичное сродство имеет только 50 % содержащихся ГРК, которые транслоцируются в ядро ($N = 1,8 \cdot 10^{-13}$ моль на 1 мг белка). Вторая половина рецепторных молекул у старых животных в цитоплазме клеток печени имеет совершенно иное сродство ($2,5 \cdot 10^7 \text{ M}^{-1}$) к дексаметазону и, следовательно, не может быть отнесена к общему пулу рецепторных белков. Эти данные могут свидетельствовать, что функционально активный пул низкоаффинных ГРК также снижается при старении более чем в 2 раза.

Такие изменения с возрастом могут быть связаны с рядом факторов. Так, пул высокоаффинных ГРК может снижаться в результате уменьшения рецепции глюкокортикоидов плазматическими мембранами гепатоцитов при старении [1] или повышения в этом возрастном периоде свободных форм гормона в крови [2] вследствие появления отрицательной кооперативности между гормонсвязывающими центрами траискортина [3]. В этих условиях может увеличиваться концентрация глюкокортикоидов в клетках печени, что может приводить к истощению или угнетению механизмов гормональной регуляции синтеза рецепторных молекул [4].

Наряду с этим повышение кортикостероидов в клетке, как правило, приводит и к увеличению

поступления ГРК из цитоплазмы в ядро. Освобождающиеся при этом компоненты, препятствующие процессам активации и транслокации, накапливаясь в цитоплазме, вероятно, еще в большей степени ингибируют переход остаточного количества рецепторных комплексов в ядро, являясь как бы своего рода регуляторами принципа обратной связи. Можно также полагать, что переход основного объема комплексов в ядро сопровождается и истощением в цитоплазме модуляторов активации ГРК, участвующих в процессах рециклирования рецепторов до их функционального состояния. Предполагаемый механизм возрастного изменения соотношения указанных компонентов, ответственных за доставку ГРК в геном клеток, по-видимому, способствует накоплению внутри клеток нефункциональных рецепторов, увеличивая их свободный пул при старении [9—11], который по своим характеристикам связывает [³H]-дексаметазон с меньшим сродством [9, 11]. Аналогичная зависимость наблюдается и в наших экспериментах, где снижение сродства рецепторных белков к глюкокортикоиду обусловлено накоплением в цитоплазме клеток печени старых самцов связывающих [³H]-дексаметазон белков со «сверхнизким» сродством ($2,5 \cdot 10^7 \text{ M}^{-1}$), не способных к транслокации. Поэтому эти белки в достоверно большей концентрации ($p < 0,05$) и остаются в цитоплазме (см. табл. 3) после связывания функциональных ГРК ядрами клеток печени.

Таким образом, на основании полученных данных можно заключить, что функционально активный пул рецепторных молекул цитоплазмы клеток печени для животных обеих возрастных групп состоит из белков, способных транслоцироваться в комплексе со стероидом в ядра гепатоцитов, различающихся как по константам сродства к дексаметазону, так и их количественному содержанию. Старение животных сопровождается более чем 2-кратным снижением обеих форм рецепторных молекул цитоплазмы гепатоцитов и появлением с возрастом «сверхнизкоаффинного» их пула, не способного к транслокации.

ЛИТЕРАТУРА

1. Конопля Е. Ф., Ластовская Т. Г., Фильченко Г. Н. // Вести. АН БССР.— 1985.— № 2.— С. 81—84.
2. Беккер В. И. Функциональное состояние коры надпочечников в процессе старения: Автореф. дис. ... канд. мед. наук.— Киев, 1967.
3. Амаросьев А. П., Остапенко В. А., Фильченков Г. П. // Докл. АН БССР.— 1987.— Т. 31, № 10.— С. 948—951.
4. Мертвцов Н. П. Гормональная регуляция экспрессии генов.— М., 1986.
5. Физиология гормональной рецепции / Шаляпина В. Г., Арутюнян В. Б., Бабичев И. А. и др.— Л., 1986.
6. Чарыков А. К. Математическая обработка результатов химического анализа.— Л., 1984.
7. Hess G. D., Roth G. S. // Ageing and Cell Function.— New York, 1984.— P. 149—185.
8. Singer S., Ito H., Litwack G. // Int. J. Biochem.— 1973.— Vol. 4.— P. 569—573.
9. Bolla R. // Mech. Ageing Develop.— 1980.— Vol. 12.— P. 249—259.
10. Kalimi M., Gupta S., Hubbard J., Greene K. // Endocrinology.— 1983.— Vol. 112, N 1.— P. 341—347.
11. Rosmarie M. // Gesellschaft für Gerontologie der DDR: Kongress, 10.— Berlin, 1986.— S. 126—132.
12. Petrovic J. S., Markocik R. Z. // Develop. Biol.— 1975.— Vol. 45.— P. 176—185.
13. Lowry O. H., Rosebrough N. J., Farr A. L., Randall R. J. //

- J. biol. Chem.— 1951.— Vol. 193.— P. 165—175.
14. Scatchard G. // Ann. N. Y. Acad. Sci.— 1949.— Vol. 51.— P. 660—672.
15. Litwack G., Mayer M., Ohl V., Sekula B. // Gen. Regul. Ster. Horm.— 1983.— N 2.— P. 135—145.
16. Rosner W., Polimeni S. // Steroids.— 1978.— Vol. 31.— P. 427—430.
17. Josohashi F., Terada M., Tsukanaka K., Sakamoto Y. // J. Biochem. (Tokyo)— 1980.— Vol. 88.— P. 775—781.
18. Roth G. S. // Endocrinology.— 1974.— Vol. 94.— P. 82—96.
19. Schmidt T. I., Litwack G. // Physiol. Rev.— 1982.— Vol. 62, N 4.— P. 1131—1192.

Поступила 06.01.89

ASSOCIATION OF ³H-DEXAMETHASONE WITH CYTOPLASMIC RECEPTOR PROTEINS AND THEIR TRANSLOCATION INTO THE LIVER CELL NUCLEI DURING AGEING

G. N. Fil'chenkov

Institute of Radiology, Academy of Sciences of the Byelorussian SSR, Minsk

Interaction of ³H-dexametasone with cytoplasmic proteins was studied in male rat liver cells. With ageing of the animals concentration of high affinity and low affinity glucocorticoid receptors was decreased 2-fold as well as the corresponding reduction of nuclear uptake in the steroid-receptor complexes was found. A protein species was found in cytoplasm of aged rat hepatocytes, which bound ³H-dexametasone with "extremely low" affinity and was not able to associate with the cell nuclei.

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 1990

УДК 612.124.017.1:547.961.06:577.152.1

А. Е. Алексеева, Т. А. Погапкина, В. Н. Прозоровский

АНТИПЕПТИДНЫЕ АНТИТЕЛА, СПЕЦИФИЧНЫЕ К N-КОНЦЕВОМУ РАЙОНУ ЛДГ МЫШЦЫ СВИНЬИ

НИИ медицинской энзимологии АМН СССР, Москва

ЛДГ является диагностически ценным ферментом, интерес к нему возрос после того, как было обнаружено специфическое распределение по разным органам и тканям изоферментов ЛДГ (ЛДГ-1 — ЛДГ-5). Изоферменты М₄ (ЛДГ-5) в основном содержатся в скелетной мышце, Н₄ (ЛДГ-1) — в тканях сердечной мышцы [5]. Повышение количества ЛДГ-1 и ЛДГ-2 является характеристикой инфаркта и гемолитической анемии, в то время как уровень ЛДГ-5 возрастает при гепатитах и остром повреждении клеток печени [2].

В настоящее время широко распространено получение антител (АТ) на определенные поверхностные участки молекулы белка (антигенные детерминанты), для чего в основном используют небольшие синтетические пептиды [6, 8—10]. В большинстве случаев антипептидные АТ реагируют не только с самим пептидом, но и с тем районом целого белка или фермента, откуда этот пептид был изолирован.

Ранее нами было показано, что N-концевой район ЛДГ мышцы свиньи, который несет на себе большие структурные отличия в различных изоформах фермента, содержит в своем составе антигенную детерминанту [1].

С целью получения антипептидных АТ ЛДГ-5

мышцы свиньи, которые бы избирательно реагировали с различными изоферментами ЛДГ, и был выбран N-концевой фрагмент ЛДГ-5 свиньи (1—32 аминокислоты, N-концевой пептид, выделенный из BrCN-гидролизата карбоксиметилированной ЛДГ-5 свиньи). Получен его конъюгат с бычьим сывороточным альбумином (БСА), который был охарактеризован в отношении антигенности и эпитопной плотности [1]. Данная работа посвящена получению антипептидных антисывороток (АС) к N-концевому участку ЛДГ-5 свиньи, конъюгированному с БСА, выделению и очистке специфических антипептидных АТ, их характеристикам.

Методика

С целью получения АС к конъюгату (N-концевой пептид ЛДГ-5 мышцы свиньи — БСА, эпитопная плотность 4 : 1) иммунизировали кроликов-самок породы шиншилла (масса тела примерно 2,5 кг) конъюгатом (400 мкг) в физиологическом растворе с полным адьювантом Фрейнда (равные объемы) по следующей схеме: подкожная инъекция в бедро в 10 мест, затем подкожно в 10 мест вдоль позвоночника, внутримышечно, в лимфатические подколленные узлы, в конъюнктиву глаза, в подушечки лап кролика. Иммунизацию проводили в течение 2 мес с недельными перерывами между иммунизациями. Через 7, 10, 12 дней после последней иммунизации брали кровь из ушной вены кролика, выдерживали при 37 °С в течение 2 ч, центрифугировали при 3000 об/мин 10 мин. Сыворотку лиофилизировали. Через 1 мес проводили реиммунизацию животных.

Титр и специфичность АС определяли методом двойной иммунодиффузии по Оухтерлони [4].

Специфичность антипептидной АС и антипептидных АТ в отношении N-концевого пептида и конъюгата определяли методом твердофазного иммуноферментного анализа (ИФА) — вариант конкурентного метода [1]. Тест Элиса ставили в 96-луночных микроплатах (фирмы «Titertech», Великобритания; «Dunatex», США). Для оценки уровня АТ использовали диагностические АТ против иммуноглобулинов кролика, меченные пероксидазой (Институт эпидемиологии и микробиологии им. Н. Ф. Гамалеи). В качестве субстрата использовали о-фенилендиамин (фирма ВДН, США). Количество продукта реакции в каждой лунке определяли спектрофотометрически при $\lambda=490$ нм на спектрофотометре Unicam SP-800 (Великобритания).

Для проверки специфичности антипептидных АТ и АС в отношении ЛДГ-5 свиньи использовали непрямой тест Элиса. Иммунизацию антигена ЛДГ-5 (10 мкг) на твердой фазе проводили в 0,01 М фосфатном буфере pH 9,4 в объеме 200 мкл при 4 °С в течение ночи. Несвязавшееся количество антигена удаляли промыванием дистиллированной водой, а затем 0,01 М фосфатным буфером pH 7,4 и 0,1 М NaCl и 0,05 % тритоном X-100 (ТФБ). Антипептидную АС или АТ вносили в лунки и инкубировали 3 ч при 37 °С, отмывали, как указано выше, и добавляли 200 мкл раствора (1 мкг/мл) диагностических АТ. После инкубации при 37 °С в течение 3 ч иммобилизованный антиген отмывали от избытка АТ и добавляли 200 мкл субстратной смеси (0,01 % спиртовой раствор о-фенилендиамина, 0,06 % раствор H_2O_2 в 0,05 М цитратном буфере pH 4,8). Через 30—40 мин

реакцию останавливали добавлением 50 % раствора H_2SO_4 . Иммуносорбенты для выделения специфических антипептидных АТ к N-концевому пептиду ЛДГ-5 получали на основе антигена — ЛДГ-5 свиньи ковалентным связыванием молекул белка глутаровым альдегидом [3]. 750 мл ЛДГ-5 растворяли в 10 мл 0,1 М фосфатного буфера pH 7,0. По каплям с перемешиванием добавляли 3 мл 2,5 % водного раствора глутарового альдегида. Через 3 ч при комнатной температуре образовывался гель. Его измельчали на гомогенизаторе при небольшой скорости вращения в 0,2 М фосфатном буфере pH 7,3. Суспензию центрифугировали, осадок отмывали тем же буфером с повторными гомогенизациями до прозрачности надосадка ($E_{280} < 0,01$). Затем промывали 0,2 М глицин-HCl-буфером pH 2,8 и 0,01 М фосфатным буфером pH 7,0, содержащим 0,15 М NaCl.

Для выделения специфических антипептидных АТ на иммуносорбент наносили 20—25 мл антипептидной кроличьей АС, перемешивали в течение 30 мин на механической мешалке, затем оставляли стоять на 1,5 ч при 20 °С. Центрифугировали при 1000 g 15 мин при 4 °С, промывали сорбент от несвязавшегося материала забуференным раствором соли — 0,01 М фосфатным буфером pH 7,0 с 0,15 М NaCl 3—4 раза до прозрачности надосадка при $\lambda=280$ нм. Элюцию АТ с иммуносорбента проводили 0,2 М глицин-HCl-буфером по 5—7 мл 4 раза, перемешивали 10—15 мин с промежуточным центрифугированием при 6000 g в течение 15 мин при 4 °С. В полученных фракциях антипептидных АТ определяли спектрофотометрически содержание белка при $\lambda=280$ нм; доводили pH во фракциях до 7,0 добавлением 0,1 М раствора трис-основного. Полученный материал лиофилизировали и хранили при 0 °С. Перед использованием АТ диализовали против соответствующего буфера.

Активность ЛДГ определяли на анализаторе скорости ферментативных реакций («Энзимат», «Advanced products», Италия). В качестве субстрата использовали пируват натрия и НАД· H_2 в 0,05 М фосфатном буфере pH 7,5. Измерение проводили при $\lambda=390$ нм в течение 30 с.

Результаты и обсуждение

Полученная АС образовывала полосу преципитации с конъюгатом пептида, титр антипептидной АС при концентрации конъюгата 2 мг/мл был равен 1:128. Не обнаружено полосы преципитации при реакции антипептидной АС с N-пептидом ЛДГ-5 и с нативной молекулой фермента. АС давала перекрестную реакцию с БСА.

Для проверки специфичности антипептидной АС в отношении N-концевого пептида и ЛДГ-5 мы использовали метод твердофазного ИФА. При иммобилизации на планшеты пептида или конъюгата результаты ИФА были неудовлетворительные (слабое окрашивание субстратной смеси и низкое поглощение при $\lambda=490$ нм), что, по-видимому, обусловлено низкой связывающей способностью пептида с полистиролом. Сорбирование на планшеты АС также дало неудовлетворительные результаты. С помощью непрямого теста Элиса было показано, что антипептидная АС взаимодействует с нативной молеку-

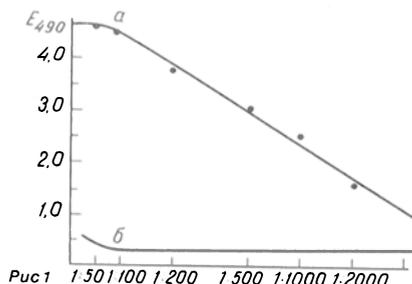


Рис. 2. Связывание ЛДГ-5 мышцы свиньи с антипептидными АТ к N-концевому фрагменту ЛДГ-5.

По оси абсцисс — разведение антипептидных АТ. а — антипептидные АТ к N-концевому пептиду ЛДГ-5 свиньи (концентрация антител до разведения 0,6 мг/мл); б — сыворотка кроликов до иммунизации; в — БСА.

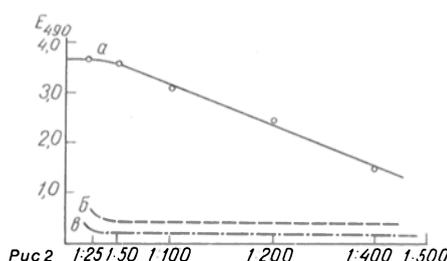


Рис. 1. Взаимодействие нативной ЛДГ-5 свиньи с антипептидной АС, полученной к N-концевому пептиду ЛДГ-5 (метод ИФА, непрямой тест Элиса).

По оси абсцисс — разведение антипептидной АС; ЛДГ-5 (10 мкг) иммобилизована на каждую лунку планшета. а — антипептидная АС к N-концевому пептиду ЛДГ-5 свиньи; б — сыворотка кроликов до иммунизации (контроль).

лой ЛДГ (рис. 1), что в дальнейшем и было использовано при определении специфичности АС в отношении N-пептида. Отмечена зависимость реакции антигена (ЛДГ-5) с антипептидными АТ от разбавления АС. Титр антипептидной АС, установленный по реакции взаимодействия с нативной ЛДГ-5 методом ИФА, был равен 1:2500. В качестве контроля использовали сыворотку, взятую у кроликов до иммунизации.

Предварительная инкубация антипептидной АС с различными концентрациями (10^{-2} — 10^{-3} мкМ) N-концевого пептида и конъюгата приводила к снижению взаимодействия ЛДГ-5 с антипептидными АТ. Было показано, что при исследуемых концентрациях конъюгат (N-пептид — БСА) тормозил реакцию связывания антиген — антитело на 45—60 %, N-пептид — на 30—50 %, ЛДГ (10^{-3} — 10^{-4} мкМ) — на 40—55 %. Следовательно, полученные результаты позволяют заключить, что антипептидная АС к конъюгату N-концевого пептида ЛДГ-5 свиньи с БСА специфична в отношении конъюгата, N-пептида и нативной молекулы ЛДГ-5.

В непрямом тесте Элиса было установлено, что антипептидные АТ (рис. 2) взаимодействовали с целой молекулой ЛДГ-5. АТ были специфичны в отношении конъюгата (N-пептид — БСА), N-концевого пептида ЛДГ-5, что, как и в случае с антипептидной АС, определяли по торможению конъюгатом и пептидом реакции взаимодействия ЛДГ-5 с антипептидными АТ. Были подобраны оптимальные концентрации антипептидных АТ, которые использовались для проверки специфичности АТ. АТ не давали перекрестную реакцию с БСА.

Таким образом, антипептидные АТ к N-концевому участку ЛДГ-5 свиньи специфичны в отношении N-концевого пептида ЛДГ-5, конъюгата на основе этого пептида с БСА, а также целой молекулы ЛДГ-5.

Из данных литературы [7] известно, что N-концевой район ЛДГ-5 (1—20 аминокислоты) и C-концевой участок (259—331 аминокислоты) входят в состав каталитического домена молекулы фермента. Интересным представлялось выяснение влияния полученных антипептидных АТ к N-концевому пептиду на активность фермента, что давало бы возможность установить роль N-концевого района ЛДГ-5 в процессе катализа. Антипептидные АТ, предварительно диализованные против 0,05 М фосфатного буфера pH 7,5, инкубировали при 20 °С с различными концентрациями ЛДГ-5 свиньи в течение 30 мин. Параллельно в тех же условиях исследовали влияние АТ к нативной ЛДГ-5 свиньи на активность фермента. АТ к нативной ЛДГ снижали активность фермента на 40 и 60 % при молярном соотношении ЛДГ:АТ 1:20 и 1:40 соответственно. Для антипептидных АТ отмечено незначительное влияние на активность ЛДГ-5 по сравнению с АТ к нативной молекуле фермента.

Полученные результаты позволяют сделать вывод, что антипептидные АТ к N-концевому пептиду ЛДГ-5 мышцы свиньи не влияют на активность фермента, т. е. связывание АТ с N-концевым участком ЛДГ не создает стерических препятствий и не влияет на конформацию активного

центра фермента. По-видимому, N-концевой участок ЛДГ-5 не содержит в своем составе аминокислотные остатки, которые входили бы в активный центр фермента. Это подтверждает данные работы [7] о том, что N-концевой район молекулы ЛДГ не принимает непосредственного участия в процессе катализа.

ЛИТЕРАТУРА

1. Алексеева А. Е., Гребенщикова О. Г., Потапкина Т. А., Проzorовский В. Н. // Вопр. мед. химии.— 1989.— № 4.— С. 66.
2. Вилкинсон Д. Принципы и методы диагностической энзимологии: Пер. с англ.— М., 1981.— С. 61—71.
3. Остерман Л. А. Исследование биологических макромолекул электрофокусированием, иммуноэлектрофорезом и радиоизотопными методами.— М., 1983.— С. 110.
4. Bailey G. S., Clifton N. J. // Meth. molec. Biol.— 1984.— Vol. 1.— P. 301—310.
5. Everse J., Berger R. L., Kaplan N. // Science.— 1970.— Vol. 168.— P. 1236—1238.
6. Hopp T. P., Wood K. R. // Proc. nat. Acad. Sci. USA.— 1981.— Vol. 78.— P. 3824—3828.
7. Kiltz H., Kell W., Griesbach M. et al. // Hoppe-Seyler's Z. physiol. Chem.— 1977.— Vol. 358.— P. 123—127.
8. Lerner R. A., Sutcliffe J. G., Shinnick T. M. // Cell.— 1981.— Vol. 23.— P. 109—110.
9. Walter G., Hutchinson M. A., Hunter T., Eckhart W. // Proc. nat. Acad. Sci. USA.— 1982.— Vol. 79.— P. 4025—4029.
10. Walter G., Scheidtmann K. H., Green N. et al. // Nature.— 1980.— Vol. 289.— P. 366—373.

Поступила 15.05.88

ANTIPEPTIDE ANTIBODIES, SPECIFIC TO N-TERMINAL SITE OF LACTATE DEHYDROGENASE FROM PIG MUSCLE TISSUE

A. E. Alexeeva, T. A. Potapkina, V. N. Prozorovskiy

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

Antipeptide antisera were obtained after immunization of rabbits with N-terminal peptide of pig muscle lactate dehydrogenase-5 containing the enzyme antigen determinant. The N-terminal peptide (1-32 amino acids) was conjugated with bovine blood serum albumin. Specific antipeptide antibodies were isolated and purified using immunosorbent involving the antigen — lactate dehydrogenase-5. Immunodiffusion procedure and immunoenzymatic assay showed that the antipeptide antibodies obtained were specific towards conjugate, N-terminal peptide and the native pig muscle lactate dehydrogenase-5. The antipeptide antibodies towards N-terminal fragment of lactate dehydrogenase did not affect the enzymatic activity.

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 1990

УДК 616.154.94:[615.22:517.918]-078.833

С. М. Крылова, О. А. Стафеева, А. П. Савицкий, М. М. Диков, Г. А. Ермолин

ТВЕРДОФАЗНЫЙ ФЛЮОРЕСЦЕНТНЫЙ ИМУНОАНАЛИЗ ДИГИТОКСИНА

Институт биохимии им. А. Н. Баха АН СССР; Всесоюзный кардиологический научный центр АМН СССР, Москва

Иммунохимические методы анализа нашли широкое применение в медицинской практике для диагностики и контроля лекарственной терапии различных заболеваний [9]. Среди альтернативных методов — радиоиммунного, иммуноферментного и иммунофлюоресцентного — последний не

уступает двум другим по чувствительности, но является по сравнению с ними наиболее простым, быстрым и легко воспроизводимым. К преимуществам флуоресцентной метки по сравнению с ферментативной и радиоизотопной следует отнести ее стабильность в течение длительного времени, а также отсутствие радиационного повреждения лиганда и опасности облучения персонала [9, 10].

Для повышения чувствительности флуоресцентного иммуноанализа ранее было предложено использовать в качестве метки копропорфирин I [3]. Данная флуоресцентная метка применима для определения белковых [4] и вирусных [2] антигенов, причем чувствительность разработанных методов практически не уступает иммуоферментному методу.

Целью данной работы была разработка иммуофлуоресцентного метода определения низкомолекулярного соединения — дигитоксина.

Дигитоксин — кардиотоническое средство, один из наиболее активных гликозидов наперстянки пурпуровой. Терапевтическая доза препарата отличается от летальной всего в несколько раз. Препарат дозируют индивидуально. Необходимость точного контроля содержания в крови усвоенного организмом человека дигитоксина делает его применение ограниченным [1].

Использование высокочувствительных методов определения данного кардиогликозида в крови пациентов позволило бы расширить сферу его применения и добиться лучшего терапевтического эффекта.

Методика

Получение специфической сыворотки к дигитоксину и ее тестирование иммуопероксидазным методом проводили, как описано ранее [6]. Титр использованных в работе сывороток был не менее 5000.

Синтез конъюгатов дигитоксина с человеческим сывороточным альбумином, овальбумином (ОВА) и соевым ингибитором трипсина (СИТ), а также определение соотношения белок — дигитоксин в этих конъюгатах проводили по методу, предложенному для дигитоксина [7].

На I стадии получения конъюгата проводили окисление концевых гликозидного остатка дигитоксина перйодатом натрия. Дигидрид вводили далее в реакцию с аминогруппами белка. Полученное нестабильное основание Шиффа было восстановлено при слабощелочном pH до амина боргидридом натрия. Следует отметить, что окислительно-восстановительный потенциал боргидрида меньше потенциала лактоновой группы, так что дигитоксигенин (фрагмент, ответственный за фармакологическое действие препарата) остается в реакции незатронутым. Полученный конъюгат отделяли от непрореагировавшего дигитоксина диализом против воды. Число молекул дигитоксина, связанных с одной молекулой белка, составило 3 и 5 для СИТ и ОВА соответственно. Конъюгаты при хранении были стабильными и сохраняли иммунологическую активность в реакции иммуо-преципитации.

В работе использовали фракции антител, полученные высаливанием специфической сыворотки сульфатом аммония от 0 до 40 % насыщения, отдиализованные против 0,01 М натрий-фосфатного буфера pH 7,4, содержащего 0,15 М NaCl. Конъюгаты антител с копропорфирином I синтезировали по методу [3]. Полученный конъюгат антитела — копропорфирин I освобождали от избытка порфирина при помощи жидкостной хроматографии высокого давления. Хроматографию проводили на хроматографе фирмы «Waters» со спектрофотометрическим и флуоресцентным детекторами на колонке TSK 3000, используя в качестве элюента 50 мМ калий-фосфатный буфер pH 7,4.

В полученном после хроматографии растворе конъюгата определяли концентрацию белка и количество молекул

порфирина, ковалентно связанных с молекулой белка, принимая ϵ_{393} копропорфирина равным $1,65 \cdot 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$, а поглощение 0,1 % раствора антител равным 1,4. Молекул копропорфирина в конъюгате с антителами было от 1 до 5 в зависимости от препарата. Полученный раствор конъюгата непосредственно использовали в работе.

Все измерения флуоресценции проводили на спектрофлуориметре «Hitachi MPF-4» (Япония).

Результаты и обсуждение

Нами разработан твердофазный иммуофлуоресцентный метод определения концентрации дигитоксина с использованием новой флуоресцентной метки копропорфирина I. В качестве твердой фазы применяли стандартные 96-луночные полистирольные планшеты, получившие широкое распространение в научных и клинических исследованиях, выполняемых методом ELISA.

Так как дигитоксин является низкомолекулярным соединением, для его иммобилизации на поверхности полистирольного планшета необходимо получение конъюгата данного кардиогликозида с белком-носителем. Анализ проводили с использованием конъюгатов СИТ — дигитоксин и ОВА — дигитоксин, полученных по методу [7].

Для определения содержания дигитоксина в сыворотке крови нами предложен метод, основанный на конкурентной схеме. Дигитоксин в виде его конъюгатов с белком-носителем иммобилизовали на поверхности планшета. Затем ячейки планшета заполняли раствором, содержащим свободный дигитоксин или образец и антитела, меченные порфирином. При этом дигитоксин, иммобилизованный на поверхности планшета, конкурировал со свободным дигитоксином в определяемом образце за центры связывания на молекуле специфического антитела, меченного флуоресцентной меткой. После прохождения иммунологической реакции раствор выливали, планшет промывали 0,01 М натрий-фосфатным буфером pH 7,4, содержащим 0,15 М NaCl и поверхностно-активные вещества, и десорбировали меченые антитела с поверхности в раствор согласно [3].

Нами была проведена оптимизация каждой из

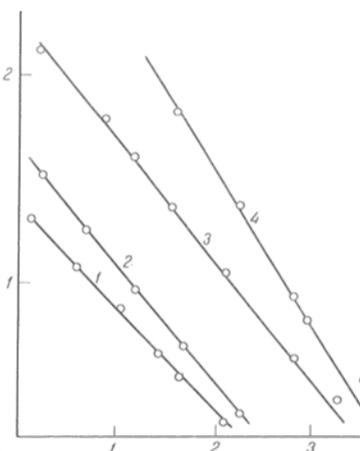


Рис. 1. Адсорбция на планшете конъюгата СИТ — дигитоксин в зависимости от его концентрации.

1 — контроль, адсорбция на планшете СИТ; 2—3 — адсорбция конъюгата СИТ — дигитоксин при концентрации 0,3, 3 и 30 мкг/мл соответственно. По оси ординат здесь и на рис. 2, 3 — lg интенсивности флуоресценции; по оси абсцисс здесь и на рис. 2 — lg разведения меченых антител.

стадий твердофазного анализа дигитоксина. Найдено, что на I стадии оптимальной является иммобилизация кардиогликозида на полистирольных планшетах в виде его конъюгатов с СИТ или ОВА из 0,01 М калий-фосфатного буфера рН 7,4 с 0,15 М NaCl. Концентрация растворов конъюгатов должна быть не ниже 30 мкг/мл (рис. 1).

На II стадии твердофазного анализа после промывки от раствора белкового конъюгата дигитоксина на планшет наносили раствор антител, меченных порфирином. На взаимодействие антиген — антитело оказывают влияние длительность инкубации, рН, ионная сила, присутствие поверхностно-активных веществ и других компонентов, содержащихся в пробах.

В качестве исходных выбраны стандартные условия проведения иммунологической реакции на полистирольных микропланшетах: 1 ч инкубации в 0,01 М натрий-фосфатном буфере рН 7,4 с добавлением 0,15 М NaCl. Поверхностно-активные вещества добавляют в реакционные смеси для предотвращения неспецифической сорбции меченых антител на белке-носителе и самом планшете.

При подборе оптимальной концентрации поверхностно-активного вещества проводили адсорбцию конъюгата антитело — копропорфирин на планшет с иммобилизованным белком-носителем той же концентрации, что и в конъюгате белок — дигитоксин. При добавлении в раствор для инкубации тритона X-100 количество антител, связавшихся на планшете, по абсолютной величине меньше, чем без него. Однако при сравнении отношения сигнал/фон (рис. 2) видно, что оно минимально для растворов с добавками тритона X-100. Следовательно, влияние тритона X-100 на неспецифическую сорбцию конъюгата антитело — копропорфирин на планшете сильнее,

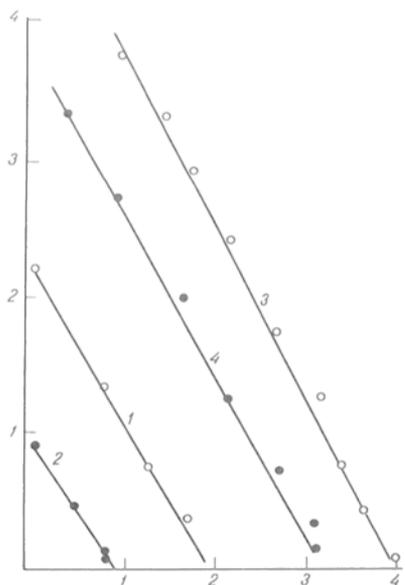


Рис. 2. Влияние тритона X-100 на сорбцию и специфическое связывание конъюгата антитело — копропорфирин на планшете.

1, 2 — неспецифическая сорбция конъюгата на планшете с иммобилизованным СИТ в отсутствие и в присутствии 0,01 % тритона X-100 соответственно; 3, 4 — специфическое связывание на планшете с иммобилизованным СИТ-дигитоксином в отсутствие и в присутствии 0,01 % тритона X-100 соответственно.

чем на его специфическое связывание на планшете с иммобилизованным дигитоксином. Оптимальной для данного антигена является 0,01 % концентрация тритона X-100.

Было выяснено влияние природы белка-носителя в конъюгате с дигитоксином на величину неспецифической сорбции антител, меченных копропорфирином. Найдено, что при использовании конъюгата ОВА — дигитоксин отношение сигнал/фон равно 10, т. е. в 1,5—2 раза выше, чем для конъюгата СИТ — дигитоксин.

Изучали влияние рН смеси для инкубации на специфическое связывание конъюгата антитело — копропорфирин с иммобилизованным дигитоксином. При варьировании значений рН буферных растворов, в которых проводили иммунологическую реакцию, в пределах 6,0—7,8 существенных различий связывания конъюгата антитело — копропорфирин обнаружено не было. Так как указанные пределы рН являются областью протонирования карбоксильных групп копропорфирина ($pK_3=6,5$) [5], очевидно, что степень ионизации флуоресцентной метки не влияет на иммунологическую активность антител, связанных с ней.

Таким образом, проведенные исследования позволили выбрать оптимальные условия сорбции конъюгатов дигитоксина на планшет и специфического связывания меченых антител с дигитоксином.

Далее эмпирическим путем подбирали концентрацию конъюгата антитело — порфирин для определения дигитоксина по конкурентной схеме. Выбор концентрации меченых антител проводили по контрольным кривым, построенным по флуоресцентному сигналу десорбированного комплекса антитело — копропорфирин в отсутствие в смеси для инкубации свободного дигитоксина. Выбирали концентрации конъюгата, при которых неспецифическое связывание было минимально, а флуоресцентный сигнал достигал 90 % от максимально возможного.

С использованием подобранной концентрации меченых антител определяли содержание свободного дигитоксина в контрольном образце. Была получена калибровочная кривая для определения концентрации дигитоксина в диапазоне от $6 \cdot 10^{-10}$ до $3 \cdot 10^{-9}$ М (рис. 3). В образце сыворотки крови человека необходимо определять концентрации дигитоксина в диапазоне от $1 \cdot 10^{-8}$ до $3 \cdot 10^{-8}$ М [8]. Таким образом, чувствительность метода позво-

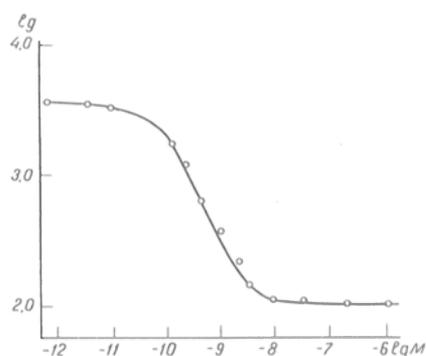


Рис. 3. Калибровочная кривая для определения концентрации дигитоксина.

По оси абсцисс — lg концентрации (в М) дигитоксина.

ляет перед анализом разводить образец более чем в 10 раз, что приводит к снижению фонового сигнала, обусловленного неспецифической сорбцией. Кроме того, для проведения анализа необходимо иметь образец сыворотки крови объемом 50–100 мкл, т. е. достаточно взятия крови из пальца.

ЛИТЕРАТУРА

1. Вогчал Б. Е., Слуцкий М. Е. Сердечные гликозиды.— М., 1973.— С. 174.
2. Иванова В. Т., Стафеева О. А., Савицкий А. П., Яхно М. А. // *Вопр. вирусол.*— 1988.— № 3.— С. 362–365.
3. Савицкий А. П., Папковский Д. Б., Березин И. В. и др. А. с. 1313172 СССР, 1985.
4. Савицкий А. П., Папковский Д. Б., Березин И. В. // *Докл. АН СССР.*— 1987.— Т. 293, № 3.— С. 744–748.
5. Савицкий А. П., Угарова Н. Н., Березин И. В. // *Биоорганическая химия.*— 1979.— Т. 5, № 2.— С. 259.
6. Стафеева О. А., Савицкий А. П., Диков М. М., Ермолин Г. А. // *Вопр. мед. химии.*
7. Butler V. P., Tse-Eng G. // *Meth. Enzymol.*— 1982.— Vol. 84.— P. 558–576.
8. Kleinhammer G., Maltersberger H. // *Methods of Enzymatic Analysis.*— Weinheim, 1985.— Vol. 12.— P. 112–134.
9. Melson K. I., Morrelli M. F. // *Clinical Pharmacology: Basic Principles in Therapeutics.*— New York, 1978.— P. 25–70.
10. Sini E., Hemmila J. J. // *Clin. Chem.*— 1979.— Vol. 32, N 2.— P. 353.

Поступила 19.04.88

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 1990

УДК 616.831-005.98-092.9-07:616.831-008.939.5-074

К. Г. Карагезян, Ю. А. Квитницкий-Рыжов, Л. М. Овсепян, А. Ю. Погосян, Л. В. Степанова

ГЛИКОЛИПИДЫ МОЗГА ПРИ ЕГО ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОМ ОТЕКЕ

Институт экспериментальной биологии АН Армянской ССР, Ереван

Известна функциональная значимость гликолипидов в транспорте ионов через биологические мембраны, рецепции нейромедиаторов, вирусов, токсинов [1, 5, 11]. Являясь обязательными компонентами плазматических мембран, они во многом определяют межклеточные взаимодействия, процессы дифференцировки нервных клеток, в чем определенная роль принадлежит электрической активности поверхности раздела. Отрицательная заряженность наружной поверхности клеточных мембран в значительной мере обусловлена присутствием в составе сиаловых кислот свободных карбоксильных групп, что, по-видимому, в значительной степени зависит от количественных изменений мембранных гликолипидов, особенно при различных экстремальных и патологических состояниях организма.

Исходя из изложенного, мы провели изучение качественного и количественного состава гликолипидов (ганглиозидов, цереброзидов, сульфатидов) в норме и при экспериментальном отеке мозга.

Методика

Исследования проводили на 90 беспородных белых крысах обоего пола. Токсический отек мозга вызывали внутри-

брюшинным введением тетраэтилолова в дозе 10 мг на 1 кг массы животного. Критерием развития отека служило увеличение в мозговой ткани содержания общей воды, а также показатели ее микроскопического исследования. О содержании воды судили по сухому остатку мозговой ткани. Одинаковые навески контрольного и опытного мозга (70 мг) тщательно высушивали при 110 °С до постоянной массы. Уменьшение массы сухого остатка мозга у крыс опытной группы по сравнению с контролем (11 и 17 мг соответственно) свидетельствовало о наличии отека. Животных декапитировали, из быстро изолированного головного мозга готовили липидный экстракт по Фолчу [8]. После промывки верхний водно-метанольный слой экстракта использовали для определения ганглиозидов, а нижний хлороформный — для определения сульфатидов и цереброзидов. Смесь цереброзидов и цереброзид-сульфатидов выделяли из общего липидного экстракта, освобождали от фосфолипидов и хроматографировали в тонком слое силикагеля в системе растворителей хлороформ — метанол — концентрированный аммиак (80:20:0,4). Количество цереброзидов определяли по углеводному компоненту реакцией с резорцином [7], сульфатидов — по сульфатной группе в реакции с азуром I [2]. Раствор ганглиозидов после диализа, лиофилизации и освобождения от фосфолипидов пропускали через колонку с ДЭАЭ сефадексом А-25, после чего содержимое хроматографировали описанным методом в системе растворителей хлороформ — метанол — 2,5 М аммиак (60:35:8). О содержании ганглиозидов судили по N-ацетил-нейраминной кислоте [2].

Результаты и обсуждение

При микроскопическом исследовании участков мозга интактного животного (кора и белое вещество полушарий большого мозга, базальные ганглии, ствол, мозжечок) каких-либо нарушений структуры не выявлено. Компактность серого вещества не нарушена, сдвиги со стороны цереброваскулярной системы отсутствуют. Белое вещество разрыхлению не подвергается. На препаратах, окрашенных тионином, отклонений от нормы нейронов коры и подкорковых центров не выражено. Микроскопический анализ мозга опытных животных свидетельствует о поражении головного мозга в виде характерного диффузного разрыхления белого вещества, обычно распространяющегося на глубокие слои коры.

Как показали результаты биохимических исследований, экспериментальный отек мозга характеризуется статистически достоверным увеличением количества сульфоцереброзидов (сульфатид 1,2) по сравнению с контролем (табл. 1). Количество же цереброзида 2 уменьшается в отличие от цереброзида 1, содержание которого достоверно возрастает. Известно [6], что цереброзиды преимущественно локализованы в миелине, тогда как сульфатиды определяются главным образом в немиелиновой части белого вещества. Донором

Таблица 1

Количественное содержание сульфатидов (в мкг серы на 1 г ткани) и цереброзидов (в мкг галактозы на 1 г ткани) в мозговой ткани в норме и при экспериментальном отеке ($n=15$)

Гликолипиды	Контроль	Опыт
Сульфатид 1	$0,11 \pm 0,005$	$0,16 \pm 0,01$ $p < 0,001$
Сульфатид 2	$0,17 \pm 0,005$	$0,24 \pm 0,005$ $p < 0,001$
Цереброзид 1	$0,97 \pm 0,1$	$1,32 \pm 0,09$ $p < 0,02$
Цереброзид 2	$1,04 \pm 0,04$	$0,66 \pm 0,005$ $p < 0,005$

Количественное содержание ганглиозидов (в мкг сиаловых кислот на 1 г ткани) в мозговой ткани в норме и при ее экспериментальном отеке ($n=15$)

Ганглиозид	Контроль	Опыт
Моносиалоганглиозид	111,75±5,6	80,61±8,3 $p<0,01$
Дисиалоганглиозид	305,49±7,0	228,12±5,9 $p<0,001$
Дисиалоганглиозид	119,40±6,8	75,33±6,4 $p<0,002$
Трисиалоганглиозид	285,65±7,3	260,17±6,5 $p<0,05$
Тетрасиалоганглиозид	37,25±5,3	40,18±7,2 $p<0,5$
Сумма	859,54	684,41

активированного сульфата является фосфоаденозинфосфосульфат. Перенос его на цереброзиды катализируется цереброзидсульфотрансферазой, действующей в микросомах, и не исключено, что при экспериментальном отеке мозга имеет место активирование указанной ферментной системы.

При изучении ганглиозидного состава мозга были фракционированы и количественно охарактеризованы 5 фракций ганглиозидов (табл. 2). Установлено, что экспериментальный отек мозга характеризуется уменьшением моно- и дисиалоганглиозидов без существенного изменения содержания три- и тетрасиалоганглиозидов. Следует отметить, что именно моно- и дисиалоганглиозиды характеризуются способностью к активному взаимопревращению [4]. Карбоксильные группы N-ацетил-нейраминавой кислоты создают на мембранной поверхности отрицательный заряд: фиксированные заряды важны в катионообменных процессах биологической мембраны. Ганглиозиды связывают Na^+ и K^+ , изменяя распределение ионов в мозговой ткани [12]. В транспорте этих ионов из водной фазы в липидную ганглиозиды действуют согласованно с активными центрами АТФазы [10]. В нейрональной мембране большое значение имеет взаимопревращение полисиалоганглиозидов в ди- и моносиалоганглиозиды, что приводит к увеличению или уменьшению ионо-связывающей функции мембраны. Не менее важна способность ганглиозидов обратимо связывать ионы Ca^{2+} , причем они осуществляют это более активно, чем фосфолипиды. Кроме того, в катион-протонном обмене ганглиозидов Ca^{2+} участвует в 20 раз активнее, чем Na^+ и K^+ [3]. В покое ганглиозиды связаны с Ca^{2+} , а вытеснение его из анионных групп Na^+ или K^+ является началом структурной перестройки в мембране, приводящей к увеличению проницаемости для катионов [12]. Вода является связывающим звеном между анионными группами ганглиозидов и одно- и двухвалентными катионами. Не исключено, что отмеченные изменения моно- и дисиалоганглиозидов при экспериментальном отеке имеют прямое отношение к изменениям ионного обмена, что, по-видимому, играет существенную роль в локальном перераспределении зарядов и изменении процессов проницаемости мембранных структур.

1. Аврова Н. Ф. // Укр. биохим. журн.— 1984.— № 3.— С. 245.
2. Методы биохимических исследований.— Л., 1982.
3. Мхенн Э. Е., Соцкий О. П. // Укр. биохим. журн.— 1972.— № 5.— С. 644.
4. Прохорова М. И., Беспалова М. А., Мухина А. П., Туманова С. Ю. // Вопр. биохимии мозга.— Ереван, 1975.— Т. 10.— С. 182.
5. Таранова Н. П. // Нейрохимия.— 1984.— № 3.— С. 419.
6. Туманова С. Ю., Прохорова М. И. // Биохимия липидов и их роль в обмене веществ.— М., 1981.— С. 128.
7. Чаева Л. С. Нервная система.— М., 1973.
8. Folch I., Less M., Sloane S. G. // J. biol. Chem.— 1957.— Vol. 226.— P. 497.
9. Huttunen M. O. // International Society for Neurochemistry: Meeting, 2nd.— Milano, 1969.
10. Samson F. E., Quinn D. I. // J. Neurochem.— 1967.— Vol. 14.— P. 42.
11. Svennerholm L. // Ganglioside Function / Eds. I. Porcellate et al.— New York, 1976.
12. Varon S., McIlwain H. I. // J. Neurochem.— 1961.— Vol. 8.— P. 262.

Поступила 22.01.89

BRAIN GLYCOLIPIDS IN EXPERIMENTAL BRAIN EDEMA

K. G. Karagezyan, Yu. N. Kvitnitsky-Ryzhov, L. M. Ousepyan, L. M. Pogosyan, L. V. Stepanova

Institute of Experimental Biology, Academy of Sciences of the Armenian SSR, Yerevan

Quantitative and qualitative composition of gangliosides, sulfatides and cerebrozides were studied in normal state and in experimental brain edema by means of thin-layer chromatography. In the experimental edema content of mono- and disialogangliosides was decreased while tri- and tetrasialogangliosides were unaltered. Statistically distinct increase in content of sulfo cerebrozides (sulfatide 1,2) was also detected in brain edema as compared with controls. At the same time, amount of cerebrozide 2 was decreased, whereas increase in cerebrozide 1 concentration was detected.

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 1990

УДК 616-018.1:576.314]-02.665.44]-07

М. В. Изотов, В. М. Щербаков, Я. М. Коен, В. М. Девиченский, С. М. Спиридонова, Л. В. Луговая, С. А. Бенедиктова

РОЛЬ ВТОРИЧНОГО МЕТАБОЛИЗМА В ФОРМИРОВАНИИ ПРОФИЛЯ ДИГИДРОДИОЛОВ БЕНЗ(А)ПИРЕНА В МЕМБРАНАХ МИКРОСОМ

Научный центр молекулярной диагностики Минздрава СССР, Москва

Некоторые химические соединения в результате окисления монооксигеназной системой микросом (МОС) приобретают цитотоксические, мутагенные и канцерогенные свойства. Наиболее изучены в этом отношении полициклические ароматические углеводороды и, в частности, бенз(а)пирен (БП), метаболизм которого достаточно сложен [3, 5, 16]. Сначала благодаря присоединению атома кислорода по одному из положений в молекуле БП образуются эпоксиды, которые спонтанно частично превращаются в фенолы [11]. Ферментативный гидролиз эпоксидов эпоксидгидролазой приводит к образованию соответствующих дигидродиолов [10]. При ферментативном или иеферментативном окислении фенолов образуются хино-

ны [19]. Эпоксиды, дигидродиолы, фенолы и хиноны составляют группу первичных метаболитов БП [5]. Некоторые из них способны окисляться дальше с участием МОС.

Ключевым ферментом МОС является семейство изоформ цитохрома Р-450. Введение экспериментальным животным ряда химических веществ-индукторов вызывает существенные изменения в изоферментном составе гемопротейна благодаря избирательной индукции отдельных его изоформ. Известны два основных типа индукторов, которые представлены фенобарбиталом (ФБ) и 3-метилхолантеном (МХ). В микросомах печени крыс, получавших МХ (МХ-микросомы), свыше 80 % всего количества цитохрома Р-450 представлено изоформами Р-448, в интактных микросомах содержание изоформ Р-450 и Р-448 примерно одинаково, а в микросомах, полученных после введения ФБ (ФБ-микросомы), около 60 % составляют изоформы Р-450 [4].

Изоферментный состав цитохрома Р-450 определяет пути метаболизма БП [5, 6]. Принято считать, что изоформы Р-448 ответственны за образование мутагенных и канцерогенных метаболитов БП, а изоформы Р-450 выполняют детоксицирующую функцию [5]. Однако введение животным ФБ иногда вызывает усиление мутагенного и канцерогенного эффекта полициклических углеводородов, что объясняют индукцией специфических изоформ гемопротейна и эпоксидгидролазы [11].

Изоферменты цитохрома Р-450 обладают различной региоселективностью в окислении БП [5], поэтому использование разных индукторов должно приводить к изменению соотношения образующихся в микросомах дигидродиолов. Регистрируемый с помощью высокоэффективной жидкостной хроматографии набор метаболитов БП указывает на возрастание количества продуктов окисленной по L-области молекулы БП после введения животным МХ и по K-области — после введения ФБ [2]. Так, в первом случае возрастает количество 7,8- и 9,10-дигидродиолов, а во втором — на порядок повышается содержание 4,5-дигидродиола. Однако необходимо учитывать, что в процессе инкубации происходит дальнейшее окисление (вторичный метаболизм) образующихся дигидродиолов до диолэпоксидов и тетролов [5]. Поэтому содержание в инкубационной смеси тех или иных дигидродиолов БП будет зависеть от скорости не только их образования, но и их вторичного окисления.

Для выяснения роли вторичного метаболизма в формировании профиля дигидродиолов в настоящей работе проведен анализ ингибирующего влияния 4,5-, 7,8- и 9,10-дигидродиолов БП на БП-гидроксилазную активность микросом, выделенных из печени крыс, индуцированных ФБ и МХ.

МЕТОДИКА

В работе использовали НАДФН и ФБ «Serva» (ФРГ), БП фирмы «Sigma» (США), остальные реактивы отечественного производства квалификации х.ч.

Эксперименты проводили на крысах-самцах линий Фишер и Спрег — Доули массой 150—200 г. Животным 1 раз в сутки в течение 3 дней вводили внутрибрюшинно раствор МХ в масле в дозе 25 мг/кг или раствор ФБ в изотоническом NaCl в дозе 80 мг/кг. Микросомы из печени крыс после декапитации выделяли по методу Левина [12], содержание в них микросомального гемопротейна определяли по методу Омуре и Сато [15].

Для количественного получения 4,5-, 7,8- и 9,10-дигидродиолов БП исходное соединение (1 мМ) окисляли в инкубационной среде (500 мл), содержащей в рабочем буфере (5 мМ MgCl₂, 150 мМ KCl, 50 мМ трис-HCl pH 7,4) 1 мг/мл микросомального белка, выделенного из печени крыс, получавших МХ. Инкубацию проводили при температуре 37 °С при перемешивании после добавления 0,3 мМ НАДФН в течение 20 мин. Реакцию останавливали добавлением 500 мл охлажденного ацетона. Полученную смесь центрифугировали при 8000 g в течение 20 мин. Из надосадочной жидкости метаболиты БП экстрагировали 500 мл этилацетата. Органический слой отделяли и высушивали над безводным MgSO₄. Растворитель упаривали на роторном испарителе при комнатной температуре в токе азота. Метаболиты БП разделяли методом тонкослойной хроматографии в системе этилацетат: бензол (1:1) на пластинках 10×10 см (Kieselgel 60, фирма «Merck», ФРГ). Силикагель с полос, обнаруженных с помощью УФ-камеры, собирали и из него метаболиты БП экстрагировали этилацетатом. Полученные растворы упаривали, остаток растворяли в ацетоне, УФ и видимые спектры полученных образцов сравнивали с приведенными в литературе [18].

Скорость реакции гидроксирования БП измеряли прямым флуориметрическим методом [10]. Инкубационная среда содержала в рабочем буфере микросомальный белок (0,125 мг/мл) и разные концентрации БП и его 4,5-, 7,8- и 9,10-дигидродиолов. Реакцию начинали добавлением 0,3 мМ НАДФН. Инкубацию проводили при 37 °С. Изменение флуоресценции регистрировали на спектрофлуориметре «Jasco-550» (Япония) на длинах волн возбуждения 337 нм и эмиссии 407 нм. Величины скоростей гидроксирования определяли в относительных единицах.

Результаты и обсуждение

На рис. 1 представлены результаты исследования скорости гидроксирования БП в ФБ- и МХ-микросомах. Кинетика реакции гидроксирования БП в ФБ-микросомах двухфазна, со значениями K_M^1 и K_M^2 , равными 0,6 и 3,9 мкМ соответственно. В МХ-микросомах реакция имеет однофазный характер с $K_M=0,5$ мкМ, т. е. близкой к K_M в ФБ-микросомах. Как показано на реконструированной системе гидроксирования дифенила [9], содержащей фосфолипид, НАДФН-цитохром Р-450-редуктазу и цитохром Р-450 и Р-448, эти изоформы гемопротейна конкурируют за электроны, поступающие с редуктазы, причем цитохром Р-450 обладает более высокой, чем цитохром Р-448, способностью акцептировать электроны с флавопротеина. Этим можно объяснить перелом на кривой Лайнуивера — Берка для ФБ-микросом, поскольку в этих микросомах обе

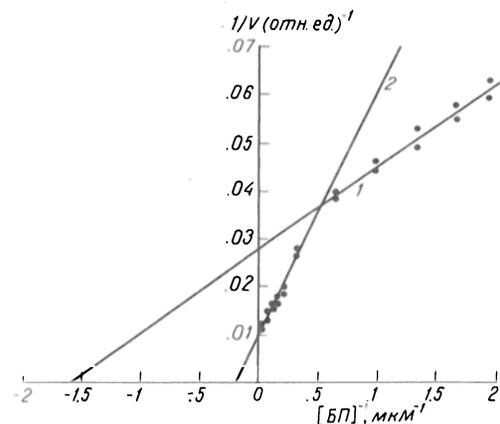


Рис. 1. Зависимость Лайнуивера — Берка начальной скорости гидроксирования БП в относительных единицах в ФБ-микросомах.

1 и 2 — продолжения участков кривой, характеризующихся низким и высоким значениями констант Михаэлиса соответственно.

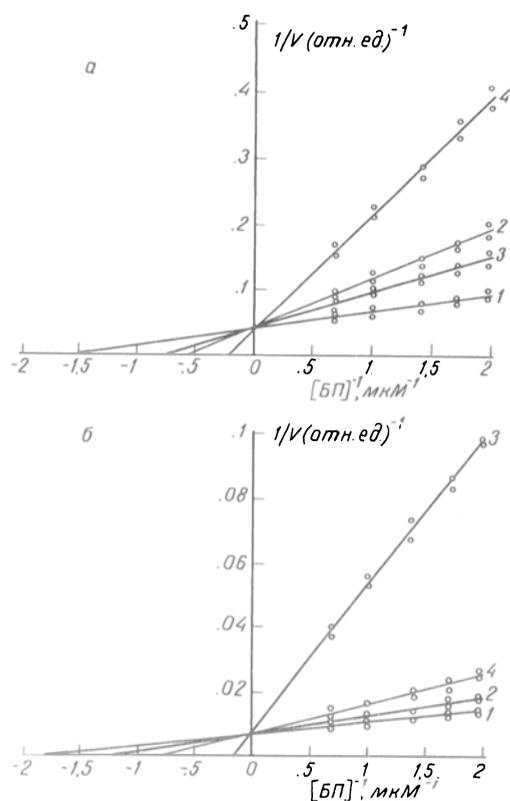


Рис. 2. Зависимости Лайнуивера — Берка начальной скорости гидроксилирования БП в относительных единицах. 1 — в отсутствие и 2, 3, 4 — в присутствии 7,8-, 4,5- и 9,10-дигидродииолов БП соответственно в МХ- (а) и ФБ- (б) микросомах.

формы цитохрома представлены примерно в равных количествах.

Линейный характер зависимости Лайнуивера — Берка в диапазоне концентраций БП от 0,5 до 4 мкМ независимо от препарата микросом (рис. 2), а также близкие значения K_M для ФБ-микросом и K_M для МХ-микросом указывают на то, что первичное окисление БП осуществляется либо одной изоформой гемопротейна, либо несколькими, обладающими одинаковыми каталитическими характеристиками. Следовательно, скорости образования и, как следствие этого, количественные соотношения дигидродииолов в разных препаратах микросом должны быть одинаковыми. Однако, как видно из данных, представленных в таблице, скорость образования и соотношение индивидуальных дигидродииолов в ФБ- и МХ-микросомах существенно различаются. Это связано с их вторичным окислением, как, например, окисление 7,8-дигидродииола до 7,8-диол-9,10-эпоксида, которое протекает со скоростью, сравнимой со скоростью первичного окисления БП, и характеризуется достаточно низким значением K_M [5].

На рис. 2 представлены зависимости Лайнуивера — Берка скорости гидроксилирования БП в ФБ- и МХ-микросомах в присутствии 4,5-, 7,8- и 9,10-дигидродииолов. Как видно, все исследованные дигидродииолы конкурентно ингибируют эту реакцию. Из таблицы, в которой приведены значения констант ингибирования, видно, что наибольшим значением K_i для МХ-микросом обладает 9,10-дигидродииол, а значения K_i 7,8- и 4,5-дигидродииолов соответственно в 2 и 3 раза ниже. В то же время для ФБ-микросом наибольшее значение K_i у 4,5-дигидродииола, а наименьшее — у 7,8-дигидродииола. Следовательно, наибольшее сродство к изоформам цитохрома Р-448 (МХ-микросомы) имеет 4,5-дигидродииол, а наименьшее — 9,10-дигидродииол. Наибольшее сродство к изоформам цитохрома Р-450 (ФБ-микросомы) у 7,8-дигидродииола, а наименьшее — у 4,5-дигидродииола. Если исходить из того, что накопление в инкубационной смеси того или иного дигидродииола зависит от сродства к изоформе цитохрома Р-450, катализирующей его вторичное окисление, то в МХ-микросомах в процессе окисления БП должен преобладать 9,10-дигидродииол, а в ФБ-микросомах — 4,5-дигидродииол, что хорошо согласуется с приведенными данными.

Таким образом, полученные данные свидетельствуют, во-первых, о конкурентных взаимоотношениях реакций первичного и вторичного метаболизма БП, которые определяют регистрируемый профиль дигидродииолов. Во-вторых, они подтверждают наше предположение о том, что при низких концентрациях БП его первичный метаболизм осуществляется изоформами гемопротейна, обладающими одинаковыми каталитическими свойствами.

Однако в литературе имеются сведения об участии в метаболизме БП большого числа изоформ цитохрома Р-450 [3]. Это кажущееся противоречие можно устранить, если принять, как нами было показано ранее [2], что все изоформы гемопротейна можно разделить на две группы в зависимости от ориентации их активных центров относительно гидрофобной и водной фаз микросомальной мембраны. Цитохромы одной группы (к ним относятся изоформы Р-450) обращены активными центрами в водную фазу, а цитохромы второй группы (включающие изоформы Р-448) — в фосфолипидный бислой мембраны. Следовательно, близкие каталитические характеристики изоформ гемопротейна, катализирующих первичное окисление БП, объясняются одинаковой ориентацией их активных центров, вероятно, в липидную фазу, с учетом высокой гидрофобности БП.

Нами исследована концентрационная зависимость изменения флуоресценции БП при растворении его в микросомальной мембране, поскольку

Скорости образования индивидуальных дигидродииолов БП в микросомах, выделенных из печени крыс, получавших ФБ и МХ, и константы ингибирования ими реакции гидроксилирования БП ($M \pm m$)

Индуктор	Скорость образования дигидродииола БП, нмоль/мг белка/мин [17]			Константа ингибирования реакции гидроксилирования БП, мкМ		
	4,5-диол	7,8-диол	9,10-диол	4,5-диол	7,8-диол	9,10-диол
ФБ	308 ± 17	38 ± 17	39 ± 13	6,76 ± 0,65	0,82 ± 0,32	1,35 ± 0,44
МХ	115 ± 23	320 ± 36	370 ± 70	1,18 ± 0,11	1,56 ± 0,21	3,65 ± 0,14

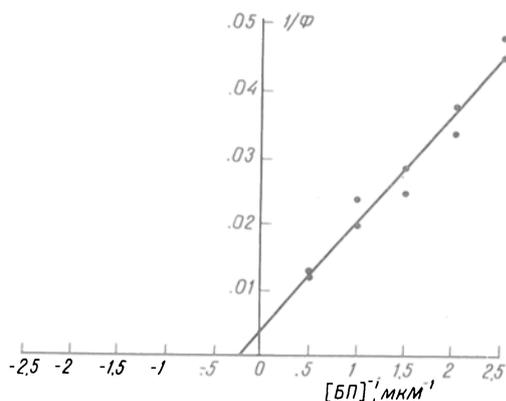


Рис. 3. Зависимость в обратных координатах изменения интенсивности флюоресценции (Ф) от концентраций БП при его встраивании в липиды мембраны в ФБ-микросомах.

растворение БП в липидах мембраны сопровождается флюоресцентными изменениями, пропорциональными его концентрации в мембране [13]. Из рис. 3, на котором эта зависимость представлена в обратных координатах, следует, что насыщающая концентрация БП равна примерно 8 мкМ. Следовательно, при более низких концентрациях БП (ниже 4 мкМ) это гидрофобное соединение ($\log P=6,92$ в системе октанол: вода) преимущественно концентрируется в липидах мембран, где может окисляться только цитохромами с активными центрами, обращенными внутрь липидного бислоя (в том числе изоформами цитохрома P-448). При более высоких концентрациях БП (выше 4 мкМ) в его окислении могут принимать участие и изоформы, активные центры которых обращены в водную фазу (в том числе изоформы цитохрома P-450), что соответствует кинетике гидроксилирования БП в ФБ-микросомах (см. рис. 1). Полученные данные хорошо согласуются с имеющимися в литературе о том, что субстратами цитохрома P-448 являются главным образом гидрофобные соединения, тогда как цитохром P-450 преимущественно катализирует окисление более полярных соединений [7, 8, 14].

Таким образом, представленные результаты свидетельствуют о том, что профиль дигидродиолов, образующихся в процессе окисления БП в микросомах, определяется конкурентными взаимоотношениями реакций первичного и вторичного метаболизма БП. Образование дигидродиолов БП при низких концентрациях субстрата катализируется изоформами цитохрома P-450, активные центры которых ориентированы в липидную фазу мембраны.

ЛИТЕРАТУРА

1. Изотов М. В., Щербаков В. М., Девиченский В. М. и др. // Докл. АН СССР.— 1986.— Т. 287, № 5.— С. 1244.
2. Изотов М. В., Щербаков В. М., Девиченский В. М. и др. // Биохимия.— 1987.— Т. 52, № 7.— С. 1072.
3. Ляхович В. В., Цырлов И. Б. Индукция ферментов метаболизма ксенобиотиков.— Новосибирск, 1981.— С. 174.
4. Мишин В. М., Ляхович В. В. Множественные формы цитохрома P-450.— Новосибирск, 1985.— С. 71.
5. Conney A. H. // Cancer Res.— 1982.— Vol. 42.— P. 4875—4817.
6. Conney A. H. // Life Sci.— 1986.— Vol. 39.— P. 2493—2518.

7. Fisher G. J., Fukushima H., Gayler J. L. // J. biol. Chem.— 1981.— Vol. 256.— P. 4388—4394.
8. Guengerich F. P. // Ibid.— 1978.— Vol. 253.— P. 7931—7939.
9. Kitada M., Sakamoto K., Rikihisa T. // Biochem. Pharmacol.— 1984.— Vol. 33.— P. 3971—3976.
10. Lesko S., Caspary W., Larentzen R. // Biochemistry (Wash.)— 1975.— Vol. 14.— P. 3978—3984.
11. Leutz J. C., Gelboin H. V. // Arch. Biochem.— 1975.— Vol. 168.— P. 722—725.
12. Levin W., Lu A. V. H., Jacobson M. // Ibid.— 1973.— Vol. 158.— P. 842—852.
13. Miller A. G., Whitlock J. P. // J. biol. Chem.— 1981.— Vol. 256.— P. 2433—2437.
14. Miwa G. T., Lu A. V. H. // Arch. Biochem.— 1984.— Vol. 234.— P. 161—166.
15. Omura T., Sato R. // J. biol. Chem.— 1964.— Vol. 239.— P. 2379—2385.
16. Sims P., Grover P. L. // Advanc. Cancer Res.— 1974.— Vol. 20.— P. 165—274.
17. Toftgard R., Nilson O. G., Ingelman-Sundberg M., Gustafson J.-A. // Acta pharmacol. (Kbh.)— 1980.— Vol. 46.— P. 353—361.
18. Waterfall J. E., Sims P. // Biochem. J.— 1972.— Vol. 128.— P. 265—277.
19. Wiebel F. J. // Arch. Biochem.— 1975.— Vol. 168.— P. 609—621.

Поступила 13.06.89

ROLE OF THE SECONDARY METABOLISM IN FORMATION OF BENZ(A)PYRENE DIHYDRODIOL PROFILE IN THE MICROSOMAL MEMBRANES

M. V. Isotov, V. M. Scherbakov, Ja. M. Cohen, V. M. Dевиченский, S. M. Spiridonova, L. V. Lugovaja, S. A. Benedikova

Research Centre of Molecular Diagnosis, Ministry of Public Health of the USSR, Moscow

4,5-, 7,8- and 9,10-dihydrodiols of benz(a)pyrene (BP) were separated by thin-layer chromatography and their influence on BP-hydroxylase activity was studied in liver microsomes isolated from rats treated with phenobarbital (PB-microsomes) and 3-methylcholanthrene (MC-microsomes). All diols studied inhibited hydroxylation of BP by the competitive type. Accumulation of BP-diols in the incubation media correlated with their affinity to cytochrome P-450 isoenzymes which catalyzed the secondary metabolism of these diols. This correspondence allowed to formulate the kinetic and temperature dependence of BP oxidation suggesting that two main groups of hemoprotein isoforms were contained which were dissimilar in the active site orientation. Treatment with 3-methylcholanthrene induced specifically those hemoproteins which had the active site directed inside the membrane lipids; treatment with phenobarbital involved induction of two groups of hemoproteins active site of which was directed both to lipid and to water. The primary metabolism of the hydrophobic BP involved cytochrome P-450 isoenzymes which had the active site directed inside the lipids; the secondary metabolism of more polar diols was realized using both groups of hemoprotein isoenzymes with active sites oriented into lipids and water.

© А. З. ДРОЗДОВ, И. П. АНОХИНА, 1990

УДК 616.89-008.441.13-07:616.155.25-008.931:577.152.14

А. З. Дроздов, И. П. Анохина

АКТИВНОСТЬ ТИРОЗИНГИДРОКСИЛАЗЫ И МОНОАМИНОКСИДАЗЫ В ТРОМБОЦИТАХ ЧЕЛОВЕКА ПРИ АЛКОГОЛИЗМЕ

Всесоюзный научный центр медико-биологических проблем наркологии Минздрава СССР, Москва

Патогенез хронического алкоголизма тесно связан с изменением состояния катехоламиновых и в первую очередь дофаминовых систем организма [1]. Функциональное состояние катехола-

миновых нейромедиаторных систем в значительной мере определяется уровнем активности ферментов метаболизма катехоламинов (КА).

Основными ферментами кругооборота КА являются тирозингидроксилаза — ТГ (КФ 1.14.16.2) — лимитирующий фермент синтеза дофамина (ДА) и норадреналина (НА), активность которого в значительной мере определяет скорость их синтеза [21], и моноаминоксидаза (МАО) митохондрий (КФ 1.4.3.4) — основной фермент катаболизма моноаминов. Активность МАО (преимущественно типа Б) обнаруживается в тромбоцитах многих видов млекопитающих, в том числе и человека [4], и есть некоторые основания полагать, что активность этой формы МАО может отражать активность МАО центральных структур [5].

При алкоголизме активность МАО тромбоцитов исследовали многократно и весьма тщательно. Был твердо установлен факт более низкой активности этой формы МАО у больных алкоголизмом по сравнению с активностью у здоровых людей [9—12, 15]. Вместе с тем можно констатировать, что есть два мнения по поводу состояния активности МАО тромбоцитов при алкоголизме. Некоторые авторы полагают, что увеличение активности МАО в состоянии абстиненции (примерно через 3—5 дней после прекращения употребления алкоголя) является транзиторным феноменом (сохраняется примерно 3—4 нед), в то же время низкий уровень активности у больных алкоголизмом имеет стабильный характер и обусловлен генетически [10, 12, 15, 18, 22]. Данные других авторов свидетельствуют, что низкая активность тромбоцитарной МАО у больных имеет тенденцию к нормализации через определенный период после прекращения употребления алкоголя [9, 11, 13, 20], следовательно, основной причиной сниженного уровня активности МАО являются факторы длительного постоянного приема больших доз этилового спирта. Мы не обнаружили в литературе работ, посвященных исследованию уровня ТГ в крови человека при алкоголизме.

Очевидно, что одной из причин изменения метаболизма КА при алкоголизме может являться изменение активности ферментов их кругооборота под влиянием этилового спирта. Противоречивость результатов, касающихся динамики состояния активности МАО тромбоцитов при алкоголизме, и отсутствие сведений о состоянии ТГ у больных алкоголизмом заставили нас предпринять настоящее исследование.

Методика

Обследовано 55 больных алкоголизмом в возрасте 28—55 лет. У всех больных в клинической картине заболевания отмечается выраженный алкогольный абстинентный синдром. Больные находились в состоянии алкогольного опьянения, алкогольной абстиненции, острого алкогольного делирия, в трезвом состоянии без признаков опьянения или похмелья. В ряде случаев отмечалось сочетание симптомов алкогольного опьянения с проявлениями абстинентных расстройств. Часть больных находилась в состоянии длительной (0,5—2 года) ремиссии. Контрольную группу составили 32 здоровых мужчины в возрасте 19—43 лет, у которых исключался эпизодический прием алкоголя в течение 2 нед перед исследованием.

Активность МАО тромбоцитов определяли методом, разработанным нами для регистрации активности МАО типа Б мозга и тромбоцитов с бензиламином в качестве субстрата [5, 6].

Кровь из локтевой вены для определения активности МАО собирали в пластиковые стаканчики, содержащие 0,27 М раствор ЭДТА pH 7,4 (0,6 мл на 20 мл крови). Форменные элементы осаждали центрифугированием при 300 g 5 мин. Обогащенную тромбоцитами плазму центрифугировали 20 мин при 2000 g. Осадок тромбоцитов промывали, суспендировали и гомогенизировали в 2—3 мл 0,01 М Na, К-фосфатного буфера pH 7,6. Гомогенат центрифугировали 20 мин при 20 000 g, осадок мембранных структур тромбоцитов гомогенизировали в 1,5—2 мл 0,2 М Na, К-фосфатного буфера pH 8,4. Все стадии выделения тромбоцитов проводили при 4 °С. Замораживали материал обычно после получения осадка мембранных структур. Препараты хранили до эксперимента при —20 °С не более 2 мес.

Реакционная смесь (общий объем 0,6 мл) состояла из 0,1—0,2 мл суспензии мембран тромбоцитов (100—400 мкг белка в пробе), 0,3—0,4 мл 0,2 М Na, К-фосфатного буфера pH 8,4, 0,1 мл раствора бензиламина в этом же буфере в конечной концентрации 2 мМ. При превышении этой концентрации наблюдали субстратное ингибирование фермента. K_m для бензиламина для этой формы МАО при данном pH составляла примерно 30—40 мкМ.

Реакционную смесь в пластиковых стаканчиках инкубировали 10 мин при 37 °С при непрерывном встряхивании. Реакцию останавливали внесением 0,1 мл 20 % ТХУ в ледяной бане. Контрольные пробы инкубировали без бензиламина, который добавляли после внесения ТХУ. После остановки реакции в стаканчики вносили 1,5 мл *n*-гептана и пробирки интенсивно встряхивали в течение 3 мин в вортекс-миксере, после чего центрифугировали 10 мин при 2000 g. Далее 20 мкл верхней (гептановой) фазы, содержащей экстрагированный бензальдегид, вносили в хроматографическую систему высокого давления. Использовали насос «Constametric III» и фотометрический детектор «Spectromonitor III» фирмы LDC (США). Разделение проводили на колонке «Spherisorb ODS 10» фирмы «Alltech» (США) при температуре 35 °С. В качестве элюента использовали систему этанол — H₂O (60 % к 40 % по объему), скорость протока 2 мл/мин. В этих условиях пик бензальдегида выходил из колонки через 1,9—2,2 мин. Данные регистрировали при длине волны 250 нм. Подвижную фазу готовили на дважды перегнанном этаноле и дистиллированной деионизированной воде, перед употреблением ее фильтровали и дегазировали. Минимальное количество регистрируемого бензальдегида, содержащегося в реакционной смеси после остановки ферментативной реакции, составляло около 0,1 нмоль (отношение пик/шум 3:1). При необходимости чувствительность может быть легко увеличена посредством введения в систему большего объема гептановой фазы (до 50 мкл). Калибровку проводили с использованием внешнего стандарта. Активность фермента выражали в наномолях образованного бензальдегида за 1 ч на 1 мг белка мембранной фракции тромбоцитов.

Метод определения активности ТГ в тромбоцитах человека был разработан нами на основе используемой методики определения активности этого фермента в мозге крыс [5]. Кроме тромбоцитов, активность ТГ была обнаружена во фракции лимфоцитов человека.

Кровь для определения активности ТГ собирали с антикоагулянтом так же, как для определения активности МАО (0,6 мл 0,27 М ЭДТА pH 7,4 на 20 мл крови), центрифугировали при 500 g 10 мин. Обогащенную тромбоцитами плазму (3—4 мл) центрифугировали при 2000 g 20 мин. Стаканчик с плотным осадком тромбоцитов тщательно отмывали от следов белка плазмы крови (6—8-кратная промывка дистиллированной водой), осадок гомогенизировали в 0,3—0,5 мл 50 мМ трис-ацетатного буфера pH 6,1, содержащего 0,2 % тритона X-100. Реакционная смесь (0,5 мл) содержала суспензию тромбоцитов (0,2—0,8 мг белка в пробе), 0,1 мл 1 М ацетатного буфера pH 6,1, меркаптоэтанол и тирозин в конечных концентрациях соответственно 50 и 0,4 мМ, 70—100 ед. каталазы и раствор 6-метил-5,6,7,9-тетрагидроптерина (6МРН₄). Активность фермента определяли при двух концентрациях 6МРН₄ — насыщающей (1 мМ) и субнасыщающей (0,1 мМ). Смесь инкубировали 15—20 мин при 37 °С в водяной бане при постоянном встряхивании. Реакция имела линейный характер в пределах по крайней мере 25 мин. Контрольные пробы инкубировали без 6МРН₄, который вносили в смесь после остановки реакции. Далее продукт реакции диоксибензилаланин (ДОФА) экстрагировали, используя окись алюминия, окисляли по схеме [24] и определяли флуориметрически.

Реакцию останавливали добавлением 0,5 мл 0,5 М HClO₄, затем пробы центрифугировали 6000—8000 g 10 мин. Весь су-

Активность ТГ тромбоцитов (в нмоль/мин на 1 мг белка) у больных алкоголизмом

Клиническое состояние больных	Число больных	Активность ТГ	
		0,1 мМ 6МРН ₄	1 мМ 6МРН ₄
Оьянение	4	5,6±1,1	58,2±11,8
Тяжелая абстиненция и делирий	8	16,5±3,0**	83,6±11,9*
Трезвое состояние больных алкоголизмом	15	7,4±1,3	59,1±5,7
Контрольная группа	14	6,2±0,7	50,5±3,6

Примечание. Одна звездочка — $p < 0,01$, две — $p < 0,001$ относительно контроля.

пернатант переносили в другую пробирку, куда последовательно добавляли 0,1 мл 10 % раствора ЭДТА и 0,4 мл 1 М раствора трис-НСI-буфера (рН полученного раствора должен быть в пределах 8,5–8,6). Затем в пробы вносили 60–90 мг активированной окиси алюминия и пробирки интенсивно встряхивали в вортекс-миксере в течение 1 мин. После осаждения окиси алюминия надосадок отсасывали и последовательно промывали осадок дистиллированной водой 2 раза по 3 мл. Адсорбированный на окиси ДОФА элюировали 1,6 мл 0,1 М НСI интенсивным встряхиванием в вортекс-миксере в течение 30–40 с. После перенесения соляной кислоты в другую пробирку в пробы добавляли 0,5 мл 0,5 М К₂НРО₄, доводя рН раствора до 6,5. ДОФА окисляли 0,1 мл 0,25 % раствора К₃[Fe(CN)₆]. Строго через 3 мин после добавления феррицианида в пробы вносили 1 мл щелочного аскорбата, состоящего из 9 частей 8,5 М NaOH, 1 части 2 % раствора аскорбиновой кислоты и 0,2 части этилендиамина. Щелочной аскорбат готовили непосредственно перед экспериментом. После окисления пробы инкубировали 40 мин при комнатной температуре, затем измеряли флюоресценцию при волне возбуждения 360 нм и волне флюоресценции 490 нм. Флюоресценция стабилизировалась в течение по крайней мере 2 ч. Измерения проводили на спектрофлюориметре «Хитачи» MPF-4. Активность фермента выражали в наномолях образованного ДОФА за 1 мин на 1 мг белка тромбоцитов.

K_m для тирозина и 6МРН₄ для ТГ тромбоцитов человека в наших условиях равняются соответственно примерно 1,2 и 0,8–1 мМ.

В работе использовали Na₂ и Na₄ ЭДТА, бензиламин-НСI, каталазу, трис-основание, меркаптоэтанол, 6МРН₄, L-тирозин, феррицианид калия, этилендиамин фирмы «Sigma» (США), L-ДОФА, окись алюминия фирмы «Reanal» (ВНР). Остальные реактивы были отечественного производства квалификации х. ч. или о. с. ч. Статистическую обработку результатов проводили с использованием критерия *t* Стьюдента.

Результаты и обсуждение

Исследования свидетельствуют о корреляции активности MAO тромбоцитов с клиническим статусом пациентов (табл. 1). Так, в группе больных с выраженным абстинентным синдромом и алкогольным делирием активность MAO существенно снижена по сравнению с показателями у здоровых испытуемых. Активность этого энзима во время развернутой картины делирия находится на уровне, характерном для больных в состоянии абстиненции, т. е. значительно более низком, чем в контрольной выборке. Однако начиная с раннего выхода больного из делириозного состояния показатели активности MAO резко возрастают, а через 2–3 дня после белой горячки отмечается очень высокий уровень активности MAO, существенно превышающий контрольные значения. Активность тромбоцитарной MAO достоверно не различается у больных в состоянии ремиссии и у здоровых людей, хотя и наблюдается тенденция к снижению активности у больных алкоголизмом.

Таблица 1

Активность MAO тромбоцитов (в нмоль/ч на 1 мг белка) у больных алкоголизмом

Клиническое состояние больных	Число больных	Активность MAO	<i>p</i>
Абстиненция (1)	9	56,9±8,8	$p_{1-6} < 0,01$
Делирий (2)	14	56,4±8,9	$p_{1-5} < 0,001$
Начало выхода из делирия (3)	9	93,8±14,9	$p_{2-3} < 0,05$
Полный выход из делирия, 1–2-е сутки (4)	11	188,3±12,1	$p_{2-4, 3-4, 4-6} < 0,001$
Ремиссия (5)	13	92,3±8,9	
Контрольная группа (6)	18	103,5±8,3	

В настоящем исследовании активность ТГ в тромбоцитах определяли при двух концентрациях 6МРН₄ в реакционной смеси. Особенности механизмов регуляции ТГ [14, 16] диктуют применение именно такого подхода к изучению этого энзима, ибо активация ТГ, обусловленная увеличением сродства фермента к кофактору, может не выявляться при определении только максимальной скорости реакции. Наиболее информативным методом оценки параметров изменения ферментативной активности является построение кинетических кривых зависимости скорости реакции от концентрации субстрата или кофактора. Однако нехватка материала крови одного больного для определения K_m и V_{max} и трудоемкость делают эти исследования в рамках настоящих экспериментальных условий трудноосуществимыми. В связи с этим активность ТГ измеряли в присутствии только двух концентраций кофактора (100 и 1000 мкМ), что позволяет в принципе оценить и K_m для 6МРН₄, и максимальную скорость реакции.

Результаты работы показали, что средняя активность ТГ в контрольной группе и в группе больных алкоголизмом в трезвом состоянии достоверно не различается, хотя у больных и проявляется тенденция к увеличению активности (табл. 2). У больных алкоголизмом в состоянии тяжелой абстиненции и делирия активность ТГ заметно увеличена по сравнению с контролем, причем активность при малой концентрации 6МРН₄ у пациентов превышает активность у здоровых почти в 3 раза. Обследование больных алкоголизмом в состоянии оьянения показало, что активность ТГ у них не отличается от активности в контрольной группе. Интересно, что средний показатель активности ТГ у больных в состоянии оьянения не отличался от аналогичного показателя у них же после купирования всех проявлений острого состояния, в то же время в группе находившихся в состоянии абстиненции активность этого фермента значительно превышала среднюю активность ТГ у них же в трезвом состоянии.

На основе полученных данных можно представить картину динамики активности исследованных ферментов при тяжелой абстиненции и делирии следующим образом. Активность ТГ начинает увеличиваться после прекращения употребления алкоголя параллельно с развитием симптомов отнятия и нормализуется через несколько дней после выхода пациента из острого состояния. Актив-

ность MAO, будучи резко сниженной в период злоупотребления, начинает нарастать через несколько дней (1-3) после начала абстинентных расстройств, т. е. с опозданием относительно нарастания активности ТГ, достигая высоких значений к моменту выхода больных из делириозного состояния и оставаясь на этом уровне по крайней мере в течение нескольких дней.

При сопоставлении динамики активности ТГ и MAO в тромбоцитах с хорошо известными перестройками метаболизма КА при абстинентных состояниях [3] становится очевидным, что нарушения обмена КА в значительной мере обусловлены сдвигами в активности фермента. В частности, высокая концентрация ДА в организме [2, 7] может явиться следствием усиления синтеза КА при недостаточности систем дезаминирования моноаминов.

Увеличение активности ТГ в некоторых отделах мозга наблюдается у крыс после прекращения потребления алкоголя на фоне его длительного приема [5, 17]. Обнаружение схожих изменений активности ТГ в тромбоцитах свидетельствует о том, что подобный феномен имеет место и при хроническом алкоголизме у людей. Характер изменения активности ТГ (увеличение скорости процесса гидроксилирования прежде всего при малых концентрациях субстрата) позволяет говорить о направленной регуляции уровня активности этого фермента. Можно предположить, что в данном случае речь идет о центральных регуляторных влияниях.

Как показывают данные настоящей работы, низкая активность MAO тромбоцитов у больных алкоголизмом является прежде всего следствием длительного постоянного приема больших доз алкоголя, поскольку в состоянии ремиссии активность восстанавливается. Вместе с тем полученные нами результаты не позволяют полностью исключить присутствие тенденции к снижению активности MAO тромбоцитов у лиц, склонных к заболеванию алкоголизмом [5].

Очевидно, что активация MAO тромбоцитов у больных алкоголизмом в период тяжелых абстинентных и делириозных расстройств является одним из компенсаторных механизмов, нормализующих патологическое функциональное состояние катехоламинергических медиаторных систем в организме. Подобный тип компенсации касается только периферической тромбоцитарной MAO, в то время как активность фермента мозга крыс не изменяется на разных стадиях экспериментального алкоголизма [8, 19, 23]. Подобную компенсацию обеспечивают, по-видимому, возможности, связанные с резервами синтеза и депонирования тромбоцитов с более высокой активностью MAO. Кроме того, увеличение общей моноаминоксидазной активности крови обеспечивается сильным тромбоцитозом, наблюдаемым именно во время выхода пациентов из тяжелых абстинентных состояний [5].

Непосредственные причины изменений функционального состояния исследованных ферментных систем в тромбоцитах неизвестны, хотя не вызывает сомнений, что выявленные изменения активности ферментов служат одной из причин на-

рушений обмена КА, типичных для острых состояний в клинике алкоголизма.

ЛИТЕРАТУРА

1. Анохина И. П. // Нейрогуморальные основы биологических мотиваций.— Воронеж, 1987.— С. 52—59.
2. Анохина И. П., Иванец Н. Н., Коган Б. М. и др. // Проблемы патогенеза психических заболеваний.— М., 1979.— С. 92—97.
3. Анохина И. П., Коган Б. М. // Итоги науки и техники: Сер. Токсикология.— М., 1984.— Т. 13.— С. 57—92.
4. Горкин В. Э. Аминоксидазы и их значение в медицине.— М., 1981.
5. Дроздов А. Э. Активность ферментов метаболизма дофамина при алкоголизме: Дис. ... канд. мед. наук.— М., 1986.
6. Дроздов А. Э., Коган Б. М. // Открытия.— 1984.— № 17.— С. 154.
7. Коган Б. М. // Алкоголизм (Клинико-терапевтический, патогенетический и судебно-психиатрический аспекты).— М., 1981.— С. 68—75.
8. Романова Л. А. // Вопр. мед. химии.— 1980.— № 2.— С. 252—255.
9. Agarwall D. P., Philippu G., Milech U. et al. // Drug Alcohol Depend.— 1983.— Vol. 12.— P. 85—91.
10. Alexopoulos G. S., Lieberman K. W., Frances R. et al. // Amer. J. Psychiat.— 1981.— Vol. 138.— P. 1254—1255.
11. Brown J. B. // Ibid.— 1977.— Vol. 134.— P. 206—207.
12. Fowler C. J., Wiberg A., Orelund R. et al. // Biochem. Med.— 1981.— Vol. 25.— P. 356—365.
13. Giller E., Hall H. // Amer. J. Psychiat.— 1983.— Vol. 140.— P. 114—115.
14. Kaufman S. // Biochem. Soc. Trans.— 1985.— Vol. 13.— P. 433—436.
15. Major L. F., Goyer P. F., Murphy D. L. // J. Stud. Alcohol.— 1981.— Vol. 42.— P. 1052—1057.
16. Masserano J. M., Weiner N. // Molec. Cell. Biochem.— 1983.— Vol. 53/54.— P. 129—152.
17. Masserano J. M., Takimoto G. S., Weiner N. // Alcoholism.— 1983.— Vol. 7.— P. 294—298.
18. Sullivan J. L., Stanfield C. N., Maltbie A. A. et al. // Biol. Psychiat.— 1978.— Vol. 13.— P. 391—399.
19. Tabakoff B., Boggan W. O. // J. Neurochem.— 1974.— Vol. 22.— P. 759—764.
20. Takahashi S., Tani N., Yamane H. // Folia psychiat. neurol. jap.— 1976.— Vol. 30.— P. 455—462.
21. Weiner N. // The Basic Neurosciences: The Nervous System.— New York, 1975.— Vol. 1.— P. 341—354.
22. Wiberg A. // Med. Biol.— 1979.— Vol. 57.— P. 133—134.
23. Wiberg A., Walstrom G., Orelund L. // Psychopharmacology.— 1977.— Vol. 52.— P. 111—113.
24. Yamauchi T., Fujisawa H. // Analyt. Biochem.— 1978.— Vol. 89.— P. 143—150.

Поступила 10.05.88

ACTIVITY OF TYROSINE HYDROXYLASE AND MONOAMINE OXIDASE IN THROMBOCYTES OF PATIENTS WITH ALCOHOLISM

A. Z. Drozdov, I. P. Anokhina

All-Union Research Centre for Medico-Biological Problems of Narcology, Moscow

Activity of tyrosine hydroxylase (TH) was detected in human thrombocytes. The TH and monoamine oxidase (MAO) activities were estimated in thrombocytes of patients with alcoholism of various clinical manifestations. Activity of TH was increased in patients with severe abstinence disorders; after termination of the syndrome the enzymatic activity was normalized. Activity of MAO, being at low level in the patients with abstinence and delirious syndromes, was markedly increased after discontinuation of the delirium syndrome. Reasons and consequences of the enzymatic activity alterations are discussed.

А. А. Пименов, А. Л. Рахмилевич, В. В. Деев,
И. В. Кириллова, Т. Л. Мигдал, Т. М. Андропова,
Б. Б. Фукс

АКТИВАЦИЯ КЛЕТЧНОГО ИММУНИТЕТА У МЫШЕЙ В НОРМЕ И ПРИ ОПУХОЛЕВОМ РОСТЕ ПОД ДЕЙСТВИЕМ ГЛЮКОЗАМИНИЛ-МУРАМИЛДИПЕПТИДА

НИИ экспериментальной диагностики и терапии опухолей ВОИЦ АМН СССР, НИИ морфологии человека АМН СССР, Институт биоорганической химии им. М. М. Шемякина АН СССР, Москва

Ранее описаны синтез, свойства и влияние отечественного производного мурамилдипептида (N-ацетилглюкозаминил (β 1 \rightarrow 4) N-ацетилмурамил-L-аланил-D-изоглутамин (ГМДП) на некоторые функции клеток иммунной системы *in vitro* [1—4, 6]. В комплексе с липополисахаридом (ЛПС) ГМДП активировал опухольспецифические Т-киллеры у мышей с перевивными сингенными опухолями, снижал активность Т-супрессоров и стимулировал функции естественных киллеров и опухолецидных макрофагов [11, 3]. Цель работы — выяснить, как ГМДП влияет на некоторые существенные показатели противоопухолевого иммунитета *in vitro* и *in vivo*.

Методика

В опытах использовали мышей линий DBA/2 (H-2^d), C57BL/6 (H-2^b) и A/Sp (H-2^d), полученных из питомников АМН СССР «Столбовая» и «Светлые горы» и из разведения ВОИЦ АМН СССР. Способность ГМДП вызывать продукцию факторов некроза опухоли (ФНО) и интерлейкина-1 (ИЛ-1) *in vitro* оценивали следующим образом. Спленоциты мышей DBA/2 культивировали в течение 24 ч при 37 °С в присутствии 5 % CO₂ в концентрации 5·10⁶/мл в среде RPMI-1640 с 10 % фетальной бычьей сыворотки («Flow»), 20 мМ буфера HEPES, 2 мМ L-глутамин и 50 мкг/мл гентамицина. Конечная концентрация ГМДП в культурах клеток селезенки была 13,48, 1,35 и 0,135 мкг/мл. Активность ФНО в надосадках определяли с помощью фотометрического теста с кристаллическим фиолетовым по степени лизиса опухолевых клеток-мишеней L-929 [8]. Об активности ИЛ-1 судили по прямому митогенному действию супернатантов на тимоциты мышей C57BL/6 [12]. В части опытов продукцию

ИЛ-1 индуцировали при культивировании перитонеальных макрофагов мышей C57BL/6, которым предварительно 3-кратно с интервалом 2 дня вводили внутривенно по 20 мкг ГМДП, в присутствии ЛПС (50 мкг/мл). Тумороцидность перитонеальных макрофагов мышей C57BL/6 после введения 3 доз ГМДП оценивали по токсическому действию на опухолевые клетки P815, используя модификацию мембранотоксического теста с ³H-уридином [5]. Спонтанную пролиферацию клеток селезенки мышей C57BL/6, получивших однократную инъекцию ГМДП, оценивали по включению ³H-тимидина на 3-й день культивирования. Метаболическую активность клеток костного мозга, связанную с действием на них эндогенного колониестимулирующего фактора (КСФ), определяли по включению ³H-галактозы в клетки [13]. Для иммунотерапии мышей C57BL/6 с подкожными узлами лимфомы EL-4, достигшими размеров 1 см, мышам однократно внутрибрюшинно вводили циклофосфан («Sigma») и внутривенно с интервалом 2 дня делали 6 инъекций ГМДП (20 мкг/мышь) и ЛПС Escherichia coli 055 («Difco») по 10 мкг/мышь. В течение всего опыта мыши-опухолесосители получали в питьевой воде индометацин («Sigma») из расчета 7 мкг/мл. Об эффекте иммунотерапии судили по увеличению продолжительности жизни леченых мышей и по количеству вылеченных животных.

Результаты и обсуждение

В I серии опытов исследовали влияние ГМДП на продукцию спленоцитами мышей ФНО и ИЛ-1 при 24-часовом культивировании. Ранее мы показали, что мурамилдипептид вызывает слабую продукцию ФНО клетками селезенки мышей в концентрации 10 мкг/мл и ниже [7]. В эквивалентных количествах (13,48 мкг/мл и ниже) ГМДП обладал существенно большей активностью (рис. 1). Иммуностимулирующий эффект ГМДП имел дозозависимый характер. ГМДП вызывал также продукцию ИЛ-1 спленоцитами мышей, однако в этом случае наиболее эффективной была доза 1,35 мкг/мл. При внутрибрюшинном введении мышам A/Sp с подкожными узлами саркомы SA-I ГМДП не вызывал появление ФНО в сыворотке крови мышей, тогда как в сочетании с ЛПС он давал выраженный синергичный эффект (рис. 2). Введение ГМДП мышам C57BL/6 сенсибилизировало их перитонеальным макрофагам к дополнительной стимуляции ЛПС *in vitro*, что проявлялось в более выраженной продукции ИЛ-1 (рис. 3). Введение ГМДП восстанавливало сниженную опухолецидную активность перитонеальных макрофагов у мышей C57BL/6 с подкожными узлами тимомы EL-4. При введении ГМДП мы-

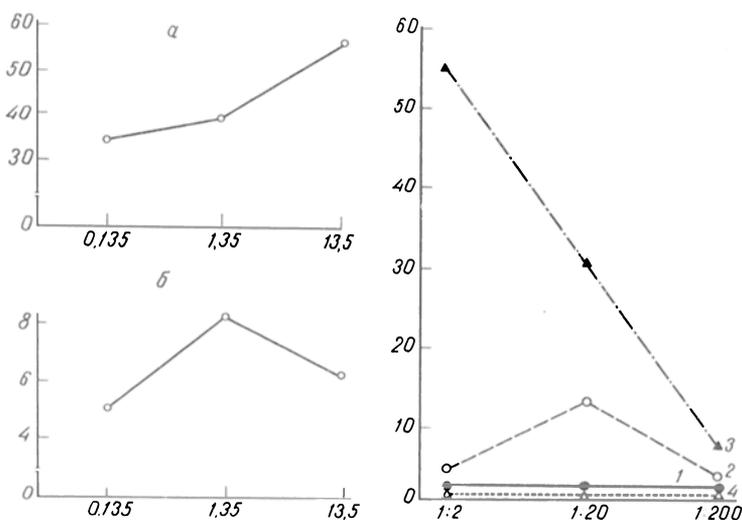


Рис. 1. Продукция ФНО (а) и ИЛ-1 (б) спленоцитами мышей DBA/2 при активации ГМДП *in vitro*. По оси ординат: а — цитотоксический индекс (в %), показывающий степень лизиса монослота клеток L-929 в лунках с надосадками (разведение 1:2) по сравнению с лунками со средой; б — индекс стимуляции пролиферации тимоцитов мышей C57BL/6 в лунках с надосадками (разведение 1:4) по отношению к лункам со средой; по оси абсцисс — конечная концентрация ГМДП в лунках, мкг/мл. Средние данные 3 опытов.

Рис. 2. Появление ФНО в сыворотке мышей A/Sp с сингенной саркомой SA-I после 3-кратного введения ГМДП и ЛПС.

По оси ординат — цитотоксический индекс (в % к контролю); по оси абсцисс — разведения сывороток. 1 — ГМДП (20 мкг/мышь), 2 — ЛПС (10 мкг/мышь), 3 — ГМДП+ЛПС, 4 — без введений.

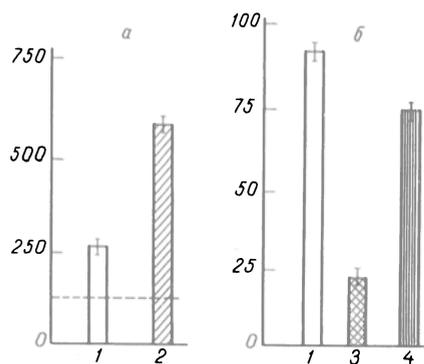


Рис. 3. Активация опухоцидных свойств перитонеальных макрофагов мышей С57BL/6 (б) и их способности вырабатывать ИЛ-1 при стимуляции ЛПС (а) при введении ГМДП. По оси ординат: а — включение ³H-тимидина в тимодитах мышей С57BL/6, имп/мин, б — цитотоксический индекс (в %), показывающий степень лизиса мишеней Р815 при добавлении макрофагов. Макрофаги получали от интактных мышей С57BL/6 (1) при 3-кратном введении ГМДП (2), а также от опухоленосителей С57BL/6 с лейкозом EL-4: без лечения (3) и после 3-кратного введения ГМДП (4). Пунктирная линия — контроль.

шам С57BL/6 отмечена умеренная стимуляция спонтанной пролиферации спленоцитов и некоторое усиление их пролиферативного ответа на ИЛ-2 (рис. 4). ГМДП также достоверно стимулировал включение ³H-галактозы в клетки костного мозга у интактных мышей А/Sp (рис. 4).

Из таблицы следует, что введение только ГМДП мышам С57BL/6 с подкожными узлами опухоли EL-4 не влияло на темп роста опухоли и продолжительность жизни мышей. В комбинации с ЛПС, циклофосфаном и индометацином ГМДП значительно увеличивал продолжительность жизни мышей. В 24 % случаев наблюдали полное излечение.

Интересно отметить, что ГМДП стимулировал продукцию ФНО спленоцитами *in vitro*, но при введении *in vivo* не вызывал появления ФНО в крови. В первом случае в супернатанте, по-видимому, содержались как ФНО, продуцируемый макрофагами, так и лимфотоксин, продуцируемый активированными лимфоцитами и вызывающий лизис мишеней L-929. Поскольку *in vitro* и *in vivo* использовали сравнимые дозы ГМДП, можно предположить также, что особенности фармакодинамики ГМДП *in vivo* не позволяют добиться стимулирующего эффекта, получаемого в культуре ткани. В пользу этого свидетельствуют данные о быстром выведении мурамилдипептида из

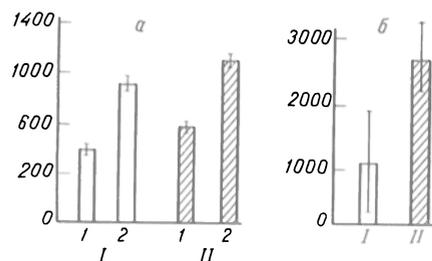


Рис. 4. Стимуляция пролиферативной активности клеток селезенки (а) и клеток костного мозга (б) мышей под действием ГМДП.

По оси ординат: а — включение ³H-тимидина в клетки селезенки, б — включение ³H-галактозы в клетки костного мозга, имп/мин. I — интактные мыши, II — мыши с однократным введением ГМДП. I — спонтанная пролиферация, 2 — пролиферация при стимуляции 2 ЕД/мл рекомбинантного ИЛ-2 человека («Sandoz», Австрия).

Влияние ГМДП и комбинации иммуномодуляторов, включающей ГМДП, на продолжительность жизни и количество вылеченных мышей С57BL/6 с лимфомой EL-4

Терапия	Число мышей в группе	Средняя продолжительность жизни, сут	Число вылеченных животных
Без лечения ГМДП	10	31,7 ± 1,5	0
Комбинация иммуномодуляторов (ГМДП, ЛПС, индометацин, циклофосфан)	13	31,7 ± 1,0	0
	25	58,1 ± 4,1	6 (24 %)

организма после внутривенного введения [14]. Важным свойством ГМДП является его способность к синергичному действию с ЛПС на продукцию ФНО и ИЛ-1. В последнем случае внутривенное введение ГМДП сенсibilizировало перитонеальные макрофаги к стимуляции ЛПС. Важно также, что ГМДП восстанавливал опухоцидную активность перитонеальных макрофагов, супрессированных опухолевым ростом. Перечисленные выше факты позволяют предложить препарат для иммунотерапии опухолей. Действительно, комбинация ГМДП с ЛПС, циклофосфаном и индометацином была эффективна в иммунотерапии мышей С57BL/6 с лимфомой EL-4. По-видимому, более активными должны быть липофильные производные ГМДП. Так, мурамилдипептид-фосфатидилэтаноламин в липосомах существенно тормозил метастазирование опухоли В16 в легкие мыши, что было связано со значительно более медленным выведением липофильного препарата из ткани легких [9].

Полученные данные свидетельствуют о макрофаге как одной из основных мишеней для ГМДП *in vitro* и *in vivo*. Усиление пролиферации лимфоцитов селезенки под действием ГМДП также может быть следствием первичной активации макрофагов и синтеза ими ИЛ-1. Этот же механизм может приводить к стимуляции продукции КСФ, хотя нельзя исключить прямого действия ГМДП на лимфоциты. Таким образом, становится вдвойне актуальным создание липофильных аналогов ГМДП: в этом случае препарат значительно в большей степени интернализуется макрофагами и соответственно сильнее их активует, чем находясь в водном растворе [10].

ЛИТЕРАТУРА

- Иванов В. Т. // Вопр. мед. химии.— 1984.— № 3.— С. 23—31.
- Малайцев В. В., Богданова И. М., Сухих Г. Т., Андронova Т. М. // Бюл. exper. биол.— 1985.— № 8.— С. 221—223.
- Пименов А. А., Фукс Б. Б., Андронova Т. М. // Структура, биосинтез и функции молекулярных элементов иммунной системы.— Пуцино, 1987.— С. 39.
- Ростовцева Л. П., Андронova Т. М., Малькова В. П. и др. // Биоорг. химия.— 1981.— Т. 7.— С. 1843—1858.
- Рыкова М. П., Спиранде И. В., Задгендзе М. С. и др. // Иммунология.— 1981.— № 3.— С. 88—90.
- Терехов О. П., Кашкин К. П., Китаева М. Н. и др. // Там же.— 1985.— № 5.— С. 55—58.
- Фукс Б. Б., Рахмилевич А. Л., Пименов А. А., Дубровская А. Г. // Бюл. exper. биол.— 1987.— № 10.— С. 497—499.
- Fisch H., Gifford G. E. // Int. J. Cancer.— 1983.— Vol. 32, N 1.— P. 105—112.

9. Fidler I. J. // Cancer Immunol. Immunother.— 1986.— Vol. 21.— P. 169—173.
10. Fogler W. E., Fidler I. J. // Int. J. Immunopharmacol.— 1987.— Vol. 9.— P. 141—150.
11. Fuchs B. B., Rakhmievitch A. L., Pimenov A. A., Deev V. V. // Periodicum Biol.— 1987.— Vol. 89, Suppl.— P. 192.
12. Meltzer M. S., Oppenheim J. J. // J. Immunol.— 1977.— Vol. 118.— P. 77—82.
13. Monner D. A., Muhradt P. F. // J. Immunol. Meth.— 1984.— Vol. 68.— P. 319—330.
14. Parant M., Parant F., Chedid L. et al. // Int. J. Immunopharmacol.— 1979.— Vol. 1.— P. 35—47.

Поступила 31.01.88

ACTIVATION OF CELLULAR IMMUNITY BY MEANS OF GLUCOSAMINYL MURAMYL DIPEPTIDE IN MICE WITH TUMORAL GROWTH AND IN NORMAL STATE

A. A. Pimenov, A. L. Rakhmievich, V. V. Deev, I. V. Kirillova, T. L. Migdal, T. M. Andronova, B. B. Fux

Institute of Experimental Diagnosis and Therapy of Tumors, All-Union Oncological Research Centre, Institute of Human Morphology, Academy of Medical Sciences of the USSR, Institute of Bioorganic Chemistry, Academy of Sciences of the USSR, Moscow

In vitro stimulation of mice spleen cells by means of glucosaminyl muramyl dipeptide (GMDP) was accompanied by development of tumor necrosis factor and of interleukine-1. The factor was detected in blood serum only after administration of GMDP simultaneously with lipopolysaccharide. GMDP activated peritoneal macrophages; the phenomenon was evaluated by means of the macrophages ability to kill tumoral cells P815 as well as by interleukine-1 production after additional stimulation with lipopolysaccharide. At the same time, an increase in proliferating activity of spleen and bone marrow cells was observed. An increase of middle lifetime and recovery of 24 % mice of C57BL/6 strain with leukosis EL-4 were observed after complex treatment of the animals with GMDP, lipopolysaccharide, cyclophosphane and indometacin.

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 1990

УДК 615.275.4.015.4:1616-008.939.15-39-02:616-008.922.1]-076.9

Б. Н. Галкин, В. А. Баринев, Л. А. Тиунов, Т. О. Филиппова, В. А. Иванова, Н. Я. Головенко, Л. А. Литвинова

ВЛИЯНИЕ ТИЛОРОНА НА СИСТЕМЫ ПЕРЕКИСНОГО ОКИСЛЕНИЯ И АНТИПЕРЕКИСНОЙ ЗАЩИТЫ В НОРМЕ И ПРИ ГИПОКСИИ

Одесский университет им. И. И. Мечникова

При гипоксических состояниях активируется перекисное окисление липидов (ПОЛ) [3, 7]. Это связано с тем, что в этих условиях при функционировании митохондриальных цепей переноса электронов накапливаются продукты ПОЛ [6]. Монооксид углерода, вызывая оксиглеродную интоксикацию, приводит к гипоксии и поэтому часто используется в качестве гипоксического агента. Он также стимулирует ПОЛ. Многие химические соединения, которые используются для устранения гипоксических и аноксических состояний, являются антиоксидантами [7, 11].

Довольно часто при гипоксиях наблюдается иммунодепрессия и снижается неспецифическая резистентность организма [7]. Для восстановления этой важной системы используются иммуностимуляторы как природного, так и синтетического

происхождения [4]. К последним относится тилорон — производное флуореион-9-она. Он является индуктором интерферона, иммуностимулятором и противовирусным агентом [17], а также эффективным ингибитором цитохрома P-450 [1], участвующим в регуляции процессов ПОЛ в биомембранах. Цель работы — изучение влияния тилорона на активность ПОЛ в разных клетках, а также на показатели антирадикальной и антиперекисной защиты.

Методика

Опыты проводили на мышках-самцах линии СВА массой 18—20 г и беспородных крысах-самцах массой 180—220 г. Тилорон вводили внутривенно 2-кратно с интервалом в 1 сут по 50 мг на 1 кг массы тела в день. Через 1 сут после вторичной инъекции препарата часть подопытных животных подвергали воздействию СО. Подострое воздействие окиси углерода осуществляли в металлических камерах объемом 0,5 м³. Затравки проводили динамическим способом. Концентрацию окиси углерода в воздухе поддерживали на уровне 1000 мг/м³ и контролировали аналитически. Экспозиция составляла 24 ч. Контролем служили интактные животные.

У мышей выделяли тимоциты, спленоциты, макрофаги, гепатоциты [2, 5]. Интенсивность ПОЛ определяли по количеству образовавшегося МДА [10]. В качестве среды инкубации использовали 0,025 М трис-НСl-буфер рН 7,4, содержащий 0,175 М КСl. В пробу объемом 1 мл вносили 5·10⁶ клеток и инкубировали при постоянном встряхивании на водяной бане при 37 °С в течение 40 мин. Кроме спонтанного ПОЛ, во всех клетках определяли НАДФ·Н-зависимое и аскорбат-зависимое ПОЛ. Для этого в среду инкубации в первом случае вносили 5·10⁻⁴ М НАДФ·Н, 2·10⁻⁴ М АДФ, 12·10⁻⁶ М FeSO₄, а во втором случае — 8·10⁻⁴ М аскорбата, 2·10⁻⁴ М АДФ и 12·10⁻⁶ М FeSO₄.

У крыс определяли следующие показатели: содержание глутатиона в печени, почках, сердечной мышце и сульфгидрильных групп в крови [8], аскорбиновой кислоты в надпочечниках [9], уровень диеновых конъюгатов (ДК) в крови и печени [3], активность супероксиддисмутазы (СОД) в крови и печени [13], активность глюкозо-6-фосфатдегидрогеназы (Г-6-ФДГ) в крови и печени [14]. Экспериментальные результаты обрабатывали статистически.

Результаты и обсуждение

Как видно из табл. 1, введение животным тилорона усиливает ПОЛ в клетках тимуса. Ин-

Таблица 1

Интенсивность ПОЛ (в нмоль МДА/мин·10⁶ клеток) в биомембранах иммуноцитов и гепатоцитов при введении мышам тилорона ($M \pm m$, $n=4-8$)

Условия опыта	Спонтанное ПОЛ	НАДФ·Н-зависимое ПОЛ (ПЗП)	Аскорбат-зависимое ПОЛ (АЗП)	ПЗП/АЗП
Тимоциты				
Контроль	0,6±0,1	1,8±0,2	1,9±0,2	1,06
Тилорон	0,7±0,1	1,6±0,2	2,7±0,3*	1,69
Спленоциты				
Контроль	1,0±0,1	5,0±0,5	7,5±0,9	1,50
Тилорон	0,9±0,1	2,0±0,2*	1,6±0,3*	0,80
Макрофаги				
Контроль	25±3	37±4	80±5	2,16
Тилорон	26±3	17±4*	54±4*	3,18
Гепатоциты				
Контроль	40±8	330±60	410±60	1,24
Тилорон	39±5	150±12*	300±30	2,00

* $p < 0,05$ относительно контроля.

тенсивность НАДФ·Н-зависимого ПОЛ увеличивается в 1,4 раза. В спленоцитах аскорбат-зависимое и НАДФ·Н-зависимое ПОЛ ингибируется соответственно на 60—80 %. В макрофагах отмечено снижение интенсивности ПОЛ в случае ферментного процесса на 34 %, а в случае неферментного — на 54 %. После введения тилорона в гепатоцитах также отмечается уменьшение интенсивности ПОЛ. Расчет соотношения между НАДФ·Н-зависимым и аскорбатзависимым ПОЛ позволяет определить вклад ферментного и неферментного путей ПОЛ. Показано, что введение тилорона приводит к еще большему смещению ПОЛ в тимоцитах, макрофагах и гепатоцитах в сторону энзиматического процесса, в то время как в спленоцитах преобладает неферментное окисление. Полученные экспериментальные результаты позволяют предположить, что система ПОЛ играет важную роль в регуляции иммунного статуса и неспецифической резистентности организма. Более того, известно, что простаноиды и гидроперекиси жирных кислот являются эндогенными регуляторами иммунных реакций и могут образовываться в результате НАДФ·Н-зависимого ПОЛ. Кроме того, ПОЛ может изменять проницаемость клеточных мембран, в частности для лизосомальных ферментов макрофагов, различных медиаторов и эффекторных молекул иммунных реакций. Таким образом, иммуностимулятор тилорон нельзя назвать прямым антиоксидантом, так как в зависимости от типа клеток он может выступать и как антиоксидант, и как прооксидант.

Как видно из табл. 2, после введения тилорона на 30 % снижается уровень ДК ненасыщенных жирных кислот в плазме крови. Затравка животных СО в течение 24 ч в 1,2 раза повышает содержание ДК. Подобное увеличение уровня ДК было отмечено и в печени (в 1,6 раза), т. е. СО ведет себя как типичный гипоксический агент, что было детально исследовано ранее [12]. У животных, не подвергавшихся воздействию СО, тилорон снижает уровень ДК в плазме на 16 %, а его предварительное введение

уменьшает этот показатель после затравки на 30 %. Подобная направленность действия иммуностимулятора отмечена и в печени, только изменения выражены не так ярко. Одним из показателей, который характеризует состояние антиперекисной защиты организмов, является содержание восстановленного глутатиона в органах и тканях. Тилорон почти в 2 раза повышал концентрацию глутатиона в печени, но не влиял на его содержание в почках и почти в 2 раза снижал уровень глутатиона в сердечной мышце. Обработка животных СО показала, что гипоксический агент в зависимости от типов исследуемых тканей также оказывает разное влияние на концентрацию глутатиона. Если его содержание в печени не изменялось, то в почках и сердечной мышце оно снижалось на 24—30 %. Предварительное введение тилорона повышало количество глутатиона в печени на 50 % и практически не влияло на его концентрацию в почках. Что касается направленности действия тилорона на уровень глутатиона в сердечной мышце, то следует отметить следующее: если обработка интактных животных иммуностимулятором приводит к снижению содержания исследованного соединения, то на фоне отравления СО он повышал концентрацию глутатиона в 1,4 раза. Изменение содержания глутатиона может свидетельствовать об изменениях активности глутатионзависимых ферментов — глутатионредуктазы, глутатионпероксидазы.

Тилорон также снижает активность каталазы в печени на 30 % как у интактных животных, так и у животных, которых подвергали действию СО. Но одновременное увеличение в этом органе количества восстановленного глутатиона позволяет предположить, что возможный избыток эндогенного H₂O₂ будет разлагаться глутатионпероксидазой, поэтому блокирование им каталазы не будет давать токсический эффект в отношении клеток печени за счет действия перекиси водорода. Следует отметить, что интоксикация СО приводит к тому, что в основном снижается содержание глутатиона в сердечной мышце,

Т а б л и ц а 2

Состояние антиперекисной и антирадикальной систем клеток белых крыс при действии тилорона и СО ($M \pm m$, $n=6-8$)

Показатель	Контроль	Через 24 ч после введения тилорона	Воздействие СО, 1000 мг/м ³ , 24 ч	Животные, получавшие тилорон перед воздействием СО
ДК в крови, АЕ 233 нм на 1 мл плазмы	0,457±0,019	0,318±0,064 ^а	0,502±0,051 ^а	0,385±0,021 ^{а, б}
ДК в печени, АЕ 233 нм на 1 г ткани	0,367±0,042	—	0,592±0,021 ^а	0,525±0,038 ^а
Глутатион в печени, мг на 100 г ткани	87,00±4,31	156,00±8,10 ^а	85,20±7,30	131,30±9,20 ^{а, б}
Глутатион в почках, мг на 100 г ткани	63,60±2,14	50,40±4,22	44,40±2,60 ^а	48,00±1,70 ^а
Глутатион в сердечной мышце, мг на 100 г ткани	41,20±3,34	18,70±1,70 ^а	31,50±3,00 ^а	44,20±1,10 ^б
СОД в крови, ед. на 1 мг белка	90,70±3,21	88,50±2,60	91,20±4,20	98,30±4,10
СОД в печени, ед. на 1 мг белка	98,69±2,80	101,00±3,24	87,30±1,35 ^а	86,50±2,80 ^а
Каталаза в печени, вОП/мин на 1 мг белка	6,76±0,40	4,78±0,40 ^а	7,06±0,30	4,72±0,40 ^{а, б}
SH-группы в крови, мг %	1650±96	1492±115	3825±365 ^а	2100±568 ^б
Аскорбат в надпочечниках, мг %	235,0±11,2	182,0±7,6 ^а	210,5±3,2 ^а	161,3±7,1 ^{а, б}
Г-6-ФДГ в крови, нмоль НАДФ·Н/мин на 1 мг белка	2,65±0,12	2,61±0,19	2,12±0,02 ^а	19,5±0,06 ^а
Г-6-ФДГ в печени, нмоль НАДФ·Н/мин на 1 мг белка	5,30±0,35	4,03±0,34 ^а	3,48±0,46 ^а	4,46±0,51 ^а

Примечание. ^а — достоверные различия по отношению к контролю, ^б — достоверные различия по отношению к воздействию СО.

тогда как тилорон вызывает нормализацию его уровня. Это может свидетельствовать, что усиление активности глутатионсодержащих ферментов будет способствовать защите клеток сердечной мышцы от воздействий эндогенных перекисей.

Одним из показателей, который характеризует состояние антиперекисной и антирадикальной защиты, служит количество сульфгидрильных групп. При действии свободных радикалов происходит их окисление [16]. Тилорон не изменяет содержания SH-групп в крови у интактных животных. Вместе с тем подострое отравление СО почти в 2,3 раза увеличивает концентрацию SH-групп. Причиной подобного явления может быть снижение содержания кислорода в крови, так как окисление сульфгидрильных групп крови связано с молекулярным кислородом. Предварительное введение иммуностимулятора приводит к тому, что содержание SH-групп незначительно повышалось по сравнению с фоновым уровнем и снижалось на 45 % по сравнению с уровнем сульфгидрильных групп у животных, которых подвергали интоксикации СО. Вероятно, при действии тилорона происходит частичное обогащение крови кислородом. Одним из показателей неферментной перекисной защиты служит концентрация аскорбиновой кислоты. Аскорбат является водорастворимым ангиооксидантом. Тилорон уменьшает в среднем на 30—40 % содержание аскорбиновой кислоты как у интактных животных, так и у животных, отравленных СО. Аскорбат, кроме того, играет определенную роль в биосинтезе гема. Так, было отмечено [18], что при ингибировании цитохрома Р-450 снижается содержание аскорбиновой кислоты и, наоборот, при индукции цитохрома Р-450 количество аскорбата возрастает. Поэтому уменьшение уровня аскорбиновой кислоты может свидетельствовать об ингибирующем действии тилорона на систему цитохрома Р-450. Нами было показано [9], что тилорон является эффективным ингибитором ферментов, содержащих цитохром Р-450.

Для более полной оценки защитных систем организма от воздействий токсических агентов довольно часто используется уровень активности Г-6-ФДГ. Это один из ключевых ферментов глюкозомонофосфатного шунта, который приводит к образованию эндогенного НАДФ·Н. Эндогенный НАДФ·Н, с одной стороны, необходим для функционирования монооксигеназной системы, зависимой от цитохрома Р-450, а с другой — для глутатионредуктазы [4]. Введение тилорона интактным животным не изменяет активность Г-6-ФДГ в крови, но почти на 30 % снижается ее уровень в печени. Обработка животных СО ингибирует Г-6-ФДГ в крови и печени в среднем на 20—40 % от уровня контроля. Предварительное введение животным иммуностимулятора практически не изменяло активность этого фермента в крови и несколько усиливало действие Г-6-ФДГ в печени по сравнению с его уровнем, который сложился при обработке животных монооксидом углерода. Так как для нормального функционирования монооксигеназы необходим НАДФ·Н, то ингибирующее действие тилорона на эту систему может быть связано с блокированием Г-6-ФДГ.

Таким образом, представленные экспериментальные результаты свидетельствуют о множественности эффектов тилорона на системы антирадикальной и антиперекисной защиты. Не исключено, что подобная картина складывается при повышении неспецифической резистентности организма, активатором которой является тилорон.

ЛИТЕРАТУРА

1. Богатский А. В., Галкин Б. Н., Головенко Н. Я. и др. // Укр. биохим. журн.— 1981.— Т. 52, № 6.— С. 108—110.
2. Богатский А. В., Филиппова Т. О., Ковалев И. Е. и др. // Бюл. exper. биол.— 1983.— № 7.— С. 23—24.
3. Владимиров Ю. А., Арчаков А. И. Перекисное окисление липидов в биологических мембранах.— М., 1972.
4. Голиков С. Н., Сапоцкий И. В., Тиунов Л. А. Общие механизмы токсического действия.— Л., 1986.
5. Головенко Н. Я., Филиппова Т. О., Галкин Б. Н. // Укр. биохим. журн.— 1984.— Т. 56, № 1.— С. 42—46.
6. Меерсон Ф. З. // Физиология адаптационных процессов.— М., 1986.— С. 521—621.
7. Меерсон Ф. З. Адаптация, стресс и профилактика.— М., 1981.
8. Рубина Х. М., Романчук Л. А. // Вопр. мед. химии.— 1967.— № 6.— С. 652—654.
9. Селочник Л. И., Кацер К. Ф. // Лаб. дело.— 1967.— № 3.— С. 179—181.
10. Современные методы в биохимии / Под ред. В. И. Ореховича.— М., 1977.— С. 53—68.
11. Тиунов Л. А. // Основы общей промышленной токсикологии.— Л., 1976.— С. 184—198.
12. Тиунов Л. А. и др. // Гиг. труда.— 1986.— № 9.— С. 30—33.
13. Beers R. F., Sizer I. W. // J. biol. Chem.— 1952.— Vol. 195, N 1.— P. 133—141.
14. Bergmeyer H. Methoden der enzymatischen Analysis.— Weinheim, 1962.
15. Fried R. // Biochem. J.— 1975.— Vol. 57, N 2.— P. 657—660.
16. Kappus H., Sies H. // Experientia (Basel).— 1981.— Vol. 37, N 12.— P. 1233—1241.
17. Krueger R. F., Mayer G. D. // Science.— 1970.— Vol. 169.— P. 1213—1214.
18. Renton K. W., Keyler D. E., Mannering G. J. // Biochem. biophys. Res. Commun.— 1979.— Vol. 88, N 3.— P. 1017—1023.

Поступила 25.05.88

EFFECT OF TYLORONE ON LIPID PEROXIDATION AND ANTIOXIDATION SYSTEM UNDER CONDITIONS OF NORMAL STATE AND HYPOXIA

B. N. Galkin, B. A. Barinov, L. A. Tiunov, T. O. Filippova, V. A. Ivanova, N. Ya. Golovenko, L. A. Litvinova

I. I. Mechnikov State University, Odessa.

Modifying effects of widely used immunomodulator tylorone on lipid peroxidation and the state of antioxidant system were studied under conditions of normal state as well as in subacute poisoning with carbon monoxide. Multiple effects of tylorone on these reactions were found in various tissues. The drug increased content of reduced glutathione in liver tissue, while amount of the substance was decreased in kidney and heart muscle. Content of diene conjugates and of SH-groups in blood, content of ascorbate in adrenal glands and activity of glucose-6-phosphate dehydrogenase in liver tissue were found to decrease. After administration of tylorone alterations of the most patterns studied under hypoxic conditions were similar to those of normal state. At the same time, the oppositely directed alterations were detected in content of reduced glutathione in heart muscle and in activity of glucose-6-phosphate dehydrogenase in liver tissue under conditions of carbon monoxide poisoning.

В. Н. Витвицкий, А. В. Тимонин

ВКЛЮЧЕНИЕ [¹⁴C]-АДЕНИНА В НЕЙРОНЫ И ГЛИЮ КОРЫ ГОЛОВНОГО МОЗГА КРЫС ПОСЛЕ ГИПОКСИИ И ТРАНСПЛАНТАЦИИ ЭМБРИОНАЛЬНОЙ НЕРВНОЙ ТКАНИ

Институт общей генетики им. Н. И. Вавилова АН СССР, Москва

В последние годы успешно развивается новое направление экспериментальной нейробиологии и медицины — трансплантация эмбриональной нервной ткани [6, 10, 12, 16]. Установлено, что в клетках нервной ткани при трансплантации происходит нарушение обмена макромолекул [14, 18]. Наблюдаемые явления обусловлены эффектом локального повреждения при операции трансплантации и эффектом присутствия эмбриональной ткани трансплантата, развивающейся внутри мозга взрослого животного [1, 12, 15, 17]. Показано, что при трансплантации нарушается синтез ДНК и белка в ткани мозга [1, 7—9, 16]. Изменения более выражены, если операция трансплантации производится животным, предварительно подвергнутому гипоксии, которая в применяемой нами модификации вызывает диффузное повреждение и необратимую дистрофию до 36 % нейронов [7, 8].

Повреждение при гипоксии может служить моделью патологических изменений, наблюдаемых при детском церебральном параличе, болезни Альцгеймера, старческом слабоумии и других патологических процессах [6]. Изменения синтеза РНК, изучаемые на такой модели, должны иметь ряд особенностей. РНК, как наиболее лабильные из всех классов макромолекул, должны гораздо сильнее повреждаться при исследуемых воздействиях. В то же время известно, что нейроны и глиальные клетки синтезируют различное количество РНК, которые сильно различаются качественно, прежде всего по стабильности. Следовательно, определенные повреждающие воздействия могут специфически влиять на набор РНК и интенсивность ее биосинтеза в нейронах и глии, что, несомненно, по-разному отразится на компенсаторно-восстановительных процессах в этих клетках.

Настоящее исследование предпринято с целью изучения влияния локального и общего диффузного повреждения коры мозга, а также трансплантации эмбриональной нервной ткани на состояние нейронов и глиальных клеток и синтез в них РНК.

Методика

Крыс-самок линии Вистар массой 180—240 г подвергали гипоксической гипоксии по методу Е. И. Домонтович [4]. Через 20 дней одной группе животных производили операцию трансплантации эмбриональной нервной ткани в паренхиму коры мозга по методу, разработанному в нашей лаборатории [6, 16], другой — такое же повреждение ткани мозга без введения трансплантата. Через 3 сут после операции нормальным взрослым животным контрольной группы, животным, подвергнутым процедуре гипоксии, животным, под-

вергнутым гипоксии и локальному повреждению ткани мозга, животным, подвергнутым гипоксии и операции трансплантации, внутривенно вводили [¹⁴C]-аденин удельной радиоактивности 39 мКи на 1 г массы. Использование меченого аденина для изучения синтеза РНК в ткани мозга связано, во-первых, с тем, что, согласно данным Н. Д. Грачевой [3], включение уридина в РНК мозга в условиях, близких к условиям нашего опыта, очень мало, тогда как аденин включается значительно активнее. С другой стороны, в наших предыдущих работах [1] показано, что локальное повреждение ткани коры мозга крыс, перенесших гипоксию, и процедура трансплантации на 4-й день после операции не изменяют синтеза ДНК в удаленных от участка травмы или трансплантата структурах мозга, что позволяет трактовать любые изменения включения аденина, если они будут обнаружены, как изменения, связанные с процессом синтеза РНК. Для количественной оценки интенсивности синтеза РНК и ДНК использовали метод последовательного гидролиза РНК и ДНК на нитроцеллюлозных фильтрах и определения оставшейся метки после отмывания от продуктов гидролиза [12].

Через 1 сут после введения метки крыс декапитировали, выделяли кору мозга и из нее кусочки серого вещества размером 2×2×2 мм, достаточно удаленные от трансплантата, либо из коры неоперированного полушария.

Полученные кусочки промывали в физиологическом растворе и гомогенизировали в 0,5 мл 0,1 М цитратного буфера pH 5,6, доводили до 1 мл тем же буфером, добавляли 3 мл этанола и охлаждали до -18 °С. Образовавшиеся осадки дважды промывали смесью цитратный буфер — этанол (1:3) с последующим центрифугированием при 5000 об/мин в течение 10 мин, суспендировали в 1,8 мл дистиллированной воды, добавляли к суспензии 0,2 мл 10 % додецилсульфата натрия и прогревали 1 ч при 90 °С в закрытых пробирках. Аликвоты по 0,2 мл каждого препарата отбирали для определения концентрации белка и нуклеиновых кислот, а оставшуюся часть (1,8 мл) растворяли в сцинтиляторе («Unisolve-100», Великобритания). В полученных препаратах подсчитывали радиоактивность на жидкостном сцинтиляционном счетчике «Mark-1» (США).

Фракции, обогащенные клетками нейронов и глии, получали по модифицированному методу Фрейза и соавт. [11]. Полученные осадки нейронов и глиальных клеток суспендировали в воде и из них готовили препараты для определения концентрации белка и нуклеиновых кислот и для подсчета радиоактивности, как описано выше.

Во фракциях, обогащенных нейронами и глией, определяли количество белка и рассчитывали отношение содержания белка во фракции нейронов или глиальных клеток к суммарному содержанию белка в обеих фракциях (процент нейронов и глиальных клеток в препаратах коры).

Концентрацию белка (С) в пробах определяли по формуле:

$$C \text{ (мг/мл)} = \frac{E_{235} - E_{280}}{2,51}$$

При расчете количества РНК учитывали наши предыдущие определения [2], согласно которым раствор дезоксирибонуклеопротеиновых частиц при концентрации 1 мг/мл имеет величину E_{260} , равную 10. Содержание ДНК в коре головного мозга взрослых крыс составляет 0,84 мкг на 1 мг ткани, содержание РНК — 1,94 мкг на 1 мг ткани. На основании этих данных доля РНК в общем поглощении нуклеиновых кислот составит: $\frac{\text{РНК}}{\text{РНК} + \text{ДНК}} = \frac{1,94}{2,78}$. Учитывая, что максимум поглощения РНК находится приблизительно в области 260 им, а суммарный белок, экстрагируемый из ткани мозга при 260 и 300 им, поглощает примерно одинаково, расчет концентрации РНК можно произвести по формуле:

$$\text{РНК (мг/мл)} = \frac{(E_{260} - E_{300}) \cdot 1,94}{2,78 \cdot 10}$$

Результаты и обсуждение

Из представленных в таблице данных видно, что гипоксия, локальное повреждение и присутствие эмбриональной нервной ткани по-разному влияют на скорость синтеза РНК в коре головного мозга взрослых животных.

Гипоксическая гипоксия уменьшает интенсивность включения [¹⁴C]-аденина в РНК клеток коры головного мозга по сравнению с уровнем,

Включение [¹⁴C]-аденина (в имп/мин на 1 мг РНК) в цельную ткань коры мозга, нейроны и глиальные клетки крыс ($M \pm m$)

Объем исследования	Группа животных			
	норма	гипоксия	гипоксия + локальная травма	гипоксия + трансплантат
Кора мозга	3411 ± 330	2830 ± 183	3893 ± 429	1447 ± 149
Количество нейронов, %	25,7 ± 1,5	17,9 ± 1,4	20,1 ± 1,5	26,0 ± 3,3
Нейроны	2913 ± 312	3062 ± 430	4932 ± 422	3344 ± 290
Глиальные клетки	2965 ± 297	3910 ± 616	4619 ± 528	2860 ± 232

наблюдаемым у контрольных животных. При этом происходит уменьшение количества нейронов, выделяемых из коры, до 18 % по сравнению с 26 % у интактных крыс, т. е. приблизительно на 30 %, что соответствует результатам, полученным ранее в подобных же опытах методом подсчета количества нативных нейронов на гистологических препаратах [7, 8]. Оставшиеся нервные клетки синтезируют РНК со скоростью, которая достоверно не отличается от скорости синтеза РНК в нейронах нормальных животных. Можно предположить, что используемая нами методика выделения фракций, обогащенных нейронами, дает возможность избавляться от поврежденных и подвергшихся дистрофии клеток на какой-то стадии выделения. Одновременно с потерей части нейронов приблизительно на 30 % возрастает интенсивность синтеза РНК в глиальных клетках. Эти два противоположных эффекта в сумме дают некоторое снижение общей интенсивности синтеза РНК. По-видимому, в гомогенатах цельной коры в суммарную активность синтеза РНК вносят вклад РНК не только интактных клеток, но и поврежденных, которые теряются при выделении нейронов и глиальных клеток. Вследствие этого интенсивность синтеза РНК в препаратах цельной коры будет ниже, чем удельная активность в выделенных фракциях нейронов и глии.

Локальная травма коры головного мозга на 4-й день после повреждения резко усиливает включение метки в РНК клеток коры. Это увеличение наблюдается на участках коры, значительно удаленных от области травмы и расположенных в другом, неоперированном полушарии. При этом увеличивается и соотношение нейрон/глия. Синтетические процессы при локальной травме стимулируются не только в суммарных препаратах, но и во фракциях нейронов и глиальных клеток. Эффект стимулирования синтетических процессов при повреждении ткани мозга мы наблюдали ранее при изучении синтеза белка и ДНК [1]. В данном исследовании обнаружено некоторое увеличение количества выделенных из коры мозга нейронов по отношению к общему количеству выделенных клеток. Этот эффект можно объяснить действием нейротрофических факторов (НТФ), которые синтезируются поврежденными клетками и активируют синтетические процессы на соседних участках мозга. По-видимому, НТФ определенным образом стабилизируют и обратимо дистрофированные нейроны, усиливая процессы внутриклеточной репарации.

Трансплантация эмбриональной нервной ткани в головной мозг взрослых крыс, перенесших гипок-

сию на 4-й день после операции, не вызывает увеличения скорости синтеза РНК, подобно наблюдаемому при локальной травме головного мозга. Трансплантат нормализует соотношение нейрон/глия. Во фракциях, обогащенных нейронами, включение метки в РНК несколько выше, чем у интактных животных, хотя различие недостоверно. Синтез РНК в глиальных клетках, который был повышен у животных, подвергающихся воздействию гипоксии, снижается до уровня, наблюдаемого у контрольной группы.

Под влиянием трансплантации эмбриональной нервной ткани в мозг взрослых животных происходит более значительное увеличение соотношения нейрон/глия, чем при простом локальном повреждении, которое неизбежно при трансплантации. В данном случае важно то, что можно дифференцировать эффекты, вызываемые локальным повреждением нервной ткани и присутствием трансплантата. Количество нейронов у животных, подвергшихся гипоксии, составляет 18 %, локальная травма увеличивает их число до 20 %. Присутствие трансплантата вызывает увеличение количества нейронов до 26 %. Эти результаты подтверждают выдвинутую нами ранее гипотезу [1], согласно которой присутствие эмбриональной ткани трансплантата в мозге взрослого животного связано с выделением и действием на окружающие ткани другой, отличающейся от НТФ группы регулирующих веществ — стадиспецифических факторов, которые изменяют биосинтетические процессы в клетках соседних с трансплантатом участков мозга и способствуют репликативному синтезу в них ДНК. Действие операции трансплантации на ткань мозга нормальных животных включает два разных компонента. Прежде всего это повреждение клеток мозга реципиента, что приводит к усилению процессов, для развития которых требуется более фундаментальная перестройка метаболизма нервной ткани реципиента, что уже нельзя объяснить влиянием только НТФ. В отличие от повреждения, которое стимулирует синтез белка и через достаточно длительный период времени в общем не влияет на синтез ДНК и пролиферативные процессы, эмбриональная ткань трансплантата резко и на протяжении длительного времени стимулирует синтез ДНК в окружающей ткани мозга. Усиление пролиферации, как принято считать в настоящее время [5], связано с частичной дедифференцировкой и выходом клеток из состояния активного синтеза РНК.

Для объяснения резкого снижения суммарной интенсивности включения меченых предшественников синтеза РНК после трансплантации необходимо также учитывать, что основной вклад в суммарное значение скорости синтеза РНК вносит величина, присущая клеткам глии. В результате трансплантации показатель включения метки в клетки глии по сравнению с клетками глии, активированными гипоксическим воздействием, значи-

тельно снижен, что и приводит к дополнительному уменьшению суммарного уровня биосинтеза РНК в нервной ткани.

Таким образом, диффузное повреждение нервной ткани, которое мы наблюдали при гипоксии в условиях нашего опыта, приводит к дистрофии, разрушению и элиминированию некоторого количества нейронов. У оставшихся нейронов механизм биосинтеза РНК не нарушается. При этом глиальные клетки, по-видимому, компенсаторно активируются. Локальное повреждение ткани мозга, которое сопровождает любую операцию трансплантации, вероятно, приводит к продуцированию поврежденными клетками НТФ, вследствие чего повышается скорость синтеза РНК и в нейронах, и в глиальных клетках. Присутствие трансплантата дополнительно и в еще большей степени увеличивает репарацию подвергшихся дистрофии нейронов таким образом, что их отношение к глии приближается к норме, а интенсивность синтеза РНК нормализуется. Синтез РНК в глиальных клетках, который резко активировался при локальном и диффузном повреждении нервной ткани, в результате присутствия трансплантата возвращается к уровню, характерному для нормальных животных.

Incorporation of ^{14}C -adenine (imp/min per mg) into RNA of brain tissue and into fractions of neurones and glial cells of cerebral cortex was studied rats with diffuse damage (hypoxia), with local injury of brain tissue and after transplantation of embryonal nervous tissue. The diffuse damage decreased a number of cells in the fraction enriched with neurones and, therefore, diminished incorporation of the marker into the whole preparation. No significant changes was found in a number of glial cells. Uptake of adenosine per mass unit of glial RNA was increased, while it remained unchanged in neurones. Local injury of cerebral cortex simultaneously with hypoxia resulted in an increase of cells amount in the fraction of neurones. At the same time, incorporation of the marker into RNA of both neurones and glial cells was increased. Transplantation of embryonal nervous tissue into cortex of adult rats with hypoxia normalized the ratio neurone/glia as well as the rate of the marker incorporation into glial cells and neurones.

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 1990

УДК 579.841.11:579.222:577.152.277].088.1

Н. Н. Соколов, А. Б. Фицнер, О. Т. Самко, Э. Б. Хорошутина, А. К. Калугин

ВЛИЯНИЕ МОНОВАЛЕНТНЫХ КАТИОНОВ НА АКТИВНОСТЬ САЙТ-СПЕЦИФИЧЕСКОЙ ЭНДОНУКЛЕАЗЫ PaeII

НИИ медицинской энзимологии АМН СССР, Москва

Одним из критериев классификации рестриктаз (КФ 3.1.23.X) на три типа является потребность этих ферментов в кофакторах [8]. Что касается сайт-специфических эндонуклеаз II класса, широко используемых в молекулярно-генетических и биотехнологических исследованиях, то для проявления их активности требуются лишь ионы двухвалентных металлов, в частности Mg^{2+} , и немодифицированная ДНК. В этом отношении рестриктазы II класса существенно отличаются от эндонуклеаз рестрикции двух других классов, представляющих собой мультифункциональные белковые комплексы и нуждающиеся в ионах Mg^{2+} , АТР, S-аденозил- L-метионине (I класс) или Mg^{2+} и АТР (III класс) [16]. Ранее мы сообщили [4] о необычной для рестриктаз II класса абсолютной зависимости рестриктазы PaeII из *Pseudomonas aeruginosa* от моновалентных катионов. В настоящей работе исследована роль одновалентных металлов в катализируемой рестриктазой PaeII реакции гидролиза фосфодиэфирных связей ДНК.

Методика

Рестриктазу PaeII выделяли из клеток штамма *Pseudomonas aeruginosa* по разработанному нами способу [4]. Субстратом для определения рестриктазной активности служила ДНК фага λ с 1857, выделенная, как описано ранее [3].

Инкубационная смесь для определения активности рестриктазы PaeII содержала 0,01 М трис-НСI буфер pH 7,4, 0,01 М дитиотреитол, 1 мкг ДНК фага λ , фермент (0,5–2 ед.), а также MgCl_2 и одновалентные катионы, концентрация которых зависела от конкретных целей эксперимента. Конечный объем пробы варьировал от 30 до 80 мкл. Инкубацию проводили при 37 °С в течение 30–60 мин. Реакцию останавливали добавлением раствора глицерина с бромфеноловым синим, $\text{Na}_2\text{-ЭДТА}$ и додецилсульфатом натрия до конечной концентрации соответственно 5 % (объем/объем), 0,02 %, 20 мМ и 0,1 %.

Фрагменты ДНК фага λ разделяли методом электрофореза в вертикальных пластинах 0,8 % геля агарозы, используя 40 мМ трис-ацетат pH 8, 3, 20 мМ ацетат натрия и 2 мМ $\text{Na}_2\text{-ЭДТА}$ при 2–3 В/см ширины геля. ДНК выявляли по

ЛИТЕРАТУРА

1. Витвицкий В. Н. // Журн. общ. биол.— 1988.— Т. 49, № 3.— С. 355.
2. Витвицкий В. Н., Витвицкая Л. В., Бикбулатова Л. С. // Журн. высш. нервн. деят.— 1982.— Т. 32.— С. 455.
3. Грачева Н. Д. Автордиография синтеза нуклеиновых кислот и белков в нервной системе.— Л., 1968.
4. Домогатов Е. И. Материалы к проблеме приспособления организма к гипоксической форме кислородной недостаточности: Автореф. дис. ... д-ра биол. наук.— М., 1957.
5. Епифанова Е. О., Терских В. В., Полуновский В. А. Покоящиеся клетки: Свойства и функции в организме.— М., 1983.
6. Полежаев Л. В., Александрова М. А. Трансплантация ткани мозга в норме и патологии.— М., 1986.
7. Полежаев Л. В., Александрова М. А., Гирман С. В. // Докл. АН СССР.— 1985.— Т. 282, № 3.— С. 712.
8. Полежаев Л. В., Александрова М. А., Гирман С. В. // Там же.— Т. 284, № 5.— С. 1247.
9. Полежаев Л. В., Александрова М. А., Витвицкий В. Н. и др. // Там же.— 1987.— Т. 293, № 3.— С. 707.
10. Das G. D., Wallace R. B. Neural Transplantation and Regeneration.— New York, 1985.
11. Freysz R. B., Judes C., Sensenbrenner M. et al. // J. Neurochem.— 1968.— Vol. 15, N 4.— P. 307.
12. Hope for a New Neurology / Ed. F. Netterbohm.— New York, 1985.
13. Kennel D. // Meth. Enzymol.— 1967.— Vol. 12.— P. 686.
14. Liska B., Brechlova M., Tursky T. et al. // European Society for Neurochemistry. General Meeting: Abstracts.— Prague, 1986.— P. 345.
15. Nieto-Sampodro M., Saneto R. P., Vellis J., Cotman C. W. // Brain Res.— 1985.— Vol. 343, N 2.— P. 320.
16. Polezhaev L. V., Alexandrova M. A., Vitvitsky V. N. et al. // J. Hirnforsch.— 1985.— Bd 26.— S. 281.
17. Siskin B. F., Fowler I., Barr E. // Develop. Brain Res.— 1986.— Vol. 27.— N 1–2.— P. 181.
18. Zimmer J., Sunder N. // Neurosci. Lett.— 1982.— Suppl.— P. 534.

Поступила 22.06.88

INCORPORATION OF ^{14}C -ADENINE INTO NEURONES AND GLIA OF CEREBRAL CORTEX OF RATS WITH HYPOXIA AND WITH TRANSPLANTED EMBRYONAL NERVOUS TISSUE

V. N. Vitvitsky, A. V. Timonin

N. I. Vavilov Institute of General Genetics, Academy of Sciences of the USSR, Moscow

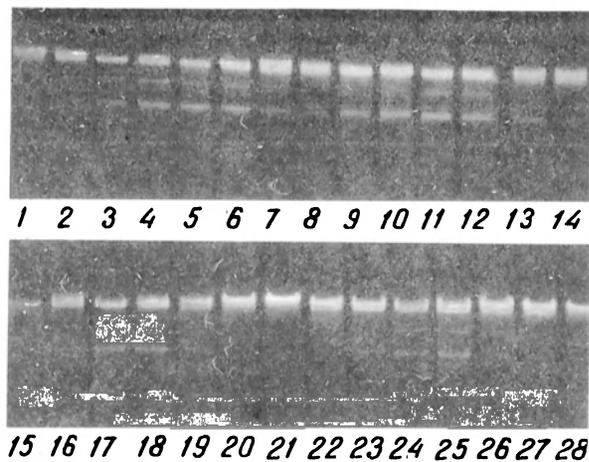


Рис. 1. Электрофоретическое разделение продуктов расщепления ДНК фага λ рестриктазой PaeII в присутствии одновалентных катионов. В пробы 1—7, 8—14, 15—21 и 27—28 добавлены соответственно NH_4Cl , CsCl , RbCl и KCl . В каждой серии проб концентрации солей составляли 0,5, 1,0, 2,5, 10, 50, 75 и 100 мМ. Инкубационная проба объемом 60 мкл содержала 30 мкл фермента, 1 мкг ДНК фага λ , 10 мМ MgCl_2 и 10 мМ трис-НСI-буфера pH 7,4.

флюоресценции в ультрафиолете при 254 нм после окрашивания геля в растворе бромистого этидия (1 мг/л). Гель фотографировали через красный светофильтр при ультрафиолетовом освещении.

Удаление из препарата фермента примеси низкомолекулярных соединений проводили с помощью гель-фильтрации на колонке с сефадексом G-50.

За единицу активности рестриктазы PaeII принимали то минимальное количество фермента (в мкл), которое необходимо для полного гидролиза 1 мкг ДНК фага λ при 37 °C за 60 мин инкубации в стандартных условиях инкубации.

Результаты и обсуждение

При исследовании потребности в кофакторах рестриктазы PaeII было установлено, что одновалентные катионы K^+ , Cs^+ , Rb^+ и NH_4^+ в отличие от Na^+ и Li^+ стимулируют активность фермента. Изучение влияния возрастающих концентраций ионов K^+ , Cs^+ , Rb^+ и NH_4^+ на активность рестриктазы PaeII, проведенное в присутствии катионов Mg^{2+} , показало, что различные моновалентные катионы отличаются по свойству активировать фермент (рис. 1). Концентрация катионов, необходимая для обеспечения полного расщепления ДНК фага λ , составляла для K^+ и Rb^+ 2,5—10 мМ; для NH_4^+ 2,5—50 мМ; для Cs^+ 10—50 мМ. При концентрации более 50 мМ одновалентные катионы ингибировали активность рестриктазы PaeII.

То обстоятельство, что фермент был неактивен при одновременном добавлении в инкубационную пробу Mg^{2+} и Na^+ или Li^+ , навело нас на мысль проверить, будет ли происходить гидролиз ДНК рестриктазой PaeII в присутствии только одновалентных катионов.

Было показано, что фермент расщепляет ДНК фага λ и в отсутствие ионов Mg^{2+} , когда в среду для инкубации добавлены лишь моновалентные катионы K^+ , Cs^+ , Rb^+ или NH_4^+ . В том случае, если инкубационные пробы не содержали одновалентных катионов и ионов Mg^{2+} , рестриктаза PaeII не гидролизовала ДНК. Такой результат явился неожиданным, поскольку характерной чертой рестриктаз II класса является использование в качестве кофактора ионов двухвалентных металлов.

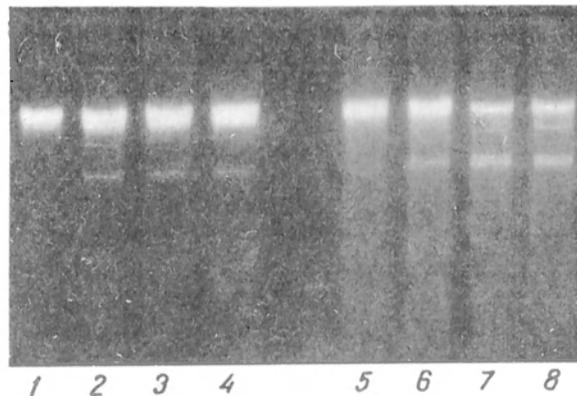


Рис. 2. Электрофоретическое разделение продуктов гидролиза ДНК фага λ рестриктазой PaeII в присутствии KCl (1—4) или MgCl_2 и KCl (5—8).

Инкубационная смесь объемом 60 мкл содержала рестриктазу PaeII (10 мкл), ДНК фага λ (1 мкг), 10 мМ трис-НСI-буфера pH 7,4. В пробы 1—8 добавлен MgCl_2 (5 мМ) и KCl в концентрации соответственно 3, 4, 5, 10, 0,5, 1,0 2,5 и 3 мМ.

Представляло интерес изучение зависимости активности рестриктазы PaeII от одновалентных катионов и ионов Mg^{2+} . С этой целью фермент инкубировали с ДНК фага λ в отсутствие экзогенного Mg^{2+} при возрастающих концентрациях в пробах KCl . Оказалось, что при концентрации KCl выше 4 мМ происходит неполный гидролиз ДНК (рис. 2). В то же время на фоне фиксированной концентрации MgCl_2 (5 мМ) полное расщепление ДНК наблюдается уже при концентрации ионов K^+ , равной 2,5 мМ. Таким образом, катионы Mg^{2+} оказывают выраженное активирующее действие на активность эндонуклеазы рестрикции PaeII.

В ряде других экспериментов установлено, что при фиксированной концентрации ионов K^+ (5 мМ) повышение концентрации ионов Mg^{2+} от 0,05 до 5 мМ также стимулирует активность фермента. В этом случае полный гидролиз ДНК отмечается при концентрации Mg^{2+} , равной 1 мМ.

То, что рестриктаза PaeII активна в отсутствие экзогенного MgCl_2 , указывает на возможное присутствие в препарате фермента следовых количеств ионов двухвалентных металлов. Об этом, в частности, может свидетельствовать полное ингибирование активности рестриктазы PaeII под действием ЭДТА (1 мМ), при этом в инкубационной смеси присутствовали ионы K^+ (20 мМ) и не содержался MgCl_2 .

Среди всех известных на сегодняшний день эндонуклеаз рестрикции только рестриктаза SmaI (истинный изоизомер фермента PaeII) требует для активности ионы одновалентного металла (K^+). Интересно, что этим свойством не обладают ложные изоизомеры рестриктаз PaeII и SmaI — XmaI [9], XcuI [10] и Cfg 91 [6], «узконающие» последовательность нуклеотидов 5'—C—C—C—G—G—3', но «разрешающие» ее в отличие от ферментов PaeII и SmaI между первыми и вторыми нуклеотидами с 5'-конца.

Описаны ферменты, каталитическое действие которых зависит от одновалентных катионов. В качестве примера можно привести α , β -элиминирующие лиазы, триптофаназу [15] и тирозинфенолизу [11], глицеролдегидратазу из *Aerobacter aerogenes* [1]. Влияние изученных одновалентных

катионов на активность эндонуклеазы рестрикции PaeII подчиняется общей закономерности, характерной для абсолютно зависимых от этих ионов ферментов [5]. Как известно, активируемые K^+ ферменты стимулируются также ионами NH_4^+ , Cs^+ и Rb^+ , но не Li^+ или Na^+ . Необходимая для максимального стимулирующего эффекта концентрация K^+ и других одновалентных катионов (5—100 мМ) значительно превышает концентрацию субстратов и кофакторов. Эффективность моновалентных катионов как кофакторов и селективность действия тесно коррелируют с величиной их ионного радиуса.

Можно предположить ряд возможных путей участия одновалентных катионов в реакции эндонуклеолиза ДНК под действием рестриктаз. Во-первых, ионы этих металлов, стабилизирующие вторичную структуру ДНК [2], могут способствовать образованию комплекса фермент — субстрат. Во-вторых, роль ионов K^+ и других одновалентных катионов может заключаться в изменении конформационного состояния фермента (или его активного центра) в результате воздействия на электростатическое окружение [1, 12]. В-третьих, ионы одновалентных металлов могут оказывать влияние на третичную и четвертичную структуру молекулы рестриктаз, ассоциацию и диссоциацию субъединиц [7, 13, 14].

Наиболее вероятным нам представляется участие одновалентных катионов в формировании структуры рестриктазы PaeII, адекватной для каталитического действия и устойчивой к инактивации. На это указывают защитный эффект ионов K^+ (но не Na^+) в отношении ингибирующего воздействия тиолспецифичных реагентов [например, дитиобис-2(нитробензойной) кислоты] и тепловой инактивации рестриктазы PaeII, повышение стабильности эндонуклеазы рестрикции PaeII при длительном (в течение года) хранении фермента в присутствии KCl (50 мМ).

ЛИТЕРАТУРА

1. Корсова Т. Л., Левина Т. С., Познанская А. А., Яковлев В. А. // Биохимия.— 1975.— Т. 40.— С. 559—564.
2. Кузнецов И. А., Каргов С. И., Козлов В. Г. // Молекул. биол.— 1984.— Т. 18.— С. 1583—1589.
3. Соколов Н. Н., Вотрин И. И., Фицнер А. Б., Аникейчева Н. В. // Биохимия.— 1978.— Т. 43.— С. 865—871.
4. Соколов Н. Н., Фицнер А. Б., Аникейчева Н. В. и др. // Биотехнология.— 1987.— Т. 3.— С. 578—584.
5. Яковлев В. А., Познанская А. А. // Журн. Всесоюз. хим. о-ва им. Д. И. Менделеева.— 1976.— Т. 21.— С. 626—637.
6. Янулайтис А. А., Стакенис П. С., Пятрушите М. П. и др. // Молекул. биол.— 1984.— Т. 18.— С. 115—129.
7. Boeker E. A., Snell E. E. // J. biol. Chem.— 1968.— Vol. 243.— P. 1678—1684.
8. Boyer H. W. // Ann. Rev. Microbiol.— 1971.— Vol. 25.— P. 153—176.
9. Endow S. A., Roberts R. J. // J. molec. Biol.— 1977.— Vol. 112.— P. 521—529.
10. Froman B. E., Tait R. C., Kado C. I., Rodriguez R. L. // Gene.— 1984.— Vol. 28.— P. 331—335.
11. Kumagai H., Yamada H., Matsui H. et al. // J. biol. Chem.— 1970.— Vol. 245.— P. 1773—1777.
12. Maurel P., Douzou P. // J. molec. Biol.— 1976.— Vol. 102.— P. 253—264.
13. Strojinski A., Pawelkiewicz J., Johnson B. C. // Arch. Biochem.— 1974.— Vol. 162.— P. 321—330.
14. Toraya T., Obashi K., Fukui S. // Biochemistry (Wash.).— 1975.— Vol. 14.— P. 4255—4260.

15. Toraya T., Nihira T., Fukui S. // Europ. J. Biochem.— 1976.— Vol. 69.— P. 411—419.
16. Yuan R. // Ann. Rev. Biochem.— 1981.— Vol. 50.— P. 285—315.

Поступила 01.07.88

EFFECT OF MONOVALENT CATIONS ON ACTIVITY OF SITE-SPECIFIC ENDONUCLEASE PAE II

N. N. Sokolov, A. B. Fitzner, O. T. Samko, E. B. Khoroshulina, A. A. Kalugin

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

Activity of restrictase Pae II, contrary to known restriction enzymes of the II class (except of true isoshizomere Sma), depended absolutely on monovalent cations. This pattern is untypical for restrictases of the II class. At the same time, restrictase Pae II was able to hydrolyze DNA as a substrate in absence of exogenous Mg^{2+} , in the incubation mixture contained cations K^+ , Rb^+ , Cs^+ and NH_4^+ but not Na^+ or Li^+ . Mg^{2+} was found to activate the enzyme in presence of monovalent cations. Basing on the protective effect on K^+ against inactivation of restrictase Pae II by means of thiol-affecting reagents and high temperature as well as on stabilization of the enzyme by KCl during storage, monovalent cations appear to participate in formation of protein molecule structure, which is optimal for catalytic effect and resistant to inactivation.

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 1990

УДК 612.421.015:577.112.8531.08

А. Ф. Цыб, И. И. Ващенко, А. Е. Кабаков, В. В. Ваняяр, И. Х. Мухамеджанов, В. К. Подгорниченко

ФИБРОНЕКТИН ЛИМФЫ ЗДОРОВЫХ ЛЮДЕЙ

Научно-исследовательский институт медицинской радиологии АМН СССР, Обнинск

В организме человека и животных фибронектин присутствует в растворимой и нерастворимой формах [16]. Нерастворимый фибронектин содержится на поверхности различных типов клеток и является одним из основных компонентов экстрацеллюлярного матрикса соединительной ткани. Растворимый фибронектин обнаружен в различных биологических жидкостях, включая плазму, мочу, слюну, амниотическую, суставную, асцитическую, спинномозговую и внутриглазную жидкость, а также бронхотрахеальный смыв [3—7, 12, 13]. При различных патологических процессах содержание растворимого фибронектина может изменяться. При этом могут происходить изменения в содержании как циркулирующего фибронектина, так и фибронектина в отдельном органе, причем в последнем случае изменения часто значительно выражены [3, 13]. Перспективным методом оценки состояния органа или системы органов может явиться измерение концентрации фибронектина в оттекающей от них лимфе. Учитывая такую возможность, в настоящей работе проведено определение содержания фибронектина в лимфе здоровых людей.

Методика

Использовали агарозу, перекись водорода ("Merck", ФРГ), CNBr-активированную сефарозу 4В ("Pharmacia", Швеция), желатин ("Serva", ФРГ), нитроцеллюлозу ("Bio-Rad", США),

антитела к мышинным иммуноглобулинам, конъюгированные с пероксидазой (ЧССР), субстрат пероксидазной реакции 4-хлоро-1-нафтол ("Sigma", США). Моноклональные антитела к фибронектину были любезно предоставлены М. А. Черноусовым (ВКНЦ АМН СССР).

Периферическую лимфу и кровь брали у 25 мужчин 23—57 лет. Катетеризацию подкожных лимфатических сосудов производили в нижней трети голени путем предварительного их окрашивания и пункции иглой, вставленной в катетер, с последующей фиксацией лигатурами. Использовали также специально разработанные приспособления, позволяющие одновременно получить до 10—20 мкл лимфы [1, 2]. Плазму крови получали после смешивания крови с 3,4 % цитратом натрия в соотношении 1:10. Лимфу и плазму хранили при —20 °С в течение не более 2 мес.

Фибронектин из плазмы крови здоровых людей выделяли методом аффинной хроматографии на колонке с желатин-сефарозой 4В, как описано ранее [17]. Желатин присоединяли к сефарозе 4В, активированной цианогенбромидом ("Pharmacia", Швеция).

Для получения антисыворотки кроликов иммунизировали внутривенно в 15—20 точек трижды с недельным интервалом, вводя 200 мкг фибронектина при каждой инъекции. При первом введении 1 мл фибронектина смешивали с равным объемом полного адьюванта Фрейнда, а в дальнейшем использовали неполный адьювант. Для поддержания высокого уровня антител кроликам ежемесячно вводили подкожно 200 мкг фибронектина в неполном адьюванте. С целью получения моноспецифических антител приготовленную антисыворотку дополнительно истощали белками плазмы человека, из которой предварительно удаляли фибронектин. Для перевода белков в нерастворимую форму использовали глутаровый альдегид.

Белки лимфы и плазмы крови разделяли электрофорезом в присутствии додецилсульфата натрия (ДСН) [8], используя 4 % концентрирующий гель и градиентный разделяющий гель 5—15 %. Процедуру иммуноблоттинга осуществляли по методу [15].

Содержание фибронектина в лимфе и плазме крови определяли методом ракетного иммуноэлектрофореза в 1 % агарозе в натрий-барбиталовом буфере рН 8,6 (ионная сила 0,02), содержащим 2,5 % кроличью антисыворотку к фибронектину. Электрофорез осуществляли в течение 20 ч при напряжении 7 В/см. Используя препарат очищенного фибронектина, установили концентрацию его в объединенном образце плазмы крови здоровых лиц. Этот образец затем использовали для построения калибровочной кривой при определении фибронектина. Концентрацию фибронектина в образцах плазмы и лимфы определяли, сравнивая площади пиков, образуемых стандартными и исследуемыми образцами.

Коэффициент корреляции определяли по формуле:

$$r = \frac{\sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x})(y_i - \bar{y})}{\sqrt{\sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x})^2 \sum_{i=1}^n (y_i - \bar{y})^2}}$$

Результаты и обсуждение

При сравнительном анализе лимфы и плазмы крови одного и того же лица с помощью иммуноблоттинга установлено, что в лимфе содержится фибронектин, находящийся преимущественно в нерасщепленном виде (рис. 1). Однако в лимфе в отличие от плазмы крови могут присутствовать и фрагменты фибронектина. Так как в данном случае были применены моноклональные антитела, реагирующие только с одним из фрагментов молекулы, общее содержание фрагментов фибронектина в лимфе может быть больше, чем это представляется из приведенного рисунка.

Для количественного определения фибронектина в лимфе был использован метод ракетного иммуноэлектрофореза. Средние значения содержания фибронектина в лимфе и плазме крови представлены в таблице. Большой разброс значений концентрации фибронектина в лимфе, воз-



Рис. 1. Иммуноблот с моноклональными антителами к фибронектину (молекулярная масса 220 кДа).

1 — плазма крови; 2 — лимфа.

Содержание фибронектина, глобулинов, альбумина и общего белка в лимфе и крови

Показатель	Лимфа	Плазма крови
Фибронектин, мкг/мл	44,2 ± 21,7 (25)	354 ± 88 (25)
Общий белок, мг/мл	24,4 ± 5,1 (22)	80,8 ± 6,0 (19)
Глобулины, мг/мл	13,0 ± 3,9 (16)	43,5 ± 6,1 (15)
Альбумин, мг/мл	12,1 ± 3,1 (16)	38,0 ± 4,8 (15)

Примечание. В скобках: число обследованных лиц.

можно, объясняется широким возрастным диапазоном доноров. Распределение уровня фибронектина в лимфе близко к нормальному (рис. 2).

Данные о содержании фибронектина в лимфе и плазме крови здоровых людей свидетельствуют об отсутствии взаимосвязи уровня фибронектина в этих биологических жидкостях. Не найдено взаимосвязи содержания общего белка в лимфе и плазме крови людей, а также содержания альбуминовых и глобулиновых фракций лимфы и плазмы крови.

Таким образом, проведенное исследование пока-

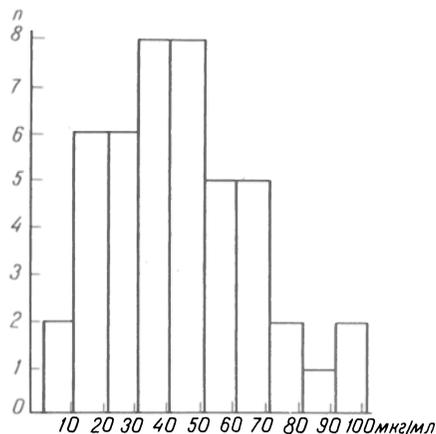


Рис. 2. Распределение концентраций фибронектина в лимфе. По оси абсцисс — концентрация фибронектина (в мкг/мл) в лимфе; по оси ординат — число реализаций.

зало, что в лимфе здоровых людей, как и в других биологических жидкостях, содержится фибронектин, являющийся многофункциональным белком [10]. В лимфе, по-видимому, фибронектин выполняет основные биологические функции, свойственные его растворимой форме: участвует в процессах коагуляции, заживления ран, защиты организма от инфекций.

Концентрация фибронектина в лимфе ниже, чем в плазме крови. Известно, что белки лимфы имеют плазменное и тканевое происхождение. Фибронектин синтезируют различные клетки организма, однако плазменный фибронектин, вероятно, синтезируется главным образом клетками печени [14]. Возможно, что часть фибронектина лимфы имеет тканевое происхождение. Можно ожидать, что патологически измененные ткани будут продуцировать или поглощать иные количества фибронектина, чем здоровые ткани. Так, хрящ при дегенеративных процессах поглощает примерно в 10 раз больше фибронектина, чем в норме. В то же время суставной хрящ больных остеоартритом продуцирует гораздо больше фибронектина, чем хрящ здорового организма [9]. Можно предположить, что определение фибронектина в лимфе окажется полезным тестом при некоторых патологических процессах. Не исключено также, что определенное клиническое значение может иметь и появление продуктов расщепления фибронектина в лимфе людей. Показано [11], что в плазме крови больных при злокачественных новообразованиях определяются продукты деградации фибронектина. Возможно, что эти продукты представляют собой фрагменты фибронектина опухоли. Можно ожидать, что в лимфе таких продуктов окажется больше или их появление может быть зарегистрировано раньше, чем в плазме крови.

Авторы благодарят А. М. Поверенного за постоянный интерес к работе и полезные замечания, высказанные при обсуждении рукописи.

ЛИТЕРАТУРА

1. Цыб А. Ф., Дергачев А. И., Вапняр В. В. // Хирургия. — 1984. — № 10. — С. 104—107.
2. Цыб А. Ф., Хмелевский Я. М., Вапняр В. В. и др. // Клиническая хирургия. — 1985. — № 2. — С. 59—60.
3. Carnemolla B., Cutolo M., Castellani P. et al. // *Arthr. a. Rheum.* — 1984. — Vol. 27, N 8. — P. 913—921.
4. Chen A. B., Mosesson M. W., Solish G. I. // *Amer. J. Obstet. Gynec.* — 1978. — Vol. 92. — P. 595—601.
5. Ericson D., Tynelius-Brattnall G. // *Scand. J. dent. Res.* — 1986. — Vol. 96. — P. 377—379.
6. Gerdes J. S., Yoder M. C., Douglas S. D. et al. // *J. Pediatr.* — 1986. — Vol. 108, N 4. — P. 601—606.
7. Kenney M. C., Lewis W., Redding J., Waring G. O. // *Ophthalm. Res.* — 1986. — Vol. 18. — P. 165—171.
8. Laemmli U. K. // *Nature.* — 1970. — Vol. 227. — P. 680—685.
9. Lust G., Burton-Wurster N., Leopold H. // *J. Reum.* — 1987. — Vol. 14. — P. 28—29.
10. McDonagh J. // *Arch. Path. Lab. Med.* — 1981. — Vol. 105. — P. 393—396.
11. Parsons R. G., Todd H. D., Kowal R. // *Cancer Res.* — 1979. — Vol. 39. — P. 4344—4345.
12. Salonen E. M., Varlio T., Miggiano V. et al. // *J. Immunol. Meth.* — 1984. — Vol. 72. — P. 145—156.
13. Scholmerigh J., Volk B. A., Kottgen E. et al. // *Gastroenterology.* — 1984. — Vol. 87. — P. 1160—1164.
14. Tamkun J. W., Pines R. O. // *J. Biol. Chem.* — 1983. — Vol. 258. — P. 4641—4647.
15. Towbin H. T., Staehelin T., Cordon J. // *Proc. nat. Acad. Sci. USA.* — 1979. — Vol. 76. — P. 4350—4354.
16. Yamada K. M., Hayashi M., Hirano H., Akiyama S. K. // *The Role of Extracellular Matrix in Development.* — New York, 1984. — P. 85—121.
17. Zardi L., Siri A., Carnemolla B. et al. // *J. Immunol. Meth.* — 1980. — Vol. 34. — P. 155—165.

Поступила 04.04.89

FIBRONECTIN FROM LYMPH OF HEALTHY PERSONS

A. F. Tsyb, I. I. Vaschenkova, A. E. Kabakov, V. V. Vapnyar, I. Kh. Mukhamedzhanov, V. K. Podgorodnichenko

Institute of Medical Radiology, Academy of Medical Sciences of the USSR, Obninsk

Content of fibronectin was studied in lymph and blood plasma of 24 healthy 23-57 years old men. Concentration of fibronectin in lymph and blood plasma was 44.2 ± 21.7 mg/ml and 354 ± 88 mg/ml, respectively. Interrelations were not found between content of fibronectin in lymph and blood plasma as well as between the total content of protein and fibronectin in lymph. Fibronectin in lymph was shown to occur in its intact form using immunoblotting procedure involving monoclonal antibodies to fibronectin. Simultaneously with whole molecules of fibronectin its fragments appear to be present in lymph.

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 1990

УДК 616.36-018.1-008.939.623]-092.4-02:547.963.3]-07-092.9

В. П. Федотов, И. Н. Баранова, В. И. Гудошников

ОСОБЕННОСТИ ВЛИЯНИЯ ДИБУТИРИЛПРОИЗВОДНЫХ ЦИКЛИЧЕСКИХ НУКЛЕОТИДОВ НА ПРОДУКЦИЮ АЛЬБУМИНА В ПЕРВИЧНЫХ КУЛЬТУРАХ КЛЕТОК ПЕЧЕНИ КРЫС

Институт экспериментальной эндокринологии и химии гормонов АМН СССР, Москва

В настоящее время не вызывает сомнения важная роль циклических аденозин- и гуанозин-3',5'-монофосфатов (цАМФ и цГМФ) в регуляции разнообразных функций паренхиматозных клеток печени. Показано участие цАМФ и в меньшей степени цГМФ в качестве вторичных посредников в реализации гормонального действия на многие показатели углеводно-липидного обмена [12, 17], активность различных ферментов [23, 24], биосинтез суммарного белка [19], пролиферативную активность [5] и другие процессы. Тем не менее значение этих циклических нуклеотидов в регуляции продукции клетками печени альбумина — одного из доминирующих белков сыворотки крови — изучено совершенно недостаточно. Нам удалось найти лишь несколько работ, посвященных изучению эффектов аналогов цАМФ на продукцию сывороточного альбумина (СА) клетками гепатом [7, 15]. Однако в опухолевых клетках, включая линии гепатом, метаболизм циклических нуклеотидов и их вклад в регуляторные внутриклеточные механизмы могут существенно отличаться от таковых в нетрансформированных клетках [4, 14, 25].

Подобная ситуация обуславливает необходимость проведения исследований роли цАМФ и цГМФ в регуляции продукции СА нетрансформированными клетками печени. В связи с вышеизложенным целью данной работы явилось изучение эффектов $N^6, O^{2'}$ -дibuтирил-цАМФ (Bt_2 цАМФ) и $N^2, O^{2'}$ -дibuтирил-цГМФ (Bt_2 цГМФ) на продукцию СА с использованием первичных культур клеток печени, причем нас интересовала способ-

Влияние дибутилпроизводных циклических нуклеотидов на продукцию альбумина ($M \pm m$) в первичных культурах клеток печени плодов крыс в условиях кратковременного и длительного воздействия

Группа	Концентрация альбумина в среде, мкг на 1 мг белка ($M \pm m$)			
	за 4 ч	p	за 20 ч	p
Контроль	1396 ± 132 (4)		15 397 ± 735 (4)	
Vt ₂ цАМФ			Не иссл.	
10 ⁻⁵ М	2155 ± 137 (4)	<0,01	17 604 ± 329 (3)	<0,05
10 ⁻⁴ М	2320 ± 195 (4)	<0,01	11 357 ± 217 (3)	<0,01
10 ⁻³ М	2600 ± 180 (4)	<0,01		
Контроль	1612 ± 97,5 (4)		5596 ± 223 (3)	
Vt ₂ цГМФ				
10 ⁻⁵ М	1755 ± 67,3 (4)	>0,05	4702 ± 108,5 (4)	<0,02
10 ⁻⁴ М	2171 ± 91,4 (4)	<0,01	3422 ± 255,4 (4)	<0,01
10 ⁻³ М	1887 ± 43,4* (4)	<0,05	2929 ± 76,2 (4)	<0,001

Примечание. В скобках — число наблюдений; звездочка — $p < 0,05$ по сравнению с 10⁻⁴М Vt₂цГМФ.

ность аналогов циклических нуклеотидов модулировать не только базальную, но и стимулированную кортизолом продукцию СА. Такая постановка задачи исследования была обусловлена ведущей ролью глюкокортикоидов в поддержании продукции СА и других функций гепатоцитов [10]. Основная часть экспериментов была проведена на культурах клеток печени плодов крыс, взятых в конце беременности. Учитывая то, что чувствительность гепатоцитов к цАМФ (по крайней мере по биосинтезу суммарного белка) может существенно изменяться в раннем постнатальном периоде [19], дополнительно были также исследованы эффекты Vt₂цАМФ и Vt₂цГМФ на продукцию СА гепатоцитами 3-недельных крысят.

МЕТОДИКА

В работе использованы первичные культуры клеток печени плодов крыс на 21—22-м дне беременности, а также культуры гепатоцитов крыс-самцов линии Вистар 3-недельного возраста, которые получали с помощью модифицированных методов [26] и [1] соответственно. Клеточные культуры выращивали в 24-луночных планках (фирма "Flow Lab", Великобритания) на коллагеновой подложке, в среде 199 с 5 % эмбриональной телячьей сыворотки, 2 мМ L-глутамин и 10 мМ HEPES в атмосфере 5 % CO₂ и 95 % воздуха. Первую смену среды проводили через 24 ч после посева клеток. За 1 сут до начала эксперимента содержание сыворотки в среде снижали до 1 %. Опыты проводили на 4—6-дневных культурах. Продукцию СА оценивали по его накоплению в среде инкубации, измеряемому модифицированным гомологичным радиоиммунологическим методом [2]. После окончания инкубации клетки промывали средой 199 и лизировали в 0,5 М NaOH, белок в пробах лизата клеток определяли методом [13]. Статистическую обработку результатов выполняли с использованием критерия Стьюдента.

Результаты и обсуждение

В условиях 4-часовой инкубации Vt₂цАМФ (10⁻⁵—10⁻³ М) дозозависимо повышал продукцию СА культивируемыми гепатоцитами плодов крыс на 54—86 %. Достоверный стимулирующий эффект Vt₂цГМФ наблюдался лишь в концентрациях 10⁻⁴ и 10⁻³ М, причем воздействие дозы 10⁻³ М было менее выраженным (см. таблицу). В то же время ни Vt₂цАМФ, ни Vt₂цГМФ в концентрации 10⁻³ М не вызывали дальнейшего увеличения продукции СА на фоне стимулирующего влияния кортизола в условиях 4-часовой инкубации (рис. 1). Напротив, Vt₂цГМФ даже подавлял эффект кортизола.

Как следует из результатов, представленных в таблице, при 20-часовой инкубации культивируе-

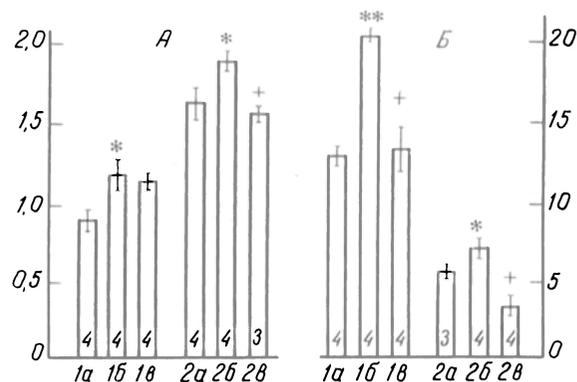


Рис. 1. Влияние Vt₂цАМФ и Vt₂цГМФ (10⁻⁵ М) на стимулированную кортизолом (10⁻⁶ М) продукцию альбумина ($M \pm m$) культивируемыми клетками печени плодов крыс в условиях 4-часовой (а) и 20-часовой (б) инкубации.

По осям ординат: концентрация альбумина в среде, мкг на 1 мг белка; 1а — и 2а — контроль; 1б и 2б — стимуляция кортизолом; 1б — Vt₂цАМФ + кортизол; 2в — Vt₂цГМФ + кортизол. Одна звездочка — $p < 0,05$, две — $p < 0,01$ по сравнению с контролем; крестик — $p < 0,01$ по сравнению с 1б и 2б. Здесь и на рис. 2 внутри столбиков указано число наблюдений.

мых клеток печени плодов Vt₂цАМФ в дозе 10⁻⁴ М повышал продукцию СА на 14 %, а в концентрации 10⁻³ М подавлял ее на 26 %. В тех же условиях Vt₂цГМФ в концентрациях 10⁻⁵, 10⁻⁴ и 10⁻³ М дозозависимо ингибировал продукцию СА на 16, 39 и 48 % соответственно. Кроме того, в условиях длительной инкубации Vt₂цАМФ в дозе 10⁻⁵ М полностью блокировал стимулирующее влияние кортизола, а Vt₂цГМФ в той же дозе снижал продукцию СА даже ниже контрольного уровня (см. рис. 1).

В опытах на культивируемых гепатоцитах 3-недельных крысят были получены сходные результаты в отношении двухфазного характера действия аналогов циклических нуклеотидов. Как видно из рис. 2, при 20-часовой инкубации Vt₂цАМФ в концентрации 10⁻⁴ М повышал продукцию СА гепатоцитами почти вдвое, а в концентрации 10⁻³ М имел тенденцию к ее подавлению. Кроме того, Vt₂цАМФ в дозе 10⁻⁴ М не изменял продукцию СА, стимулированную кортизолом, а в дозе 10⁻³ М снижал ее почти до контрольного уровня. В другом эксперименте Vt₂цГМФ в концентрации 10⁻⁴ М не изменял базальную и стимулированную кортизолом продукцию СА гепатоцитами крысят, а в концентрации 10⁻³ М подавлял ее более чем в 2 раза.

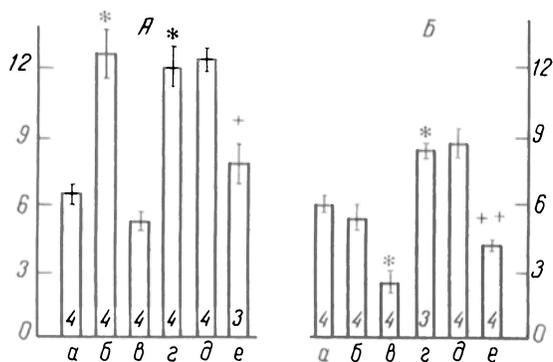


Рис. 2. Влияние Vt_2 цАМФ (А) и Vt_2 цГМФ (Б) на базальную и стимулированную кортизолом (10^{-6} М) продукцию альбумина ($M \pm m$) в культурах гепатоцитов 3-недельных крысят при 20-часовой инкубации.

По оси ординат: концентрация альбумина в среде, μ г на 1 мг белка. а — контроль; б и в — аналог циклического нуклеотида в концентрации 10^{-4} и 10^{-5} М соответственно; г — стимуляция кортизолом; д и е — кортизол в сочетании с аналогом циклического нуклеотида в концентрации 10^{-4} и 10^{-5} М соответственно. Звездочка — $p < 0.01$ по сравнению с контролем; один крестик — $p < 0.05$, два — $p < 0.01$ по сравнению с г.

Таким образом, изучение временной зависимости эффектов дибутирилпроизводных цАМФ и цГМФ в опытах на первичных культурах клеток печени плодов крыс отчетливо показывает двухфазность действия этих соединений: при кратковременной инкубации они повышают базальную продукцию СА, а в условиях длительной экспозиции высокие концентрации этих аналогов циклических нуклеотидов вызывают резкое подавление базальной и стимулированной кортизолом продукции СА. Сопоставление результатов, полученных на культурах клеток печени плодов и крысят, показывает, что в процессе постнатального развития гепатоциты приобретают более выраженную способность поддерживать продукцию СА, стимулированную низкой концентрацией Vt_2 цАМФ (10^{-4} М), в течение длительного интервала времени. И в то же время процесс созревания гепатоцитов не сопровождается заметными изменениями ответа со стороны продукции СА на сочетанное воздействие кортизола и Vt_2 цАМФ, по крайней мере в условиях 20-часовой инкубации.

Анализ данных литературы показывает, что двухфазность временной и дозовой зависимости эффектов производных цАМФ не является уникальной характеристикой механизмов, контролирующей продукцию СА гепатоцитами [21, 22]. Причины такой двухфазности действия аналогов цАМФ остаются неизвестными. Возможно, определенную роль в двухфазном характере кривой доза — эффект играет наличие двух типов цАМФ-зависимых протеинкиназ, активируемых при различных концентрациях добавленного к гепатоцитам Vt_2 цАМФ (0,1—5 и 10 мкМ) [8]. Однако в отличие от авторов последней работы мы использовали более высокие концентрации Vt_2 цАМФ, которые широко применяются в исследованиях на культивируемых гепатоцитах [6]. Хотя в нормальных клетках печени базальная внутриклеточная концентрация цАМФ составляет около 1 мкМ и увеличивается до 30 мкМ под влиянием 10^{-8} глюкагона [6], дозы аналогов ниже 10^{-5} М в наших исследованиях и работах других авторов часто не вызывают достоверных из-

менений различных функциональных показателей гепатоцитов, что связано, по-видимому, с пониженным поглощением клетками дибутирилпроизводных циклических нуклеотидов [18], их деградацией [11, 20], а также компартиментализацией их действия [16].

Исследования, проведенные на перфузируемой печени крыс, а также на цитозольной фракции гомогената печени [11, 20], показали, что при добавлении Vt_2 цАМФ происходит достаточно быстрое отщепление бутирильной группы в $O^{2'}$ -положении под действием неспецифической эстеразной активности. С регуляторной субъединицей цАМФ-зависимой протеинкиназы связывается N^6 -монобутирил-цАМФ ($N^6 Vt_2$ цАМФ). Параллельно происходит более медленное превращение последнего соединения в N^6 -монобутирил-аденозин-5'-монофосфат под влиянием фосфодиэстеразы (ФДЭ) цАМФ. Результаты, полученные на гепатоцитах [9], свидетельствуют о двукратном снижении уровня эндогенного цАМФ под действием аналогов цАМФ. Причем авторы, показавшие это снижение, подчеркивают, что оно происходит параллельно активации гликогенфосфорилазы. Следовательно, биологическое действие Vt_2 цАМФ (в частности, стимуляция гликогенолиза) связано не с изменением уровня эндогенного цАМФ, а с поддержанием в клетках достаточно высокого уровня $N^6 Vt_2$ цАМФ, который активирует цАМФ-зависимую протеинкиназу и в некоторой степени подавляет ФДЭ цАМФ [18].

В свете вышеизложенного двухфазный характер дозовой и временной зависимости эффектов производных цАМФ может быть связан с наличием в клетках специальных механизмов отрицательной обратной связи, ограничивающих реакцию на метаболиты аналогов (например, $N^6 Vt_2$ цАМФ) в условиях потенциально избыточной дозировки и/или длительности их воздействия [9].

Что же касается Vt_2 цГМФ, то нам не удалось обнаружить в литературе сведений о его метаболизме в клетках. Одним из механизмов действия Vt_2 цГМФ может быть подавление ФДЭ цАМФ [20], приводящее, по-видимому, к изменению уровня эндогенного цАМФ. Наши исследования демонстрируют отчетливую разницу во влиянии дибутирилпроизводных цАМФ и цГМФ на продукцию СА. В условиях кратковременной инкубации воздействие Vt_2 цГМФ на гепатоциты плодов крыс слабее и характеризуется двухфазной дозовой зависимостью (доза 10^{-3} М менее эффективна, чем 10^{-4} М), а при длительной экспозиции, напротив, эффект Vt_2 цГМФ более выражен и в отличие от Vt_2 цАМФ не демонстрирует двухфазного характера зависимости от дозы. Чем объясняются такие различия действия аналогов циклических нуклеотидов, пока неясно. Несомненно лишь, что необходимо учитывать регуляторные взаимодействия цАМФ и цГМФ между собой и с другими вторичными посредниками гормональных эффектов, включая ионы Ca^{2+} [3, 4]. В настоящее время описано как одно-, так и разнонаправленное действие аналогов цАМФ и цГМФ на гепатоциты [17, 23]. На продукцию СА, как видно из проведенных нами исследова-

ний, эти циклические нуклеотиды действуют однонаправленно, и, следовательно, не могут считаться антагонистами.

Различия в эффектах аналогов циклических нуклеотидов отчетливо выявляются и при взаимодействии с кортизолом. Так, в опытах на культивируемых клетках печени плодов $Bt_{2c}GMP$ в отличие от $Bt_{2c}AMP$ подавляет воздействие кортизола на продукцию СА при кратковременной инкубации, а в условиях длительной экспозиции его ингибирующее действие по крайней мере более выражено, чем влияние $Bt_{2c}AMP$.

Сопоставление результатов, полученных на культурах клеток печени плодов и крысят в условиях длительной инкубации, позволяет выявить ослабление чувствительности гепатоцитов к ингибирующему влиянию низкой концентрации $Bt_{2c}GMP$ ($10^{-4}M$) на продукцию СА в процессе постнатального развития. И в то же время ответ гепатоцитов на ингибирующее воздействие высокой дозы $Bt_{2c}GMP$ ($10^{-3}M$) при этом сохраняется. Конкретные причины различий эффектов $Bt_{2c}AMP$ и $Bt_{2c}GMP$, а также изменений влияния $Bt_{2c}GMP$ на гепатоциты в постнатальном развитии остаются неизвестными, для их выяснения необходимы дополнительные исследования.

В заключение следует отметить, что первичные культуры клеток печени плодов крыс и 3-недельных крысят оказались полезными модельными объектами для изучения механизмов, контролирующих продукцию СА. Данные культуры явно предпочтительнее культивируемых клеток гепатомы, которые, хотя и характеризуются гомогенностью клеточной популяции, тем не менее могут резко отличаться от нетрансформированных клеток печени по регуляторным механизмам [14, 25]. Результаты, полученные нами на первичных культурах, свидетельствуют, что продукцию СА гепатоцитами плодов крыс и 3-недельных крысят контролируют внутриклеточные механизмы, зависящие от обоих циклических нуклеотидов, однако в регуляторном вкладе этих вторичных посредников имеются заметные различия, проявляющиеся как в особенностях дозовой и временной зависимости, так и при сочетании с кортизолом воздействием. Кроме того, сопоставление эффектов аналогов $cAMP$ и $cGMP$ на клетки печени животных разных стадий развития позволяет выявить качественное сходство внутриклеточной регуляции продукции СА при одновременном количественном изменении ее параметров в постнатальном онтогенезе.

ЛИТЕРАТУРА

1. Дунина-Барковская А. Я., Миттельман Л. А. // Цитология. — 1981. — № 8. — С. 944—947.
2. Плужникова Г. Н., Кондрагев Я. Ю. // Пробл. эндокринологии. — 1985. — № 2. — С. 58—63.
3. Северин Е. С., Кочеткова М. Н. Роль фосфорилирования в регуляции клеточной активности. — М., 1985.
4. Федоров Н. А. Биологическое и клиническое значение циклических нуклеотидов. — М., 1979.
5. Armato U., Andreis P. G., Draghi E. // Life Sci. — 1981. — Vol. 29. — P. 2763—2769.
6. Botham K. M., Suckling K. E. // Biochim. biophys. Acta. — 1986. — Vol. 889. — P. 382—385.
7. Brown P. C., Papaconstantinou J. // J. biol. Chem. — 1979. — Vol. 254. — P. 9379—9384.
8. Byus C. V., Hayes J. S., Brendel K., Russel D. H. //

Molec. Pharmacol. — 1979. — Vol. 16. — P. 941—949.

9. Corbin J. D., Beebe S. J., Blackmore P. F. // J. biol. Chem. — 1985. — Vol. 260. — P. 8731—8735.
10. Dich J., Vind C., Grunnet N. // Hepatology. — 1988. — Vol. 8. — P. 39—45.
11. Dills W. L., West T. D., Walsh D. A. // J. biol. Chem. — 1977. — Vol. 252. — P. 4287—4292.
12. Exton J. H., Blackmore P. F., Refai M. F. et al. // Advanc. Cyclic Nucl. Res. — 1981. — Vol. 14. — P. 491—505.
13. Flores R. // Analyt. Biochem. — 1978. — Vol. 88. — P. 605—611.
14. Granner D. K. // Arch. Biochem. — 1974. — Vol. 165. — P. 359—368.
15. Hamman H. C., Ledford B. E. // Ibid. — 1982. — Vol. 213. — P. 620—624.
16. Harper J. F., Haddox M. K., Johanson R. A. et al. // Vitam. a. Horm. — 1985. — Vol. 42. — P. 197—252.
17. Hayden L. J., Cohen S., Levin K., Margolis S. // Canad. J. Biochem. — 1983. — Vol. 61. — P. 207—213.
18. Hsie A. W., Kawashima K., O'Neill J. P., Schroder C. H. // J. biol. Chem. — 1975. — Vol. 250. — P. 984—989.
19. Klaipongpan A., Bloxam D. P., Akhtar M. // Biochem. J. — 1977. — Vol. 168. — P. 271—275.
20. Nakamura H., Watanabe T., Kakiuchi S., Wada H. // J. Biochem. (Tokyo). — 1979. — Vol. 85. — P. 1321—1329.
21. Pelech S. L., Pritchard P. H., Vance D. E. // Biochim. biophys. Acta. — 1982. — Vol. 713. — P. 260—269.
22. Sand T. E., Bronstad G. O., Killi A. et al. // Acta pharmacol. (Kbh.). — 1982. — Vol. 51, Suppl. 2. — P. 35.
23. Spence J. T., Haars L., Edwards A. et al. // Ann. N. Y. Acad. Sci. — 1980. — Vol. 349. — P. 99—110.
24. Wicks W. D. // Advanc. Cyclic Nucl. Res. — 1974. — Vol. 4. — P. 335—438.
25. Wicks W. D., Leichtling B. H., Wimalasena J., Koontz J. // Ann. N. Y. Acad. Sci. — 1980. — Vol. 349. — P. 195—209.
26. Yeoh G. C., Bennett F. A., Oliver I. T. // Biochem. J. — 1979. — Vol. 180. — P. 153—160.

Поступила 14.03.89

INFLUENCE OF DIBUTYRYL-DERIVATIVES OF CYCLIC NUCLEOTIDES ON ALBUMIN PRODUCTION IN PRIMARY CULTURES OF RAT LIVER CELLS

V. P. Fedotov, I. N. Baranova, V. I. Gudoshnikov

Institute of Experimental Endocrinology and Hormone Chemistry, Academy of Medical Sciences of the USSR, Moscow

Dibutryl-derivative of cyclic AMP ($Bt_{2c}AMP$, $10^{-3}M$) affected the basal and cortisol-induced production of immunoreactive serum albumin (SA) in primary cultures of fetal rat liver cells by the type of two-phase time dependency. The same two-phase character exhibited dose-dependent effect of $Bt_{2c}AMP$ (10^{-5} — $10^{-3}M$) on SA production in cultured liver cells obtained from fetal and 3 weeks old rats. Similar two-phase dose- and time-dependent effects demonstrated $Bt_{2c}GMP$ (10^{-5} — $10^{-3}M$), although certain differences were detected when either action of $Bt_{2c}AMP$ and $Bt_{2c}GMP$ or response of cultured liver cells from fetal and early postnatal rats to these drugs were studied. The data obtained suggest that normal liver cells are provided with feedback mechanism which limited the cellular reaction to cyclic nucleotides under experimental conditions involving, potentially excessive doses and/or time of action of these agents.

А. Е. Алексеева, Т. А. Потапкина, В. Н. Прозоровский

ИЗБИРАТЕЛЬНОЕ ВЗАИМОДЕЙСТВИЕ АНТИПЕПТИДНЫХ АНТИТЕЛ К N-КОНЦЕВОМУ РАЙОНУ ЛАКТАТДЕГИДРОГЕНАЗЫ-5 МЫШЕЧНОЙ ТКАНИ СВИНЬИ С РАЗЛИЧНЫМИ ИЗОФОРМАМИ ЛАКТАТДЕГИДРОГЕНАЗЫ ЧЕЛОВЕКА

НИИ медицинской энзимологии АМН СССР, Москва

Лактатдегидрогеназа (ЛДГ, КФ 1.1.127) — гликолитический фермент, обратимо катализирующий окисление L-лактата в пировиноградную кислоту. В качестве промежуточного акцептора водорода требуется кофермент никотинамидадениндинуклеотид (НАД). ЛДГ является тетрамером с молекулярной массой 144 000 [11] и представлен двумя типами субъединиц М и Н. Большинство органов и тканей млекопитающих содержат пять изоферментов ЛДГ (ЛДГ-1 — ЛДГ-5), которые представляют собой комбинации субъединиц М и Н [5]. Изоферменты М₄ (ЛДГ-5) в основном содержатся в скелетной мышце, Н₄ (ЛДГ-1) — в тканях сердечной мышцы [7]. В последние годы обнаружение различных изоферментов приобрело особое значение. Это связано с открывающимися диагностическими возможностями, обусловленными тем, что «изоферментный профиль», как оказалось, является специфической характеристикой различных органов и тканей. Повышение уровня ЛДГ-1 и ЛДГ-2 в сыворотке крови характерно для инфаркта миокарда и гемолитической анемии, а ЛДГ-5 — для гепатитов и острого повреждения печени [3].

При сравнении первичной структуры М₄ и Н₄ изоферментов ЛДГ свиньи отмечено 75 % идентичных аминокислотных последовательностей, основные различия в структуре приходятся на N-концевой (1—20 аминокислоты) — 60 % и C-концевой участок (260—332) — 47 % [12, 16].

В настоящее время широко используется возможность получения антител к определенным участкам молекулы белка (антигенные детерминанты) [10, 13, 17]. В большинстве случаев антипептидные антитела реагируют не только с самим пептидом, но и с тем участком целого белка, из которого он выделен.

Ранее мы показали [1], что N-концевой район ЛДГ-5 свиньи, который обнаруживает большие структурные отличия в различных изоформах фермента, содержит антигенную детерминанту. С целью получения антипептидных антител к ЛДГ-5 мышечной ткани свиньи, которые бы избирательно реагировали с отдельными изоформами ЛДГ, и был выбран N-концевой участок (1—32 аминокислоты) ЛДГ-5 мышцы свиньи [2]. Были получены антипептидные антисыворотки при иммунизации кроликов N-концевым фрагментом ЛДГ-5 свиньи, конъюгированным с бычьим сывороточным альбумином [2], выделены и очищены антипептидные антитела, которые были специфич-

ны как в отношении N-концевого пептида ЛДГ-5 свиньи, так и целой молекулы фермента.

Представляло интерес выяснить возможность взаимодействия полученных антипептидных антител к N-концевому участку ЛДГ-5 свиньи с различными изоформами ЛДГ (ЛДГ-1 — ЛДГ-5) человека, т. е. выяснить специфичность антипептидных антител к различным субъединицам ЛДГ, что и явилось задачей данной работы.

Методика

Антипептидные антитела к N-концевому району (1—32 аминокислоты) ЛДГ-5 мышечной ткани свиньи выделены из соответствующих кроличьих антипептидных антисывороток с помощью иммуносорбента на основе антигена ЛДГ-5 свиньи [2]. Специфичность антипептидных антител в отношении N-концевого пептида ЛДГ-5 свиньи и целой молекулы фермента определяли методом иммуоферментного анализа [2].

Имуносорбент на основе антипептидных антител к N-концевому району ЛДГ-5 мышцы свиньи получали, используя в качестве сорбента золотистый стафилококк (стафилококковый реагент, сухой, НИИЭМ им. Пастера, 10 % суспензия в 2 мл буфера). Предварительно стафилококк отмывали 3—4 раза 20-кратным объемом 0,05 М фосфатного буфера рН 7,5, содержащего 0,1 М NaCl, центрифугируя при 3000 г. Антипептидные антитела к N-концевому району ЛДГ-5 свиньи диализовали против 0,05 М фосфатного буфера рН 7,5, содержащего 0,1 М NaCl, в течение 2 ч при 4 °С и добавляли к осадку 10 % суспензии стафилококка, инкубировали при постоянном перемешивании при 20 °С в течение 2 ч. За связыванием антител с сорбентом следили по снижению содержания иммуноглобулинов в надосадочной жидкости после центрифугирования измерением на спектрофотометре СФ-46 (СССР) при λ 280 нм. Инкубацию проводили до полного насыщения сорбента антипептидными антителами. Несвязавшийся с сорбентом материал отмывали 0,05 М фосфатным буфером рН 7,5, содержащим 0,1 М NaCl, двукратным центрифугированием при 3000 г. Суспензию полученного иммуносорбента на основе антипептидных антител к N-концевому району ЛДГ-5 свиньи в 0,05 М фосфатном буфере рН 7,5, содержащем 0,1 М NaCl, переносили в пластиковые конические пробирки и центрифугировали при 3000 г.

Связывание и осаждение изоферментов ЛДГ с помощью иммуносорбента на основе антипептидных антител проводили на сыворотках крови больных инфарктом миокарда и экстрактах из ткани сердца и скелетной мышцы человека. Экстракты из ткани сердца и скелетной мышцы человека получали экстрагированием измельченной на гомогенизаторе ткани 0,05 М фосфатным буфером рН 7,5. Использовали экстракты в разведении 1:20 или 1:30. К осадку иммуносорбента добавляли 30—40 мкл исследуемой сыворотки или экстракта из скелетной мышцы или ткани сердца человека, инкубировали при постоянном перемешивании (20 мин, 20 °С) и центрифугировали (3000 г, 10 мин).

В сыворотках и экстрактах до и после обработки иммуносорбентом измеряли активность ЛДГ при 340 нм на анализаторе скоростей ферментативных реакций (Энзимат, "Advanced products", Италия), в качестве субстрата использовали пируват натрия и НАД·Н₂ в 0,05 М фосфатном буфере рН 7,5 [2]. Энзимофорез проводили на пластинках (14×8 см) с 1 % агарозой в вероналовом буфере рН 8,55 [4]. Толщина слоя агарозы 1,5 см, сила тока 30 мА на пластину. Для выявления изоферментов ЛДГ использовали метод тетразольного окрашивания [9].

Результаты и обсуждение

Известно [8], что антитела к различным изоформам ЛДГ свиньи дают перекрестные иммунологические реакции с соответствующими изоферментами ЛДГ человека. Полная идентичность препаратов, полученных от свиньи и человека, наблюдалась для H-изоформ ЛДГ. Все остальные гомологичные ферменты обнаруживали частичную идентичность. Показано, что антитела против ЛДГ-1 человека или макака-резуса не дают пере-

крестной реакции с ЛДГ-5; гибридные тетрамеры ЛДГ-2, ЛДГ-3 и ЛДГ-4 реагируют с антителами обоих типов [6, 14, 15].

Проверку избирательного связывания различных изоферментов ЛДГ антипептидными антителами, полученными к N-концевому району ЛДГ-5 свиньи, проводили на экстрактах из ткани сердца и скелетной мышцы человека и сыворотках крови человека. Антипептидные антитела для осаждения изоферментов ЛДГ из экстрактов и сывороток крови человека использовали в виде иммуносорбента (т. е. предварительно связывали с сорбентом, в качестве которого использовали золотистый стафилококк); антитела при этом сохраняли свою иммунореактивность.

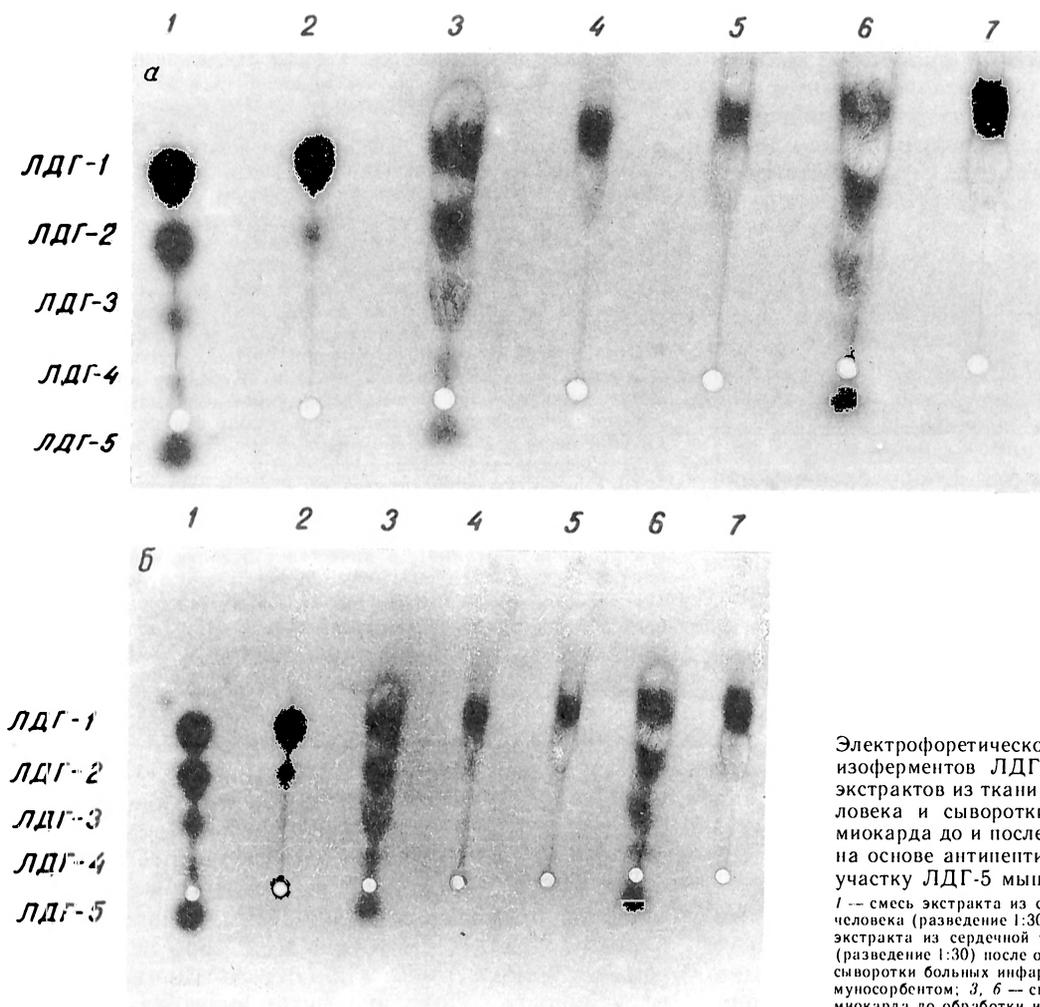
Для стафилококка характерен белок А, способный вступать в соединение с иммуноглобулинами IgG сыворотки крови. Белок А можно иммобилизовать на матрице, создав тем самым иммуносорбент для антител и иммунных комплексов, но можно использовать в качестве сорбента белок А прямо в составе бактериальной клетки, как и было сделано в данной работе.

Для получения иммуносорбента на основе антипептидных антител к N-концевому участку ЛДГ-5 свиньи антипептидные антитела, диализованные против 0,05 М фосфатного буфера рН 7,5, содержащего 0,1 М NaCl, связывали с предварительно отмытым стафилококком до полного насыщения сорбента антителами. Полученный иммуносорбент

на основе антипептидных антител осаждал M₄-изоформу ЛДГ из растворов ЛДГ-5 из мышечной ткани свиньи. К осадку иммуносорбента в пластиковых конических пробирках добавляли растворы ЛДГ-5 свиньи (различные концентрации в 0,05 М фосфатном буфере рН 7,5, с 0,1 М NaCl), инкубировали 20 мин при 20 °С и центрифугировали (3000 g, 10 мин). За связыванием ЛДГ с иммуносорбентом следили по остаточной активности фермента в растворах после обработки сорбентом. Было показано, что иммуносорбент на основе антипептидных антител к N-концевому участку ЛДГ-5 свиньи связывал от 3—5 мкг M₄-изоформы ЛДГ из мышечной ткани свиньи.

С целью проверки избирательного связывания и осаждения различных изоформ ЛДГ человека антипептидными антителами к N-концевому участку ЛДГ-5 свиньи мы использовали сыворотки крови больных инфарктом миокарда (с повышенным содержанием лактатдегидрогеназной активности) и экстракты из ткани сердца и скелетной мышцы человека, где представлены все изоформы ЛДГ (ЛДГ-1—ЛДГ-5; см. рисунок). К иммуносорбенту на основе антипептидных антител добавляли 30—50 мкл тестируемой сыворотки крови или смеси экстракта из сердечной ткани и скелетной мышцы человека (в разведении 1:20, 1:30), инкубировали (20 мин, 20 °С) и центрифугировали (3000 g, 10 мин).

Определение активности ЛДГ и выявление изо-



Электрофоретическое разделение в 1% агарозе изоферментов ЛДГ, содержащихся в образцах экстрактов из ткани сердца, скелетной мышцы человека и сыворотки крови больных инфарктом миокарда до и после обработки иммуносорбентом на основе антипептидных антител к N-концевому участку ЛДГ-5 мышечной ткани свиньи.

1 — смесь экстракта из сердечной ткани и скелетной мышцы человека (разведение 1:30) до обработки сорбентом; 2 — смесь экстракта из сердечной ткани и скелетной мышцы человека (разведение 1:30) после обработки иммуносорбентом; 4, 5, 7 — сыворотки больных инфарктом миокарда после обработки иммуносорбентом; 3, 6 — сыворотки крови больных инфарктом миокарда до обработки иммуносорбентом.

форм фермента при электрофорезе в 1 % агарозе в сыворотках и экстрактах до и после обработки иммуносорбентом показало, что иммуносорбент на основе антипептидных антител связывал и осаждал изоформы ЛДГ-2 — ЛДГ-5, но не осаждал ЛДГ-1 (H₄). Активность ЛДГ, оставшаяся в сыворотке крови и экстрактах после обработки сорбентом, соответствовала активности H₄-изоформы фермента, что коррелировало с данными электрофоретического анализа. При добавлении к иммуносорбенту несколько больших объемов сыворотки или экстракта сердечной ткани и скелетной мышцы человека, помимо H₄-изоформы, частично остается ЛДГ-2, т. е. сродство к этой изоформе менее выражено.

Полученные результаты позволяют заключить, что иммуносорбент на основе антипептидных антител к N-концевому участку ЛДГ-5 мышечной ткани свиньи связывает и осаждает из сыворотки крови и экстрактов сердечной ткани и скелетной мышцы человека все изоформы, содержащиеся хотя бы одну M-субъединицу ЛДГ человека (ЛДГ-2 — ЛДГ-5), но не осаждают H₄-изоформу (ЛДГ-1) фермента. Таким образом, можно сделать вывод, что антипептидные антитела к N-концевому району ЛДГ-5 мышцы свиньи избирательно реагируют только с M-субъединицами ЛДГ человека и не взаимодействуют с H₄-изоформой фермента. Следовательно, различие в первичной структуре N-концевых районов изоферментов M₄- и H₄-ЛДГ обуславливает избирательность взаимодействия антипептидных антител к этому участку ЛДГ-5 свиньи только с M-субъединицами фермента, но не с H₄-изоформой, т. е. образующиеся антипептидные антитела взаимодействуют именно с N-концевым районом в молекуле целого фермента. Перекрестные иммунологические реакции антипептидных антител, полученных к N-концевому участку ЛДГ-5 мышечной ткани свиньи, с соответствующими изоферментами ЛДГ человека указывают на структурное сходство N-концевых районов этих изоформ человека и свиньи.

ЛИТЕРАТУРА

1. Алексеева А. Е., Гребенщикова О. Г., Потапкина Т. А., Прозоровский В. Н. // *Вопр. мед. химии.*— 1989.— № 4.— С. 66.
2. Алексеева А. Е., Потапкина Т. А., Прозоровский В. Н. // Там же.
3. Вилкинсон Д. Принципы и методы диагностической энзимологии: Пер. с англ.— М., 1981.— С. 61—71.
4. Иванов И. И., Коровкин Б. Ф., Маркелов И. М. Введение в клиническую энзимологию.— М., 1974.— С. 225.
5. Appella E., Markert C. L. // *Biochem. biophys. Res. Commun.*— 1961.— Vol. 6.— P. 171—176.
6. Burd J. F., Usategui-Gomes M. // *Biochim. biophys. Acta.*— 1973.— Vol. 310.— P. 238—247.
7. Everse J., Berger R. L., Kaplan N. // *Science.*— 1970.— Vol. 168.— P. 1236—1238.
8. Gruber W. // *Z. klin. Chem. klin. Biochem.*— 1977.— Bd 10.— S. 575—577.
9. Helm H. J. // *Clin. chim. Acta.*— 1962.— Vol. 7.— P. 124—127.
10. Hopp T. P., Wood K. R. // *Proc. nat. Acad. Sci. USA.*— 1981.— Vol. 78.— P. 3824—3828.
11. Janicke R., Knof S. // *Europ. J. Biochem.*— 1968.— Vol. 4.— P. 157—163.
12. Kiltz H., Kell W., Griesbach M. et al. // *Hoppe-Seyler's Z. physiol. Chem.*— 1977.— Bd 358.— S. 1233—1237.
13. Lerner R. A., Sutcliffe J. G., Shinnick T. M. // *Cell.*— 1981.— Vol. 23.— P. 109—110.

14. Markert C. L., Appella E. // *Ann. N. Y. Acad. Sci.*— 1963.— Vol. 103.— P. 915—925.
15. Nisselbaum J. S., Bodansky O. // *Ibid.*— P. 930—937.
16. Wachsmuth E. D., Pfeleiderer G., Wieland T. // *Biochem. Z.*— 1964.— Bd 340.— S. 80—94.
17. Waller G., Hutchinson M. A., Hunter T., Echeart W. // *Proc. nat. Acad. Sci. USA.*— 1982.— Vol. 79.— P. 4025—4029.

Поступила 04.07.88

SELECTIVE INTERACTION OF ANTIPEPTIDE ANTIBODIES AGAINST N-TERMINAL SITE OF LACTATE DEHYDROGENASE-5 FROM PIG MUSCLE WITH VARIOUS ISOFORMS OF HUMAN LACTATE DEHYDROGENASE

A. E. Alexeeva, T. A. Potapkina, V. N. Prohorovsky

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

Antipeptide antibodies produced towards N-terminal site of lactate dehydrogenase-5 (LDH₅) from pig muscular tissue exhibited specific reactions with N-terminal site of pig LDH₅ and the whole enzyme molecule. An immunosorbent containing the antipeptide antibodies produced bound and precipitated all the LDH isoforms involving even a single M-subunit of the enzyme (LDH₂, LDH₅) but did not precipitate H₄-isoform (LDH₁) in extracts of human heart and skeletal muscle tissues and in blood serum of patients with myocardium infarction. The data obtained suggest that antipeptide antibodies against N-terminal site of pig muscular tissue LDH reacted selectively only with M-subunits of human LDH and did not interact with H₄ isoform, which occurred due to dissimilarities in primary structure of N-terminal sites of M₄ and H₄ LDH isoenzymes.

© В. Т. Долгих, 1990

УДК 616-036.882-08-039.72-06:[616.12+616.831]-084:615.217.24

В. Т. Долгих

ПРЕДОТВРАЩЕНИЕ ИНДЕРАЛОМ ПОСТРЕАНИМАЦИОННЫХ НАРУШЕНИЙ МЕТАБОЛИЗМА В ТКАНЯХ СЕРДЦА И МОЗГА

Омский медицинский институт

Реанимационное вмешательство приводит к развитию новых патологических процессов, которые могут оказаться причиной неблагоприятного исхода оживления. Одним из факторов, способствующих постреанимационному повреждению организма, является длительная активация симпатико-адреналовой системы в восстановительном периоде [6] и неблагоприятное влияние на организм повышенных концентраций катехоламинов (КХА), реализующих свое патогенное действие посредством избыточной стимуляции β-адренорецепторов [8]. В итоге значительно повышается уровень цАМФ, что закономерно активирует липазы, фосфолипазы, усиливает процессы перекисного окисления липидов (ПОЛ) и нарушает функционирование липидзависимых ферментов, рецепторов и каналов ионной проницаемости [13]. В настоящей работе предпринята попытка ограничить избыточную стимуляцию β-адренорецепторов КХА и предупредить повреждающее действие КХА на организм с помощью неселективного β-адреноблокатора индерала, обладающего способностью конкурентно связываться с β-адренорецепторами и инактивировать систему аденилатциклазы [11, 12, 16].

Опыты выполнены на 217 беспородных крысах-самцах массой 180–210 г под нембуталовым наркозом (25 мг/кг). Клиническую смерть продолжительностью 4 мин вызывали острой кровопотерей через сонную артерию, а оживление осуществляли центрипетальным нагнетанием выпущенной крови и искусственной вентиляцией легких. Эксперименты проводили в два этапа. На первом этапе изучали влияние острой смертельной кровопотери на выживаемость животных и метаболические нарушения в головном мозге и сердце. С этой целью через 1,5 ч после оживления забирали головной мозг после погружения головы в жидкий азот, а сердца извлекали металлическими щипцами, охлажденными в жидком азоте, и определяли в них содержание АТФ, АДФ и АМФ с помощью наборов «Test — Combination» («Boehringer Mannheim», ФРГ), а гликогена, неорганического фосфора, лактата, пирувата, адреналина, норадrenalина, гидроперекисей липидов, оснований Пиффа, свободных жирных кислот (СЖК) и антиокислительную активность липидов (АОА) — ранее применявшимися методами [2–4]. Рассчитывали энергетический потенциал и потенциал фосфорилирования [10]. В сердечной мышце определяли активность супероксиддисмутазы (СОД), каталазы ранее применявшимися методами [3], а также общее содержание фосфолипидов и их фракций [1,7]. Разделение фосфолипидов на фракции проводили методом тонкослойной хроматографии на пластинках Silufol («Kavalier», ЧССР). Содержание общих фосфолипидов и их фракций выражали количеством миллимоль неорганического фосфора, содержавшегося в 1 кг влажной ткани. На втором этапе оценивали эффективность использования неселективного β-блокатора индерала (1 мг/кг за 30 мин до кровопускания) для предотвращения постреанимационных повреждений головного мозга и сердца. В первые 30 мин после оживления осуществляли непрерывную запись ЭКГ со скоростью 10 мм/с (ритмограмма) и подсчитывали количество экстрасистол за это время. Ранее применявшимися методами [4] в сыворотке крови определяли содержание СЖК, лактата, а также исследовали активность ряда ферментов: лактатдегидрогеназы (ЛДГ), аспартаттрансаминазы (АСТ), малатдегидрогеназы (МДГ) и РНКазы как показатели генерализованного повреждения клеточных мембран [5]. Результаты обработаны статистически с использованием критерия Стьюдента.

Предварительная блокада β-адренорецепторов индералом способствовала более раннему восстановлению сердечных сокращений (через 75±5 с от начала реанимации; без препарата — через 108±6 с), дыхания (через 5,3±0,4 мин; без препарата — через 7,2±0,5 мин) и роговичных рефлексов (через 12,9±0,6 мин; без препарата — через 22,3±1,8 мин). У животных, не защищенных индералом, довольно часто выявлялись нарушения ритма, которые в 37 % случаев заканчивались фибрилляцией желудочков. Как показали наши исследования (табл. 1 и 2), постреанимационная электрическая нестабильность сердца находится в прямой зависимости от содержания в сердечной мышце адреналина ($r=0,869$; $p<0,01$) и СЖК ($r=0,796$; $p<0,01$), а также уровня СЖК в сыворотке крови ($r=0,725$; $p<0,01$) (рис. 1). Это положение подтверждается опытами с предварительным введением индерала, обладающего способностью ограничивать избыточную стимуляцию адренорецепторов катехоламинами и липо-

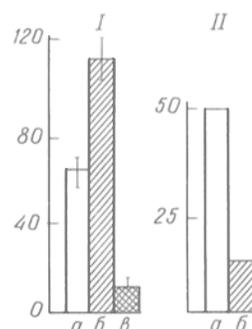


Рис. 1. Влияние индерала на частоту экстрасистол и постреанимационную летальность.

I — количество экстрасистол в первые 30 мин после оживления у животных с благоприятным (а) и неблагоприятным (б) течением постреанимационного периода, а также оживленных на фоне предварительно введенного индерала (с); II — летальность (%) животных на протяжении 1,5 ч после реанимации (а — интактные; б — предварительно защищенные индералом).

Таблица 1

Влияние предварительного введения индерала на постреанимационные нарушения энергетического обмена и уровень катехоламинов в сердце и головном мозге ($M \pm m$)

Показатель	Орган	Серия экспериментов				
		контроль (I)	реанимация		индерал (III)	индерал + реанимация (IV)
			IIa	IIб		
Креатинфосфат	Сердце	6,72±0,41	3,05±0,36*	1,79±0,32*	4,0±0,22	4,83±0,26*
		Мозг	3,80±0,44	3,72±0,33	1,71±0,20*	3,30±0,40
АТФ	Сердце	2,19±0,10	1,68±0,08*	0,85±0,10*	2,35±0,18	2,17±0,18*
		Мозг	2,08±0,12	1,51±0,11*	1,22±0,13*	2,39±0,11
АДФ	Сердце	0,48±0,03	1,17±0,09*	1,12±0,09*	1,02±0,09	1,34±0,16
		Мозг	1,07±0,10	1,41±0,07*	1,64±0,17*	1,14±0,09
АМФ	Сердце	0,15±0,01	0,68±0,04*	0,94±0,10*	0,56±0,07	0,64±0,11
		Мозг	0,36±0,03	0,54±0,04*	0,96±0,09*	0,56±0,04
Энергетический потенциал	Сердце	0,86±0,023	0,64±0,042*	0,19±0,031*	0,72±0,026	0,69±0,028*
		Мозг	0,74±0,069	0,64±0,063	0,53±0,055*	0,72±0,046
Неорганический фосфор, ммоль/кг	Сердце	5,52±0,28	7,08±0,80	12,28±1,32*	5,11±0,45	5,54±0,37
		Мозг	5,94±0,42	8,52±0,77*	7,70±0,52*	5,51±0,47
Потенциал фосфорилирования	Сердце	1,2±0,05	4,9±0,29*	17,7±1,63*	2,4±0,24	3,4±0,33*
		Мозг	3,0±0,33	7,9±0,51*	10,4±0,67*	2,6±0,36
Гликоген	Сердце	29,7±1,55	17,7±3,00*	9,2±0,61*	24,4±1,67	22,0±1,52
		Мозг	9,9±0,68	13,5±1,13*	8,9±1,04	15,0±2,11
Лактат	Сердце	2,26±0,14	6,22±0,43*	6,13±0,45*	1,70±0,13	2,77±0,23*
		Мозг	2,83±0,21	5,30±0,71*	8,91±0,28*	2,34±0,21
Пируват	Сердце	0,33±0,03	1,00±0,14*	1,22±0,31*	0,40±0,04	0,55±0,05*
		Мозг	0,44±0,05	0,76±0,11*	0,65±0,15	0,42±0,03
Норадrenalин	Сердце	1322±92	930±65*	805±73*	1395±163	1178±96*
		Мозг	56±6	70±9	84±10*	60±10

Примечание. Здесь и в табл. 2 — IIa и IIб — подгруппы животных с благоприятным и неблагоприятным течением постреанимационного периода. Звездочками отмечены достоверные различия между показателями в I и IIa, I и IIб, IIa и IV, а точками — между показателями IIб и IV в подгруппах животных.

Влияние предварительного введения индерала на постреанимационные нарушения процессов ПОЛ в сердце и головном мозге ($M \pm m$)

Показатель	Орган	Серия экспериментов				
		контроль (I)	реанимация		индерал (III)	индерал + реанимация (IV)
			IIa	IIб		
Гидроперекиси липидов, ммоль/кг	Сердце	1,56±0,06	2,57±0,19*	3,69±0,24*	1,29±0,06	1,44±0,08*
	Мозг	1,44±0,08	2,00±0,18*	3,44±0,21*	1,24±0,13	1,39±0,14*
Основания Шиффа, 10 ⁶ ед/кг	Сердце	3,43±0,18	5,25±0,61*	11,13±1,15*	2,45±0,25	2,73±0,41*
	Мозг	2,83±0,22	4,19±0,41*	6,67±0,26*	1,80±0,15	2,36±0,18*
АОА липидов	Сердце	1,11±0,66	2,3±0,14*	1,1±0,05*	14,6±0,88	9,8±0,65*
	Мозг	13,8±0,91	5,2±0,33*	3,1±0,17*	16,7±0,65	10,9±1,12*
СЖК	Сердце	360±23	440±47	1050±179*	258±21	389±32*
	Мозг	540±51	690±78	1080±194*	400±29	480±32*
СОД, 10 ³ ед/(ч·кг)	Сердце	205±12	157±11*	126±11*	198±13	174±11
Каталаза, 10 ⁴ ед/(ч·кг)	»	516±36	330±29*	265±19*	744±81	651±75*
Общие фосфолипиды	»	31,6±1,13	25,8±1,35*	23,4±1,55*	32,5±2,00	30,2±1,34*
Лизофосфатидилхолин	»	1,26±0,08	2,19±0,14*	2,45±0,16*	1,35±0,10	1,57±0,11*
Сфингомиелин	»	1,52±0,09	1,45±0,10	1,39±0,11	1,44±0,07	1,49±0,12
Фосфатидилхолин	»	11,25±1,02	9,35±0,64	9,06±0,66	11,45±1,36	10,29±0,78
Фосфатидилсерин	»	2,16±0,14	1,81±0,09*	1,67±0,09*	2,25±0,13	2,03±0,10*
Фосфатидилэтанолламин	»	9,19±0,54	6,64±0,50*	6,22±0,53*	9,06±0,34	8,77±0,45*
Кардиолипин + фосфатидные кислоты	»	4,05±0,27	2,60±0,19*	2,16±0,15*	4,21±0,22	3,74±0,30*

Примечание. Содержание фосфолипидов (и их фракций) выражено в миллимолях неорганического фосфора на 1 кг влажной ткани миокарда.

лиз. Относительная нормализация содержания адреналина и СЖК в миокарде, а также СЖК в сыворотке крови (см. табл. 1 и 2, рис. 1) уменьшалась более чем в 10 раз количество экстра-систола в первые 30 мин после оживления (рис. 2); у половины животных они отсутствовали. Оказывавшая антифибриллярное действие [14, 15], индерал полностью предупредил фибрилляцию желудочков, возникающую обычно во время клинической смерти или при проведении реанимационных мероприятий, что в конечном итоге в несколько раз уменьшило раннюю постреанимационную летальность (с 55,1 до 7,7 %).

Очевидно, снижение постреанимационной летальности на фоне индераловой защиты организма в известной степени связано с меньшими метаболическими нарушениями в таких жизненно важных органах, как сердце и головной мозг.

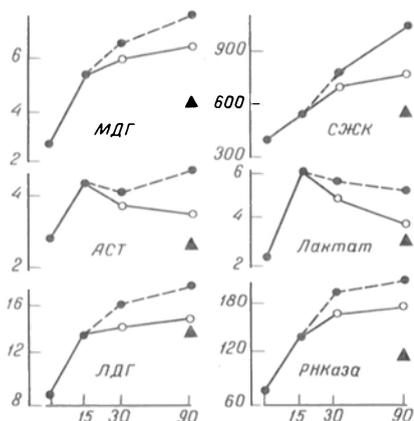


Рис. 2. Влияние острой смертельной кровопотери и предварительного введения индерала на биохимические изменения сыворотки крови.

По оси абсцисс — время (в мин) после оживления; по оси ординат — активность МДГ, АСТ, ЛДГ (в ммоль/(ч·л)), РНКазы (в ед. акт/л); уровень лактата (в ммоль/л) и СЖК (в мкмоль/л). Темные кружки — подгруппа животных с неблагоприятным течением постреанимационного периода; светлые кружки — подгруппа животных с благоприятным течением постреанимационного периода; треугольники — животные, защищенные индералом.

Это прежде всего касается уменьшения интенсивности процессов ПОЛ. Сам по себе индерал, как известно, не является ингибитором свободно-радикальных реакций. Он предотвращает лишь избыточную активацию адоренорецепторов катехоламинами и ограничивает их аутоокисление, сопровождающееся генерацией супероксидных радикалов [5], способных инициировать реакции ПОЛ [9]. В результате этого в миокарде в 2—3 раза снижается содержание гидроперекисей липидов и оснований Шиффа за счет повышения АОА липидов и мощности системы антирадикальной и антиперекисной защиты (см. табл. 2).

Ограничивая (опосредованно через блокаду β -адоренорецепторов) чрезмерную активацию ПОЛ и накопление токсичных перекисных соединений, дающих мембранодеструктивный эффект, индерал предупреждал характерное для постреанимационного периода снижение содержания фосфолипидов в биомембранах, особенно в подгруппе животных с неблагоприятным течением постреанимационного периода (подгруппа IIб, см. табл. 2). Уменьшалось содержание лизофосфатидилхолина, оказывающего аритмогенное действие, а концентрация фосфатидилхолина, фосфатидилэтанолламина, фосфатидилсерина и кардиолипина в сердечной мышце крыс, получавших препарат до клинической смерти, достоверно превышала уровень этих фракций фосфолипидов у не защищенных индералом животных.

Индерал блокировал вызываемую избытком КХА стимуляцию катаболизма адениловых нуклеотидов в раннем периоде после оживления. Из табл. 1 видно, что содержание АТФ в сердце животных, получавших индерал, через 1,5 ч после оживления на 29 % превышало уровень АТФ в сердечной мышце животных, не защищенных индералом (если течение восстановительного периода было благоприятным — подгруппа IIa), и на 15 % при неблагоприятном течении постреанимационного периода (подгруппа IIб). В сердце

сохранялась высокая концентрация креатинфосфата, а содержание неорганического фосфора как конечного продукта распада нуклеотидов уменьшалось в 1,5—5 раз в зависимости от характера течения постреанимационного периода. В конечном итоге отмечалось увеличение энергетического потенциала и снижение потенциала фосфорилирования.

Индерал сохранял гликогенный резерв миокарда, ограничивая анаэробный гликолиз и накопление лактата и пирувата в сердечной мышце: содержание этих метаболитов уменьшилось более чем в 2 раза. Подавляя усиленный липолиз, вызываемый избытком КХА, индерал уменьшал содержание СЖК в периферической крови и сердце, что закономерно повышало потребление миокардом углеводов, в том числе лактата.

Все изложенное выше свидетельствует о том, что предварительно введенный индерал защищает сердце от повреждений, возникающих при терминальных состояниях. Однако вряд ли можно только кардиопротективным действием индерала объяснить столь высокую выживаемость крыс в раннем периоде после оживления. Вполне очевидно, что индерал в не меньшей, а возможно, и в большей степени защищает от повреждений головной мозг, сохранность которого, как известно, в первую очередь определяет исход реанимации [6]. С этих позиций можно анализировать данные табл. 1 и 2. Видно, что в мозге животных, получавших индерал до клинической смерти, в большей мере, чем в сердце, снижено содержание токсичных перекисных соединений за счет сохранения более высокого уровня АОА липидов. Нарушения энергетического обмена в мозге, судя по высокому содержанию АТФ, креатинфосфата и гликогена, на фоне индерала были минимальными, а продукция энергии осуществлялась в основном за счет усиления окислительного фосфорилирования. В конечном итоге увеличивался энергетический потенциал мозга, приближаясь к уровню, характерному для интактных животных.

Кроме того, индерал, введенный до острой смертельной кровопотери, уменьшал в раннем периоде реанимации интенсивность анаэробного гликолиза и накопление в крови лактата, предупреждая развитие некомпенсированного метаболического ацидоза, липолиза и выделение ферментов в кровь, т. е. гиперферментемии — показателя, отражающего генерализованное повреждение клеточных мембран (см. рис. 1).

Анализ полученных результатов свидетельствует о том, что предварительно вводимый индерал, ограничивая липолиз, значительно снижает интенсивность процессов ПОЛ в жизненно важных органах, сохраняя активность антиоксидантных ферментов и АОА липидов, что закономерно уменьшает содержание токсичных продуктов ПОЛ в мозге и сердце. В результате, надо полагать, уменьшается деструкция клеточных мембран, связанная с гидролизом фосфолипидных фракций и повышенным образованием лизофосфолипидов, нарушающих микролипидное окружение мембранолокализированных ферментов, в частности ферментов цикла Кребса, что обеспечивает рост энергетического потенциала нейронов головного мозга и кардиомиоцитов. Индерал, сохраняя постоянство фосфолипидного состава мембран кардиомиоци-

тов, уменьшает электрическую нестабильность сердца и полностью предупреждает фибрилляцию желудочков, возникающую обычно во время клинической смерти или при оживлении организма, тем самым значительно снижает летальность животных на протяжении 1,5 ч после оживления.

ЛИТЕРАТУРА

1. Грибанов Г. А., Сергеев С. А., Алексеенко А. С. // Лаб. дело.— 1976.— № 12.— С. 724—727.
2. Долгих В. Т. // Вопр. мед. химии.— 1987.— № 6.— С. 31—36.
3. Долгих В. Т. // Там же.— 1988.— № 1.— С. 33—38.
4. Долгих В. Т., Кочетков А. М., Еремеев С. И., Мальков П. Г. // Анест. и реаниматол.— 1988.— № 1.— С. 24—29.
5. Меерсон Ф. З. Патогенез и предупреждение стрессорных и ишемических повреждений сердца.— М., 1984.
6. Неговский В. А., Гурвич А. М., Золотокрылина Е. С. Постреанимационная болезнь.— М., 1987.
7. Овчинников И. В., Хотдаев М. М., АLEANOV A. A. и др. // Мед. журн. Узбекистана.— 1978.— № 11.— С. 38—42.
8. Сапрыгин Д. Б., Серов Р. А., Каштэлян Л. С. // Бюл. эксп. биол.— 1984.— № 8.— С. 175—177.
9. Шведова А. А., Каган В. Е., Кулиев И. Я. // Там же.— 1982.— № 4.— С. 24—26.
10. Atkinson D. E. // Biochemistry (Wash.).— 1968.— Vol. 7.— P. 4030—4034.
11. Noronha-Dutra A. A., Steen E. M., Woolf N. // Basic Res. Cardiol.— 1985.— Vol. 80, Suppl.— P. 133—136.
12. Opie L. H. // Cardiovasc. Res.— 1982.— Vol. 16, N 9.— P. 483—507.
13. Rona G. // J. molec. cell. Cardiol.— 1985.— Vol. 17, N 4.— P. 291—306.
14. Ruffly R., Schechtman K., Monje E. // Amer. J. Physiol.— 1985.— Vol. 248,— Pt. 2.— P. 647—677.
15. Sung R. J., Yan Tai Der, Svinarich J. T. // Amer. Heart J.— 1984.— Vol. 108, N 4.— Pt 2.— P. 1115—1120.
16. Wollenberger A. // Sitzungsber. Akad. Wiss. DDR.— 1981.— N 18.— S. 34.

Поступила 04.07.88

PROTECTION BY MEANS OF INDERAL AGAINST POST-RESUSCITATIONAL IMPAIRMENTS OF METABOLISM IN HEART AND BRAIN TISSUES

V. T. Dolgikh

Medical School, Omsk

Restriction of lipolysis as well as a decrease in the rate of lipid peroxidation due to prevention of inhibition of antioxidant enzymes and to maintaining of bioantioxidants in heart and brain tissues were observed during the postresuscitation period in rats preadministered with inderal and reanimated after acute lethal hemorrhage. Inderal, which maintained homeostasis of phospholipid fractions in cardiomyocyte membranes, decreased the electric instability of heart and prevented the ventricles fibrillation within the early period after resuscitation. The drug decreased distinctly catabolism of adenylic nucleotides in heart and brain tissues.

© Т. А. ЗЕЙНАЛОВ, В. З. ГОРКИН, 1990

УДК 616-099-02:615.285.71-07: [616.153.1:577.152.1

Т. А. Зейналов, В. З. Горкин

ОБ ОСОБЕННОСТЯХ ИЗМЕНЕНИЙ АКТИВНОСТИ АМИНОКСИДАЗ ПРИ ИНТОКСИКАЦИЯХ ПЕСТИЦИДАМИ

Институт биологической и медицинской химии АМН СССР, Москва

Аминоксидазы (АО) — ферменты, катализирующие реакции окислительного дезаминирования аминов, играют важную роль в биохимиче-

ских превращениях как биогенных аминов [1], так и многих ксенобиотиков [14].

Различают две основные группы АО: моноаминоксидазы (МАО), флавиновые ферменты, связанные со структурами биомембран, и растворимые медьзависимые АО. Идентифицировано два основных типа МАО — А и Б. МАО типа А, высокочувствительные к тормозящему действию хлоргидина, специфически катализируют дезаминирование серотонина и норадреналина. Активность МАО типа Б тормозят низкие концентрации депренила, а специфическими субстратами являются 2-фенилэтиламин (ФЭА) и бензиламин. Многие биогенные амины подвергаются окислительному дезаминированию при участии обоих типов МАО [1].

Нарушения активности АО лежат в основе патогенеза многих заболеваний человека. В настоящее время интенсивно разрабатываются новые методы диагностики различных заболеваний человека, основанные на исследованиях отклонений от нормы каталитических функций АО в доступных биологических жидкостях организма [1].

Исследования активности МАО тромбоцитов крови человека, которая по современным представлениям соответствует МАО типа Б, дают важную косвенную информацию об изменениях активности МАО типа Б в организме человека и, в частности, в тканях мозга. Низкая активность МАО тромбоцитов обнаружены при алкоголизме, циклических психозах, токсемии беременности, тиреотоксикозах; повышенная — при депрессиях, сенильной деменции, хоре Хантингтона [10]. Нарушения активности АО сыворотки крови наблюдали в клинике при злокачественных новообразованиях, ожогах [1].

При воздействии различных факторов окружающей среды (например, ионизирующей радиации) могут происходить разнонаправленные сдвиги активности аминоксидаз [1]. Нами ранее было обнаружено, что инсектицид байгон (изопропоксифенилметилкарбамат), относящийся к ядохимикатам класса карбаматов, широко используемым в сельском хозяйстве, избирательно стимулирует активность МАО типа Б из различных биологических объектов [2, 3]. Фунгицид цинеб (этиленбисдитиокарбамат) тормозит активность МАО типа А из печени крыс [2, 3]. Имеются также данные о торможении моноаминоксидазной активности фосфорорганическими [13] и другими пестицидами [9, 11, 12].

В условиях стимуляции перекисного окисления липидов (ПОЛ) торможение моноаминоксидазной активности может быть обусловлено качественной модификацией каталитических свойств МАО типа А [1]. Такая модификация МАО обычно обратима, что особенно важно для разработки новых средств профилактики интоксикаций пестицидами. Особенностью химического строения инсектицидов является их высокая растворимость в жирах, что необходимо для проникновения через липофильную кутикулу насекомых. Интоксикации пестицидами сопровождаются стимуляцией ПОЛ биомембран [1].

Если отравления пестицидами действительно влияют на функционирование АО *in vivo*, есть

основание предполагать, что попадание пестицидов в организм человека будет сопровождаться нарушением активности МАО тромбоцитов и АО сыворотки крови. Для проверки этого предположения нами было проведено обследование лиц, проживающих в районе длительного и интенсивного применения ядохимикатов.

Методика

Выделение тромбоцитов. Кровь, взятую из вены в количестве 10 мл в пластмассовую посуду с 0,3 мл гепарина для предотвращения коагуляции, центрифугировали 10 мин при 250–300 g для осаждения эритроцитов. Надосадочную жидкость (плазму, обогащенную тромбоцитами) отбирали при помощи автоматической пипетки с пластмассовым наконечником и центрифугировали 15 мин при 2500 g. Надосадочную жидкость использовали для определения активности АО крови, а осадок тромбоцитов суспендировали в 1 мл 0,3 М сахарозы и еще раз центрифугировали 15 мин при 2500 g. Промытые тромбоциты суспендировали в 0,5 мл 0,08 М калий-натрий-фосфатного буфера pH 7,4 и замораживали при -70°C .

Определение активности МАО тромбоцитов проводили радиометрическим методом [16], используя в качестве субстрата $[\text{C}^{14}]$ бензиламин (1,26 мкКи/нмоль). Пробы содержали: 0,04 мл суспензии тромбоцитов (содержание белка 3,5 мг/мл), 0,02 мл раствора бензиламина (конечная концентрация 0,1 мМ) в фосфатном буфере и 0,04 мл 0,08 М калий-натрий-фосфатного буфера pH 7,4. Пробы инкубировали 40 мин при 37°C . Реакцию останавливали добавлением к пробам 0,05 мл 1 н. HCl. Затем в каждую пробу добавляли 2 мл сцинтилляционной жидкости ЖС-106 и экстрагировали образовавшийся в ходе реакции бензальдегид в течение 5 мин на механическом шейкере при интенсивном встряхивании. Количество распадов (импульсов) определяли на сцинтилляционном счетчике «Mark-II» («Nuclear-Chicago», США).

Определение активности АО сыворотки (плазмы) крови человека с бензиламином в качестве субстрата [4]. К 0,5 мл плазмы крови добавляли 0,85 мл 0,04 М калий-натрий-фосфатного буфера pH 7,4 и 0,15 мл 10 мМ раствора бензиламина. В контрольные пробы плазму добавляли после остановки реакции. Пробы (конечный объем 1,5 мл) инкубировали 180 мин при 37°C . Реакцию останавливали добавлением 0,2 мл 1 М HCl. Для экстракции бензальдегида (БА), образовавшегося в ходе реакции дезаминирования бензиламина, в пробы добавляли 3 мл гексана и проводили интенсивное встряхивание в течение 5 мин, используя механический шейкер. Содержание бензальдегида в органической фазе (эффективность экстракции 94 %) определяли спектрофотометрически по оптической плотности, измеренной при 241 нм против чистого гексана.

Результаты и обсуждение

Было проведено измерение активности МАО тромбоцитов и АО сыворотки крови 20 женщин-дезинфекторов и 24 (10 женщин и 14 мужчин) сельскохозяйственных рабочих, имеющих постоянный контакт с ядохимикатами по роду своей профессиональной деятельности и проживающих в Агдамском районе Азербайджанской ССР — сельскохозяйственном районе с длительным и интенсивным применением пестицидов. В качестве контроля были обследованы 10 доноров (2 женщины и 8 мужчин) из Баку и 40 доноров (20 женщин и 20 мужчин) из Москвы.

Наиболее высокая активность МАО тромбоцитов у обследованных женщин-дезинфекторов составляла 0,5 нмоля БА на 1 мг белка за 1 мин; наименьшая — 0,16 нмоль БА на 1 мг белка за 1 мин. Среднее значение активности МАО тромбоцитов составило $0,33 \pm 0,02$ нмоля БА на 1 мг белка за 1 мин (рис. 1).

Среднее значение активности МАО тромбоци-

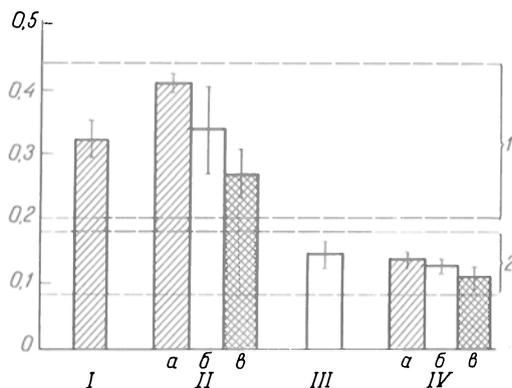


Рис. 1. Активность MAO тромбоцитов крови человека при воздействии пестицидов.

1 — преднотония; 2 — норма; I — дезинфекторы-женщины (Агдам); II — рабочие совхоза № 7 Агдамского района (а — женщины, б — женщины и мужчины, в — мужчины); III — доноры (мужчины и женщины) из Баку; IV — доноры из Москвы (а — женщины, б — женщины и мужчины, в — мужчины). По оси ординат — активность MAO тромбоцитов циркулирующей крови (в нмолях образовавшегося бензалдегида на 1 мг белка за 1 мин).

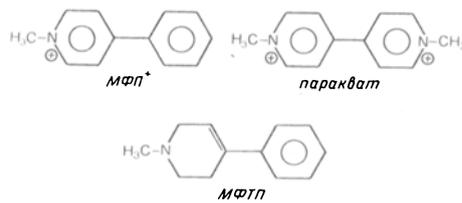
тов у сельскохозяйственных рабочих ($n=24$, средний возраст 30,5 лет, средний стаж работы 8 лет) составило $0,3 \pm 0,04$ нмоля БА на 1 мг белка за 1 мин. Среднее значение активности MAO тромбоцитов крови обследованных женщин этой группы ($n=10$, средний возраст 26,8 лет) составило 0,42 нмоля БА на 1 мг белка за 1 мин; у мужчин ($n=14$, средний возраст 36 лет) — 0,24 нмоля БА на 1 мг белка за 1 мин. В группе доноров из Баку были обследованы 2 женщины и 8 мужчин ($n=10$, средний возраст 32 года). Среднее значение активности MAO тромбоцитов составило $0,15 \pm 0,05$ нмоля БА на 1 мг белка за 1 мин. В группе доноров из Москвы у мужчин ($n=20$, средний возраст 46 лет) активность MAO тромбоцитов составляла $0,11 \pm 0,02$ нмоля БА на 1 мг белка за 1 мин, а у женщин ($n=20$, средний возраст 35 лет) — $0,14 \pm 0,01$ нмоля БА на 1 мг белка за 1 мин.

Таким образом, на основании проведенных обследований было обнаружено, что у практически здоровых людей, постоянно подвергавшихся воздействию пестицидов, активность MAO тромбоцитов статистически достоверно выше (почти в 2 раза), чем у доноров-горожан. Эти данные соответствовали тому, что можно было ожидать на основании результатов экспериментальных исследований [3], в которых было охарактеризовано свойство инсектицидов стимулировать активность MAO типа Б. Активность MAO тромбоцитов у женщин была выше, чем у мужчин. Повышенная активность MAO тромбоцитов свидетельствует о возможном увеличении активности MAO типа Б в организме обследованных лиц, в частности в тканях мозга.

За последние годы появились данные о важной роли MAO типа Б в процессинге ксенобиотиков, имеющих, возможно, отношение к развитию болезни Паркинсона [15]. К числу таких ксенобиотиков относятся некоторые производные пиридина, которые встречаются в окружающей среде. В частности, установлено, что вызывающий у человека и приматов явления паркинсонизма нейротоксин 1-метил-4-фенил-тетрагидро-

пиридин (МФТП) становится ядовитым после взаимодействия с MAO типа Б [14]. МФТП⁺ (1-метил-4-фенилпиридиний) — активный метаболит МФТП, непосредственно ответственный за разрушение дофаминергических нейронов, подвергали полевым испытаниям в качестве гербицида под названием циперкват.

Хорошо известный гербицид паракват химически сходен с МФТП⁺:



Следует отметить, что острые интоксикации пестицидами (в частности, инсектицидом байгоном) сопровождаются характерными «старческими синдромами», например депрессией или симптомом дрожательного паралича, напоминающего паркинсонизм [9, 11, 12]. Можно предполагать, что эти явления обусловлены снижением концентрации экстрацеллюлярного дофамина за счет стимуляции активности MAO типа Б в тканях мозга. С возрастом активность MAO типа Б в мозге нарастает за счет разрушения нейронов (содержащих преимущественно MAO типа А) и заменой их клетками нейроглии, содержащей MAO типа Б. У пожилых и старых людей депрессивные состояния встречаются чаще, чем у молодых и лиц среднего возраста [15].

В последние годы все большее внимание исследователей привлекают маскированные формы депрессий [7], проявляющиеся нарушениями соматических и вегетативных функций. При комплексном обследовании, проведенном в ряде стран, было установлено, что примерно у 10 % больных, обратившихся за общей медицинской помощью с жалобами на бессонницу, мигрень, кардиалгии, желудочно-кишечные расстройства, нарушения менструального цикла, указанные соматовегетативные дисфункции были обусловлены различными формами депрессий [6]. Обращаемость за медицинской помощью с жалобами именно на вышеуказанные заболевания наиболее характерна для жителей сельскохозяйственных районов с интенсивным применением ядохимикатов [5].

Повышенная активность MAO тромбоцитов в крови жителей Агдама указывает на возможность увеличения у них активности MAO типа Б в различных отделах головного мозга и развития у них (в результате снижения концентрации ФЭА) маскированных форм депрессий, проявляющихся различными соматовегетативными нарушениями. О важной роли ФЭА в патогенезе депрессий свидетельствуют следующие факты [6]: 1) ФЭА является биогенным амином, обнаруживающим активирующее (фенаминоподобное) действие на поведение, тогда как катехоламины вызывают депрессивные эффекты; 2) выделение с мочой ФЭА снижено у больных с эндогенной депрессией, острой психиче-

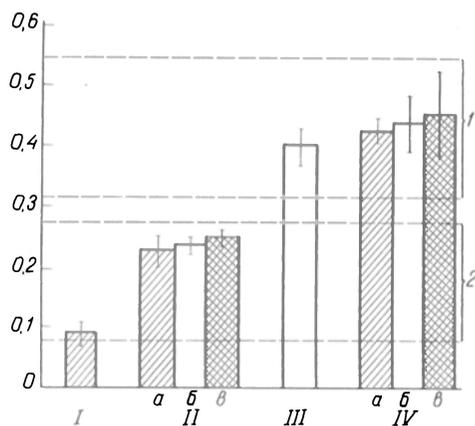


Рис. 2. Активность АО плазмы крови человека при воздействии пестицидов.

По оси ординат — активность АО (в нмолях образовавшегося бензальдегида на 1 мл плазмы крови за 1 мин). Остальные обозначения, как и на рис. 1.

ской депрессией и при хронических депрессиях; при вторичной депрессии (шизофрения и ситуационные депрессии) экскреция ФЭА не изменена или повышена: у маниакальных больных кругооборот ФЭА увеличен; 3) предшественник ФЭА — фенилаланин вызывает отчетливое антидепрессивное действие (хотя неизвестно декарбоксилируется ли он при этом до ФЭА); антидепрессивный эффект ДОФА и серотонина относительно слабо выражен; 4) выделение ФЭА с мочой у человека, так же как содержание и кругооборот ФЭА в мозге животных, снижаются при введении фенамина, имипрамина, ингибиторов MAO. Под влиянием имипраминоподобных соединений концентрация ФЭА в мозге у экспериментальных животных увеличивается в значительно большей степени (в 4 раза), чем других нейротрансмиттеров.

Таким образом, исследования активности MAO типа B тромбоцитов могут быть использованы для выявления групп повышенного риска в отношении нервно-психических заболеваний среди лиц, проживающих в сельскохозяйственных районах с интенсивным применением ядохимикатов.

По-видимому, при интоксикациях пестицидами в тканях организма также происходят разнонаправленные сдвиги активности АО [3].

В условиях наших исследований (рис. 2) активность АО плазмы (сыворотки) крови у женщин-дезинфекторов составила в среднем $0,9 \pm 0,01$ нмоль БА на 1 мл плазмы за 1 мин. В группе рабочих совхоза № 7 Агдамского района активность АО была $0,24 \pm 0,01$ нмоль БА на 1 мл плазмы за 1 мин (у мужчин $0,25 \pm 0,01$ нмоль, у женщин $0,23 \pm 0,02$ нмоль). У доноров Баку среднее значение активности АО было $0,4 \pm 0,3$ нмоль БА на 1 мл плазмы, а в группе доноров Москвы активность АО составляла у мужчин $0,42 \pm 0,02$ и у женщин $0,45 \pm 0,06$ нмоль БА на 1 мл плазмы за 1 мин.

Таким образом, активность АО плазмы крови женщин-дезинфекторов, имеющих постоянный контакт в процессе работы с рядом ядохимикатов (кумафосом, метафосом, зоокумаринном), была почти в 5 раз ниже по сравнению с тем же показателем у доноров Москвы и Баку.

Исходя из данных литературы о возникнове-

нии опухолей (преимущественно лимфом и сарком) у людей, подвергавшихся в условиях производства воздействию пестицидов [5], можно предполагать, что обнаруженный нами значительно более низкий уровень активности АО сыворотки (плазмы) крови у людей, контактирующих с ядохимикатами, характеризует фактор риска развития злокачественных новообразований. Следует отметить, что наши данные по исследованию АО плазмы (сыворотки) крови сопоставимы с результатами обследования больных злокачественными новообразованиями в клинике [8]. Снижение активности АО плазмы (сыворотки) крови сопровождается также развитием токсических гепатитов и спонтанное прерывание беременности [1, 5] — патологий, характерных для жителей сельскохозяйственных районов с интенсивным применением ядохимикатов.

Полученные результаты свидетельствуют о возможности использования исследований MAO тромбоцитов и АО плазмы (сыворотки) крови в качестве биохимических критериев, отражающих понятия норма — предпатология при оценке токсического действия ядохимикатов.

ЛИТЕРАТУРА

1. Горкин В. З. Аминоксидазы и их значение в медицине. — М., 1981.
2. Зейналов Т. А. // Гиг. и сан. — 1984. — № 6. — С. 49—52.
3. Зейналов Т. А. // Вопр. мед. химии. — 1985. — № 5. — С. 58—64.
4. Киркель А. З., Романюк Ю. П., Давыдова Г. А. и др. // Там же. — 1986. — № 2. — С. 118—124.
5. Кульгичина А. А. // Гигиена окружающей среды. — М., 1984. — Изд. ВНИИМИ.
6. Машковский М. Д., Андреева Н. И., Полежаева А. И. Фармакология антидепрессантов. — М., 1983.
7. Туганов А. С. // Клин. мед. — 1986. — № 9. — С. 6—12.
8. Филатова Н. А. // Вопр. мед. химии. — 1986. — № 2. — С. 36—41.
9. Bainova A., Zaprianov Z., Kaloyanova-Simeonova F. // Arch. hig. zada toksikol. — 1979. — Vol. 30. — P. 531—535.
10. Denney R., Denney C. // Pharmacol. Ther. — 1985. — Vol. 30. — P. 227—259.
11. Kaloyanova F., Bainova A., Zaprianov Z. // Arch. environm. Contam. Toxicol. — 1981. — Vol. 10. — P. 1—8.
12. Kaloyanova F., Zaprianov Z., Bainova A. // Dokl. Bolg. Acad. Nauk. Med. Pharmacol. — 1979. — Vol. 32. — P. 1153—1155.
13. Nag M., Nandy N. // Indian J. exp. Biol. — 1987. — Vol. 25. — P. 567—569.
14. Singer T., Trevor A., Castagnoli N. // TIBS. — 1987. — Vol. 12. — P. 266—270.
15. Snyder S., D'Amato R. // Neurology. — 1986. — Vol. 36. — P. 250—258.

Поступила 04.07.88

ON PECULIARITIES OF ALTERATIONS OF AMINE OXIDASE ACTIVITY IN INTOXICATION WITH PESTICIDES

T. A. Zeinalov, V. Z. Gorkin

Institute of Biological and Medical Chemistry, Academy of Medical Sciences of the USSR, Moscow

In persons professionally contacting with pesticides for a long time activity of membrane-bound monoamine oxidases (MAO) was statistically distinctly higher (about 2-fold) in blood thrombocytes, while activity of soluble amine oxidase (AO) was considerably lower (about 5-fold) in blood serum and plasma as compared with persons who did not have prolonged contact with pesticides. These data suggest that estimation of MAO activity in thrombocytes and of AO activity in blood serum may be used for hygienic evaluation of criteria involved in the conception "normal state — prepathology".

С. А. Силаева, Б. Я. Хацернова, В. А. Голенченко,
Г. Н. Берченко, А. Я. Николаев, А. Б. Шехтер

СИНТЕЗ НУКЛЕИНОВЫХ КИСЛОТ И ДИНАМИКА МОРФОЛОГИЧЕСКИХ ПОКАЗАТЕЛЕЙ ГРАНУЛЯЦИОННОЙ ТКАНИ КОЖНЫХ РАН У КРЫС, ЛЕЧЕННЫХ 4-МЕТИЛУРАЦИЛОМ

Г Московский медицинский институт им. И. М. Сеченова

Несмотря на многочисленность экспериментальных и клинических исследований, посвященных изучению процесса заживления ран, поиск препаратов, улучшающих заживление, и исследование механизмов их действия являются весьма актуальными. С 60-х годов в клинической практике в качестве стимулятора анаболических процессов стал применяться 4-метилурацил. Будучи структурным аналогом тимина, этот препарат не только не нарушает синтеза ДНК, но и стимулирует эритро- и лейкопоэз, оказывает противовоспалительное действие, ускоряет процессы регенерации. Описано применение 4-метилурацила для лечения ран, ожогов, переломов костей, язвенной болезни желудка и двенадцатиперстной кишки, хронического гастрита и ряда других заболеваний [1, 4, 11, 12]. Однако молекулярные механизмы действия этого препарата изучены недостаточно.

В настоящей работе исследовано влияние 4-метилурацила на динамику синтеза нуклеиновых кислот и морфологические показатели грануляционной ткани, образующейся при заживлении полпослойных кожных ран у крыс.

МЕТОДИКА

Работа проведена на белых крысах-самцах массой 180—200 г. В экспериментах использовали грануляционную ткань, образующуюся при заживлении полнослойных кожных ран внутри тефлоновых колец диаметром 2 см [9]. Раны наносили путем вырезания кожи в области спины. Экспериментальные животные были разделены на 3 группы в зависимости от условий, в которых шло заживление ран: в 1-й группе грануляционная ткань образовывалась под струпом в условиях открытой раны, во 2-й — под двуслойными марлевыми салфетками, на которые наносили 40 мг ланолин-вазелиновой мази с соотношением компонентов 1:1, в 3-й — под салфетками с ланолин-вазелиновой мазью, содержащей 5 % 4-метилурацила.

Грануляционную ткань собирали с площади, ограниченной кольцом, со 2-х по 7-е сутки после нанесения раны. За 1,5 ч до декапитации животным вводили внутривенно ^3H -тимидин и ^{14}C -оротат из расчета 100 и 50 мкКи на 100 г массы животного соответственно. Из гомогенатов ткани выделяли ядра и митохондрии по методикам, описанным ранее [8], их использовали для определения содержания ДНК и РНК по модифицированному методу [10] и изучения синтеза макромолекул. Интенсивность синтеза ДНК оценивали по включению ^3H -тимидина в ДНК, интенсивность синтеза РНК — по включению ^{14}C -оротата. Радиоактивность и количественное содержание нуклеиновых кислот определяли в одних и тех же пробах.

Грануляционную ткань подвергали морфометрическому исследованию. На гистологических препаратах, окрашенных гематоксилином и эозином, пикрофуксином по Ван-Гизону на коллагеновые волокна, толуидиновым синим на кислые гликозаминогликаны и реакцией Браше на РНК, проводили подсчет клеточной плотности (содержание клеток на единицу площади) и вычисляли процентное содержание фибробластов макрофагов и полиморфноядерных лейкоцитов. Для исследования использовали морфометрическую сетку С. Б. Сте-

фанова. Цифровые данные обрабатывали, оценивая достоверность результатов по критерию Стьюдента [2].

Результаты и обсуждение

На рис. 1 представлены изменения содержания суммарной ДНК, выделенной из гомогенатов, в расчете на 1 г грануляционной ткани. В исследуемый период содержание ДНК в ткани открытой раны постоянно было выше, чем в тканях, формировавшихся под мазевыми покрытиями. Наиболее значительные различия в характере кривых наблюдались со 2-х по 5-е сутки. В этом интервале на кривой 1 отмечен пик с максимумом на 3-и сутки. На кривых 2 и 3 этот пик сдвинут к более ранним срокам и содержание ДНК в первой точке измерения в 1,5 раза меньше у животных 2-й группы и более чем в 2 раза у животных 3-й группы, чем в области максимума в контрольной группе. Более того, у животных 3-й группы, раны которых лечили 4-метилурацилом, на кривой содержания ДНК наблюдался дополнительный максимум, приходившийся на 4-е сутки заживления ран.

Полученные результаты становятся понятными при рассмотрении их в сочетании с результатами морфологического исследования клеточного состава грануляционной ткани у животных 1-й и 3-й групп. Как видно на рис. 2, в первые 4 сут воспалительная фаза раневого процесса наиболее выражена. В область повреждения мигрируют лейкоциты и макрофаги, распадающиеся затем в ране. Быстрое увеличение клеточной плотности фибробластов в открытой ране происходит после 3-х суток. На 2-е сутки наблюдается интенсивное накопление полиморфноядерных лейкоцитов, а на 3-и сутки их содержание снижается приблизительно на 40 %. Изменение содержания ДНК в грануляционной ткани открытой раны (см. рис. 1), очевидно, отражает два процесса: накопление и последующий распад клеток воспалительного экссудата — первый пик ДНК, наблюдающийся на 3-и сутки, и увеличение количества фибробластов в ткани — максимум, приходившийся на 6-е сутки. Поскольку в течение воспалительной фазы содержание ДНК в гомогенате ткани является максимальным на 3-и сутки, можно думать, что в интервале между 2-ми и 3-ми сутками поступление лейкоцитов в область раны продолжается. Используемый метод определения ДНК учитывает ДНК-содержащий материал как целых, так и распадающихся клеток, поэтому профиль кривых, характеризующих содержание клеток на гистологических препаратах и содержание ДНК, различается.

Уже на 2-е сутки под покрытием, содержащим 4-метилурацил, накопление полиморфноядерных лейкоцитов в ткани раны снижается почти в 2 раза (см. рис. 2) по сравнению с контролем. Раньше наблюдается рост фибробластов. Благодаря уменьшению продолжительности воспалительной фазы первый пик содержания ДНК, обусловленный лейкоцитами, в этом случае смещен ко 2-м суткам. На 4-е сутки на кривой содержания ДНК в ткани, полученной при лечении раны 4-метилурацилом, появляется допол-

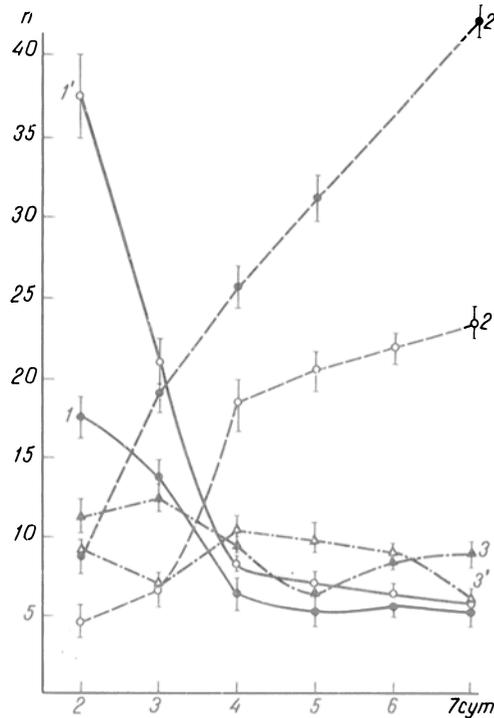
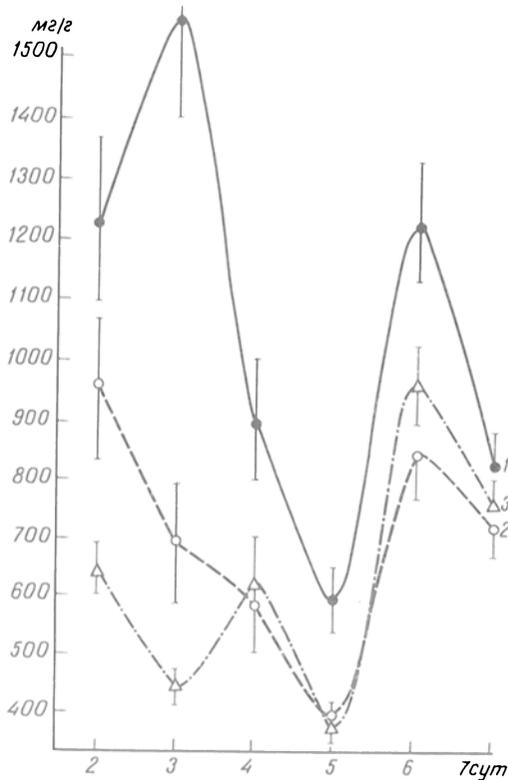


Рис. 1. Содержание суммарной ДНК грануляционной ткани в процессе заживления ран.

Здесь и на рис. 2—4: по оси абсцисс — сутки после нанесения раны; по оси ординат — содержание ДНК (в мг на 1 г ткани). Здесь и на рис. 3 и 4: кривые 1 — данные для ткани, образующейся в открытой ране; 2 — для ткани, образующейся под ланолин-вазелиновым покрытием; 3 — для ткани, образующейся под ланолин-вазелиновым покрытием, содержащим 5% 4-метилурацила.

Рис. 2. Плотность полиморфноядерных лейкоцитов (1, 1'), фибробластов (2, 2') и макрофагов (3, 3') в грануляционной ткани в процессе заживления ран.

По оси ординат — число клеток на 1 кв. площади; 1, 2, 3 — данные для ткани раны, леченной 4-метилурацилом; 1', 2', 3' — данные для ткани открытой раны.

нительный максимум, который, судя по данным рис. 2, суммирует три процесса: увеличение содержания фибробластов, с одной стороны, и уменьшение количества макрофагов и лейкоцитов — с другой. В открытой ране значительный распад лейкоцитов и макрофагов наблюдается и в более поздние сроки формирования грануляционной ткани. Этим объясняется большее содержание ДНК при втором пике на 6-е сутки (см. рис. 1) по сравнению с соответствующими максимумами на кривых, отражающих формирование ткани под мазевыми покрытиями. Следует отметить, что только покрытие раны мазью за счет уменьшения доступа воздуха и предотвращения высыхания раны уже способствует уменьшению воспаления, о чем свидетельствует сниже-

ние содержания лейкоцитарной ДНК (см. рис. 1) по сравнению с контролем.

В интервале со 2-х по 7-е сутки изучали динамику синтеза ядерной ДНК (ядДНК) в расчете на 1 мг по включению ^3H -тимидина. На рис. 3 видно, что для ядер грануляционной ткани из открытой раны и раны, покрытой ланолин-вазелиновой мазью, наблюдаются два максимума синтеза яДНК с 3-суточной периодичностью. В то же время в ядрах клеток ткани, формирующейся под покрытием с 4-метилурацилом, отмечаются 3 максимума, приходящиеся на 2, 4, 6-е сутки. Таким образом, у группы животных, леченных 4-метилурацилом, волны синтеза ДНК учащаются и имеют 2-суточную периодичность. Это указывает на более интенсивную по сравнению с контролем пролиферацию фибробластов, что подтверждают морфологические исследования. Как видно на рис. 2, уже на 2-е сутки содержание фибробластов в ранах, леченных 4-метилурацилом, в 2 раза больше, чем в контроле. На 3-и сутки эта разница становится 3-кратной. Данные о включении ^3H -тимидина в яДНК тканей, образующихся у животных всех групп, указывают на то, что в процессе заживления раны происходит определенная синхронизация деления фибробластов и синтеза ДНК, что согласуется с результатами исследований других авторов [3, 5]. Ранее в работах [6, 7], проведенных на гепатоцитах интактной и регенерирующей печени, было отмечено, что 4-метилурацил является синхронизатором клеточной популяции, обеспечивающим более мощное по сравнению с физиологической регуляцией вступление клеток печени в биосинтез ДНК. В наших экспериментах (см. рис. 3) лечение 4-метилурацилом несущественно по сравнению с контролем увеличивало число клеток, участвующих в синтезе ДНК. Однако у части делящихся фибробластов оно вызывало уменьшение продолжительности

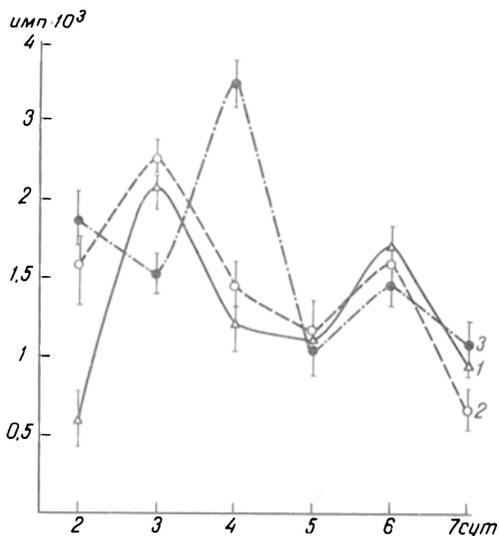


Рис. 3. Интенсивность включения ^3H -тимидина (в имп/мин на 1 мг ДНК) в ядерную ДНК грануляционной ткани в процессе заживления ран.

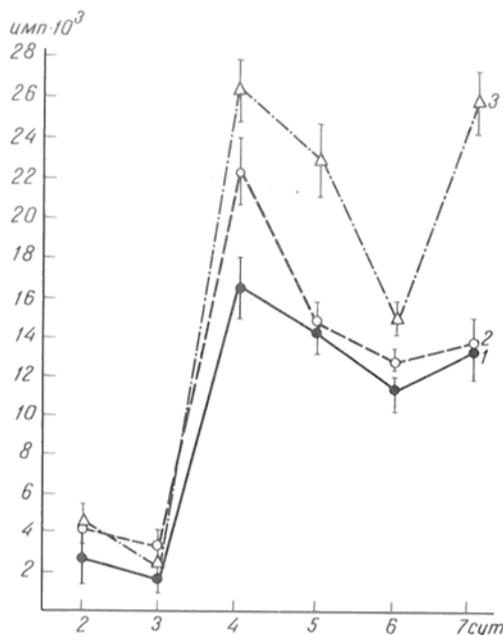


Рис. 4. Интенсивность включения ^{14}C -оротата в ядерную РНК грануляционной ткани в процессе заживления ран (в имп/мин на 1 мг РНК).

прохождения цикла клеточного развития и способствовало их синхронизации в новом ритме синтеза ДНК.

Кривые, представленные на рис. 4, отражают изменения интенсивности включения ^{14}C -оротата в ядерную РНК. В условиях покрытия ран мазями скорость синтеза РНК возрастает в 1,5—2 раза, указывая на повышение биосинтетической активности клеток, особенно в присутствии 4-метилурацила. Гистохимически это подтверждается при реакции Браше более выраженной интенсивностью пиреоинофилии цитоплазмы и ядрышек фибробластов (что свидетельствует о повышенном содержании РНК) в грануляционной ткани животных 3-й группы по сравнению с 1-й (контрольной). В межклеточном веществе вблизи фибробластов увеличивается содержание кислых гликозаминогликанов и коллагена, что также свидетельствует об усилении биосинтеза этих веществ фибробластами.

Таким образом, по результатам исследования раневое покрытие с 4-метилурацилом оказывает противовоспалительное действие и снижает накопление лейкоцитов в ране, способствует протеканию репликативных процессов в более ранние сроки. В этих условиях усиливается транскрипционная активность генома фибробластов, что ведет к более активной пролиферации клеток, а в последующем и к усилению их биосинтетической активности.

ЛИТЕРАТУРА

1. Билич Г. Л., Колла В. Э. // Фармакологическая регуляция регенераторных процессов.— Йошкар-Ола, 1979.— С. 3—19.
2. Гладиллин К. Д., Рачинский С. Э. // Успехи биол. химии.— 1979.— Т. 20.— С. 229—256.
3. Дудникова Г. Н. // Бюл. экспер. биол.— 1979.— № 8.— С. 204—207.
4. Машковский М. Д. Лекарственные средства.— М., 1986.— Т. 2.— С. 138—139.
5. Орехов О. О. // Актуальные вопросы эксперименталь-

ного моделирования патологических процессов и методов их лечения.— М., 1979.— С. 41—44.

6. Попова О. И. Влияние 6-метилурацила на обмен свободных нуклеотидов в нормальной и регенерирующей печени крыс: Автореф. дис. ... канд. биол. наук.— М., 1980.
7. Ревич Т. Т., Попова О. И., Савина М. И. // Фармакологическая регуляция регенераторных процессов в эксперименте и клинике.— Горький, 1978.— С. 126—131.
8. Силаева С. А., Хацернова Б. Я., Берченко Г. Н. и др. // Вопр. мед. химии.— 1986.— № 3.— С. 126—131.
9. Слуцкий Л. И. Биохимия нормальной и патологически измененной соединительной ткани.— Л., 1969.
10. Современные методы в биохимии / Под ред. В. Н. Ореховича.— М., 1977.— С. 313—316.
11. Чернов В. Н. // Фармакологическая регуляция регенераторных процессов.— Йошкар-Ола, 1979.— С. 28—30.
12. Яковлев Н. Н. // Применение пиримидиновых и пуриновых производных в хирургии и смежных областях медицины.— Ростов-н/Д, 1970.— С. 34—40.

Поступила 05.07.88

SYNTHESIS OF NUCLEIC ACIDS AND DYNAMICS OF MORPHOLOGICAL PATTERNS IN GRANULATION TISSUE OF RAT SKIN WOUNDS TREATED WITH 4-METHYLURACIL

S. A. Silaeva, B. Ya. Khatsernova, V. A. Golenchenko, G. N. Berchenko, A. Ya. Nikolaev, A. B. Shekhter

I. M. Sechenov I Medical School, Moscow

Effect of 4-methyl uracil on dynamics of morphological patterns and the rate of nucleic acids synthesis was studied in granulation tissue developed during healing of full-layer skin wounds. Application of ointment containing 4-methyl uracil onto the wounds exhibited an antiinflammatory efficiency and decreased accumulation of leukocytes in the wound. The drug shortened the mitotic cycle in dividing fibroblasts, as a result of which periods of DNA synthesis became more frequent exhibiting two days duration. The rate of RNA synthesis was increased 1.5-2-fold. Content of acid glycosaminoglycans and collagen was increased in intercellular space surrounding fibroblasts.

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 1990

УДК 616.12-008.331.1-02:616.61]-092.9-07:[616.127-008.931:577.152.633]

Л. П. Солтицкая, Н. В. Балашов, В. В. Солтицкий

СВОЙСТВА АДЕНИЛАТЦИКЛАЗНОЙ СИСТЕМЫ МЫШЦ СЕРДЦА И АОРТЫ У КРЫС С ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЙ ПОЧЕЧНОЙ ГИПЕРТОНИЕЙ

Институт эволюционной физиологии и биохимии им. И. М. Сеченова АН СССР, Ленинград

Гормоночувствительная аденилатциклазная система (АЦС) является одним из биохимических механизмов, регулирующих функции сердечной мышцы и гладких мышц сосудов. По современным представлениям, АЦС локализована в плазматической мембране клетки-мишени и состоит по крайней мере из 3 самостоятельных функциональных блоков. Это рецептор, фермент аденилатциклаза (АЦ) и регуляторный компонент, представленный гуанилнуклеотидсвязывающими белками (N-белками). При этом N_s -белки реализуют стимулирующее действие гормонов, а N_i -белки — ингибиторные влияния на АЦ [1].

Анализ литературы, посвященной изучению функционального состояния АЦС в мембранах клеток органов кровообращения крыс при гипертензивных состояниях различного происхождения,

свидетельствует о нарушении функции этой системы. Различия имеются лишь по степени поражения функций отдельных ее компонентов.

У спонтанно-гипертензивных крыс, у крыс с почечной и дезоксикортизолсолевой гипертензией уменьшается число β -адренорецепторов в мембранах сердца [12, 16, 19] и в гладких мышцах сосудов [13, 20] без изменения их сродства к лигандам. Уменьшение числа связывающих мест объясняют увеличением уровня катехоламинов в плазме крови при данной патологии, т. е. феноменом даун-регуляции. Вместе с тем есть работа, в которой показано, что у спонтанно-гипертензивных крыс нет отличий в количестве рецепторов при определении их с помощью меченого антагониста [^3H] — ДГА [8].

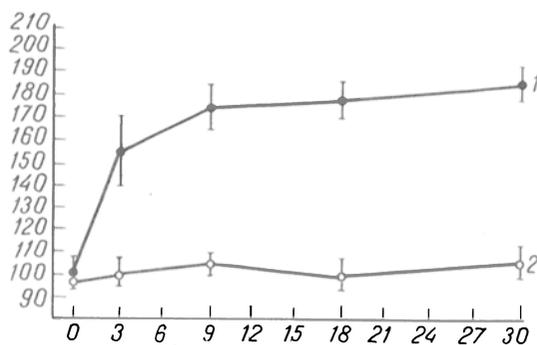
Уменьшение изопротеренолстимулируемой аденилатциклазной активности показано для фракции мембран сердца крыс со спонтанной гипертензией [7, 8, 15, 17], дезоксикортизол-солевой и почечной гипертензией (ренин-ангиотензиновой) [17]. При этом стимулирующее действие на АЦ гуаиноновых нуклеотидов в NaF, которое опосредуется через N-белки, не отличалось от такового у контрольных животных. Однако другие авторы нашли понижение чувствительности фермента как к изопротерену, так и к NaF у спонтанно-гипертензивных крыс [9]. С этим согласуются результаты исследования, проведенного на крысах с почечной гипертензией (ренин-ангиотензиновая модель с наложением лигатуры на аорте между почечными артериями) [6]. Были установлены снижение чувствительности фермента к катехоламинам, отсутствие чувствительности к дофамину и снижение стимулирующих эффектов NaF и форсколина, что свидетельствует о множестве дефектов АЦС при данной патологии.

В мышцах сосудов у спонтанно-гипертензивных крыс и стресс-гипертензивных крыс чувствительность АЦ к изопротерену уменьшена [18] или отсутствует [5]. При этом, по данным одних авторов, эффект на NaF отсутствует [5], другие же исследователи установили его увеличение у спонтанно-гипертензивных животных [18]. Исследований, выполненных на тканях крыс с другими формами гипертензии, мы в литературе не нашли.

Задача настоящей работы состояла в том, чтобы изучить функциональное состояние АЦС одновременно в мышцах сердца и аорты у крыс с реноваскулярной гипертензией, являющейся следствием билатеральной конструкции почечных артерий. Эта модель — лабораторный аналог реноваскулярной гипертензии, которой по оценкам специалистов страдает до 5 % гипертонических больных.

Методика

Работу проводили на трехмесячных самцах крыс линии Вистар. Экспериментальную гипертензию вызывали методом Гольдблата [10]. В возрасте 2 мес крысам на обе почечные артерии накладывали зажимы диаметром 0,2 мм, что соответствует пережатию артерий на 40–60 % по сравнению с нормой. Такое сужение дает максимальное повышение артериального давления [14]. Давление в хвостовой артерии контролировали с помощью реоплетизмографа и манжетки. Чтобы избежать стрессорного изменения давления, крыс некоторое время до начала эксперимента приучали к манжетке и измерительной камере, ограничивающей их движения. В эксперимент брали крыс, у которых давление через 1 мес после операции было стабильно и превышало 160 мм рт. ст., что на 60–70 %



Изменение артериального давления у крыс после билатеральной ишемии почечных артерий.

По оси абсцисс — время после операции, дни; по оси ординат — артериальное давление в хвостовой артерии, мм рт. ст. 1 — гипертензивные крысы; 2 — нормотензивные контрольные крысы.

больше, чем до операции. В качестве контроля использовали крыс линии Вистар того же пола и возраста, что и подопытные. Животных декапитировали. Исследовано было 3 группы крыс с экспериментальной почечной гипертензией. В каждой группе было 5–6 оперированных крыс и столько же контрольных.

Сарколемму сердца выделяли по известному методу [11] с некоторыми изменениями. Желудочки сердца от 5–6 крыс промывали, измельчали и гомогенизировали при помощи гомогенизатора типа «Полиtron» в буфере, содержащем 10 мМ имидазола pH 7,5, 1 мМ ЭДТА, 1 мМ MgCl_2 и 0,25 М сахарозы. Гомогенат фильтровали, насливали на 0,8 М сахарозу и центрифугировали 60 мин при 100000 g. Слой сарколеммы, снятый на границе 0,25 и 0,8 М сахарозы, разводили буфером без сахарозы и осаждали повторным центрифугированием при указанном режиме. Осадок суспендировали в трис-HCl pH 7,5, и фракцию использовали в день получения.

Сосуды (аорта) замораживали в жидком азоте и измельчали в фарфоровой ступке при постоянном добавлении азота. Полученный порошок быстро переносили в стеклянный гомогенизатор и гомогенизировали в 10 мМ трис-HCl с 1 мМ ЭДТА и 1 мМ дитиотрептола pH 7,5. Гомогенат фильтровали и добавляли в пробу в количестве 80–100 мкг белка.

Активность АЦ определяли по методу Ткачука и Балденкова [3], используя в качестве меченого субстрата [^3H]-АТФ [2], и выражали в пикомолях цАМФ в 1 мин на 1 мкг белка фракции сердца или гомогената аорты. Все определения активности АЦ проводили в 4 параллельных пробах.

Результаты и обсуждение

На рисунке показана динамика роста давления у крыс с ишемизированными почечными артериями. Давление в 1-ю неделю повышалось, а затем стабилизировалось в течение 1 мес, что согласуется с результатами других исследователей [10] и свидетельствует об адекватности модели.

Результаты определения базальной активности АЦ сердечной мышцы и аорты гипертонических и контрольных крыс представлены в табл. 1. В проведенных 3 сериях опытов активность фермента в сердце гипертонических крыс в 2 случаях была ниже по сравнению с контролем, а в 1 серии это уменьшение было слабо выражено. Активность АЦ в аорте больных крыс была ниже по сравнению с контролем только в 1 серии, а в 2 последующих

Таблица 1

Базальная активность аденилатциклазы в сердце и аорте крыс, нмоль цАМФ/мин на 1 мкг белка

Серия опытов	Сердце		Аорта	
	контроль	опыт	контроль	опыт
I	27,1	14,5	18,9	10,5
II	8,7	7,1	5,5	4,3
III	28,6	9,5	33,3	33,6

Таблица 2

Влияние NaF (10 мМ) на активность аденилатциклазы сердца и аорты крыс, % к базальной активности

Серия опытов	Сердце		Аорта	
	контроль	опыт	контроль	опыт
I	183	76	144	72
II	1406	703	295	170
III	1126	993	1061	855

разницы не было. Таким образом, изменения в функциональной активности каталитической субъединицы АЦС в нашем исследовании не были устойчивыми и касались в большей степени ткани сердца.

Для оценки состояния регуляторного компонента АЦС (N-белка) в качестве функционального зонда мы использовали активирующее действие на фермент фтористого натрия. Полученные результаты (табл. 2) показывают, что как в сердце, так и в аорте имеют место идентичные изменения в функциональном состоянии N-белков тканей крыс с гипертонией, которые приводят к уменьшению чувствительности фермента к NaF. Это согласуется с результатами, полученными на сердце [9] и аорте [5] спонтанно-гипертензивных крыс и на сердце крыс с почечной ренин-ангиотензиновой гипертонией [6]. Таким образом, нарушение функции N-белков является, вероятно, общей чертой в патогенезе гипертонии.

Для характеристики функционального состояния всей АЦС, т. е. для оценки способности каталитического компонента сопрягаться с адренергическими рецепторами мы использовали сочетанное действие изопротеренола и гуанозинтрифосфата (ГТФ). Напомним, что для α -рецепторов характерен следующий ряд эффективности гормонов: норадреналин > адреналин > изопротеренон, а для β -рецепторов: изопротеренон > адреналин > норадреналин. Катехоламины стимулируют АЦ через β -адренергические рецепторы, а через α -рецепторы ингибируют фермент.

Из результатов, представленных в табл. 3, видно, что в контрольных группах крыс изопротеренон в сочетании с ГТФ во всех случаях оказывает стимулирующее влияние на АЦ сердечных мембран. Этот стимулирующий эффект в мембранах сердца гипертензивных крыс исчезает (I и II серии опытов) или изменяется на ингибирующий (III серия).

При определении гормонстимулируемой активности АЦ аорты мы не получали воспроизводимых результатов в контрольной группе животных (см.

Таблица 3

Сочетанное действие изопротеренола (10^{-5} М) и гуанозинтрифосфата (10^{-5} М) на активность аденилатциклазы сердца и аорты крыс, % активирования (+) или ингибирования (—) относительно базальной активности

Серия опытов	Сердце		Аорта	
	контроль	опыт	контроль	опыт
I	+26	Нет эффекта	+120	—37
II	+106	» »	Нет эффекта	Нет эффекта
III	+66	—28	+31	+12

табл. 3). С этим столкнулись и другие авторы [20] при определении изопротеренол-стимулируемой АЦ в гладких мышцах сосудов спонтанно-гипертензивных крыс и у крыс контрольной линии. В связи с этим при обсуждении результатов по влиянию гормона на активность фермента ограничимся исследованиями, выполненными на ткани сердца.

Отсутствие активирующего влияния изопротеренола в сочетании с гуаниловым нуклеотидом на активность АЦ в мембранах сердца крыс с гипертонией подтверждает наше предположение о дефекте на уровне, представленном N-белками, и позволяет также думать о возможных изменениях в функциональном состоянии рецепторов. Потерю чувствительности системы к гормонам наблюдали и другие исследователи при ренин-ангиотензиновой гипертонии [6], у спонтанно-гипертензивных и стресс-гипертензивных крыс [5].

Появление ингибирующего действия изопротеренола на активность АЦ (инверсия гормонального эффекта в сердце гипертензивных крыс (III серия) можно объяснить тем, что в связи с возможным уменьшением числа β -адренорецепторов может преобладать α -адренергический компонент в реакции ткани на катехоламины. Ранее для сердца крыс методом радиолигандного связывания показаны реципрокные отношения между этими типами рецепторов [2]. Гипотеза о преобладании α -адренергического эффекта в условиях изучаемой нами сердечно-сосудистой патологии требует дальнейшего экспериментального подтверждения. Однако не исключено, что ингибирующий эффект изопротеренола осуществляется в тканях гипертензивных животных через β -рецепторы за счет их взаимодействия с N_1 -белком. Принципиальная возможность такого взаимодействия показана [17].

Таким образом, при реноваскулярной почечной гипертонии нарушаются молекулярные взаимодействия между адренорецепторами, N-белками и каталитической субъединицей АЦС в миокарде и нарушаются функции регуляторного компонента (N-белка) в АЦС гладких мышц аорты.

ЛИТЕРАТУРА

1. Воейков В. Л. Сопряжение рецепторов гормонов и нейромедиаторов с аденилатциклазой.— М., 1984.
2. Перцева М. Н., Солтыцкая Л. П. // Укр. биохим. журн.— 1987.— Т. 59, № 4.— С. 14—20.
3. Ткачук В. А., Балденков Г. Н. // Биохимия.— 1978.— Т. 43, № 6.— С. 1097.
4. Abramson S. N., Shorr R. J. L., Molinoff P. B. // Biochem. Pharmacol.— 1987.— Vol. 36, N 14.— P. 226—269.
5. Amer M. S. // Science.— 1973.— Vol. 179.— P. 807—809.
6. Anand-Srivastava M. B., Cantin M., Genest J. // Biochem. Pharmacol.— 1983.— Vol. 32, N 19.— P. 2857—2862.
7. Bhalla R. C., Ashley T. // Biochem. Pharmacol.— 1978.— Vol. 27, N 15.— P. 1967—1971.
8. Bhalla R. C., Sharma R. V., Ramanathan S. // Biochim. biophys. Acta.— 1980.— Vol. 632, N 3.— P. 497—506.
9. Chin T. H. // Pharmacology.— 1981.— Vol. 22, N 3.— P. 183—188.
10. Goldblatt H. // Ann. intern. Med.— 1937.— Vol. 11, N 1.— P. 63—103.
11. Kidwai A. M., Radcliffe N. A., Duchon G., Daniel E. E. // Biochem. biophys. Res. Commun.— 1971.— Vol. 45, N 4.— P. 901—910.
12. Limas C., Limas C. J. // Biochem. biophys. Res. Commun.— 1978.— Vol. 83, N 2.— P. 710—714.
13. Limas C. J., Limas C. // Biochim. biophys. Acta.— 1979.— Vol. 582, N 3.— P. 533—536.

14. Murphy W. R., Coleman T. G., Smith T. L., Stanek K. A. // Hypertension.— 1984.— Vol. 6, N 1.— P. 68—74.
15. Palmer G. C., Greenberg S. // Pharmacology.— 1979.— Vol. 19, N 1.— P. 156—162.
16. Robberecht P., Winan J., Chatelet P. // Biochem. Pharmacol.— 1981.— Vol. 30, N 4.— P. 385—387.
17. Sharma V. K., Banerjee S. P. // J. biol. Chem.— 1978.— Vol. 253, N 15.— P. 5277—5279.
18. Triner L., Vulliamor Y., Verosky M., Manger W. M. // Biochem. Pharmacol.— 1975.— Vol. 24, N 6.— P. 743—745.
19. Woodcock K. A., Funder J. W., Johnston C. I. // Circulat. Res.— 1979.— Vol. 45, N 4.— P. 560—565.
20. Woodcock E. A., Olsson C. A., Johnston C. I. // Biochem. Pharmacol.— 1980.— Vol. 29, N 11.— P. 1465—1468.

Поступила 13.08.88

PROPERTIES OF THE ADENYLATE CYCLASE SYSTEM IN HEART MUSCLE AND AORTA OF RATS WITH EXPERIMENTAL KIDNEY HYPERTENSION

L. P. Sollitskaya, N. V. Balashov, V. V. Sollitsky

I. M. Sechenov Institute of Evolutional Physiology and Biochemistry, Academy of Sciences of the USSR, Leningrad

Properties of the adenylate cyclase system were simultaneously studied in heart and aorta of rats with renovascular hypertension. Under conditions of the pathology molecular interactions between adrenoreceptors, regulating proteins (N-proteins) and catalytic subunit of the adenylate cyclase system were deteriorated in rat myocardium as well as functions of the regulating component were impaired in the adenylate cyclase system of aorta smooth muscles.

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 1990

УДК 616.438-008.931:577.152.11-02:[615.31:547.857.3]-092.9

Л. А. Кожемякин, Е. П. Шелепина, В. Г. Антонов

КСАНТИНОКСИДАЗНАЯ АКТИВНОСТЬ ТИМОЦИТОВ ПРИ ЛИМФОЦИТОЛИТИЧЕСКОМ ДЕЙСТВИИ ГИПОКСАНТИНА

Военно-медицинская академия им. С. М. Кирова, Ленинград

Нарушение пуринового обмена в пострадиационном периоде является одним из ранних и характерных процессов в лимфоидной ткани. Феномен повышенного образования гипоксантина за счет ступенчатой деградации АТФ по схеме АТФ→АДФ→АМФ→аденозин→гипоксантин по времени соответствует началу максимального накопления полидезоксирибонуклеотидов (ПДН) в тимоцитах [8]. Показано, что инкубация необлученных тимоцитов в среде с гипоксантином сопровождается образованием ПДН и интерфазной гибелью клеток, т. е. механизм межнуклеосомной фрагментации хроматина в случае избытка в среде гипоксантина сопоставим с механизмом фрагментации его при рентгеновском облучении. Причем среди группы исследованных пуриновых соединений лимфоцитолитическое действие специфически проявлял только гипоксантин [7]. В случае рентгеновского облучения и в случае избытка в среде гипоксантина фрагментация хроматина существенно тормозилась при использовании ингибиторов синтеза белка [7]. Протекторное действие на хроматин ингибиторов синтеза белка свидетельствует о ферментативном характере этих процессов. Учитывая, что гипоксантин является высокоспецифическим субстратом ксантиноксидазы (КФ 1.2.3.2),

важно установить содержание биохимических событий, объединяющих лимфоцитолитические эффекты гипоксантина и радиации.

Целью настоящей работы явилось изучение ксантиноксидазной активности тимоцитов при их интерфазной гибели под влиянием гипоксантина и выяснение того, насколько процесс деградации хроматина может быть связан с реакциями, катализируемыми данной ферментной системой. Это тем более важно, поскольку ксантиноксидаза — ведущий прооксидантный фермент, активность которого при утилизации клеткой молекулярного кислорода сопровождается наработкой супероксидного радикала и повышением интенсивности процессов перекисного окисления липидов (ПОЛ). Данные о роли активных форм кислорода в повреждении ДНК представлены в литературе [1, 9, 14], однако гораздо менее конкретны сведения о роли прооксидантных ферментных систем в механизмах интерфазной гибели клеток.

Методика

В работе использовали белых беспородных крыс-самцов массой 160—180 г. Животных умерщвляли декапитацией. Тимоциты получали выдавливанием их на холоде из тимуса в слабо притертом гомогенизаторе в среду 199. Концентрация клеток в суспензии составляла $(2-5) \cdot 10^7$ в 1 мл. Суспензию тимоцитов инкубировали при 37 °С в течение 7,5 ч, контролируя количество жизнеспособных клеток окрашиванием эозином. После инкубации клетки собирали центрифугированием (800 g, 10 мин), трижды отмывали от инкубационной среды 0,25 М раствором сахарозы на 0,05 М трис-НСI-буфере рН 7,4, содержащем 3 мМ СаCl₂, разрушали гомогенизацией и в гомогенатах или в очищенной ядерной фракции определяли активность ксантиноксидазы и уровень продуктов ПОЛ. Ядра получали дифференциальным центрифугированием, чистоту фракций контролировали под микроскопом. Активность ксантиноксидазы определяли спектрофотометрически по образованию формазана при восстановлении нитросинего тетразолия в присутствии ксантина в качестве субстрата [11] и электрофоретически [15].

Интенсивность ПОЛ оценивали по уровню накопления диеновых конъюгатов (ДК) и малонового диальдегида (МДА) [6, 7]. При определении ДК концентрация белка в пробах составляла 10—15 мг, гептановую фазу для спектрофотометрирования разбавляли этанолом в соотношении 1:1.

Деградацию хроматина оценивали по выходу ПДН, которые получали из ядер инкубированных тимоцитов экстракцией 0,7 мМ раствором ЭДТА рН 7,4 [3]. Электрофорез ПДН проводили в 1,7 % агарозе. Гели окрашивали бромистым этидием и после возбуждения флюоресценции УФ-лучами фотографировали¹.

Результаты и обсуждение

Для выяснения роли ксантиноксидазы в механизмах интерфазной гибели тимоцитов в случае избытка гипоксантина исходную суспензию тимоцитов делили на 3 равные части. Одну часть тимоцитов инкубировали в среде 199 с добавлением гипоксантина (конечная концентрация $5 \cdot 10^{-3}$ М), другую — с добавлением гипоксантина совместно с аллопуринолом (конечная концентрация последнего $1 \cdot 10^{-3}$ М). Контролем служили тимоциты, инкубированные только в среде 199. Спустя 7,5 ч инкубации в каждой серии оценивали гибель клеток. Результаты этих опытов представлены на рис. 1. Инкуба-

¹ Авторы выражают благодарность А. С. Белохвостову за окраску и фотографию этих гелей.

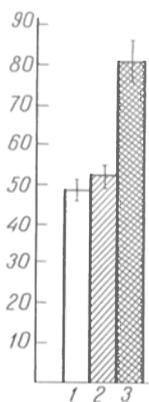


Рис. 1. Влияние гипоксантина и аллопуринола на жизнеспособность тимоцитов.

По оси ординат — количество погибших клеток (в %). 1 — контроль; 2 — гипоксантин ($5 \cdot 10^{-3}$ М) и аллопуринол ($1 \cdot 10^{-3}$ М); 3 — гипоксантин ($5 \cdot 10^{-3}$ М).

ция тимоцитов в среде гипоксантина увеличивала гибель клеток по сравнению с контролем в среднем на 34 %, что совпадает с ранее полученными результатами [7]. Однако гибель клеток при инкубации в присутствии аллопуринола достоверно снижалась и составляла 12 % по сравнению с контролем. При этом эффект гибели зависел от времени добавления аллопуринола. Так, если аллопуринол вносили в среду через 30 мин после инкубации клеток с гипоксантином и продолжали инкубацию еще в течение 3,5 ч, гибель тимоцитов составляла всего 7 % и не отличалась от контроля. Если же аллопуринол вносили спустя 2 ч преинкубации с гипоксантином, гибель клеток возрастала и составляла 27 % (табл. 1).

Таким образом, гибель клеток в среде с гипоксантином существенно снижалась добавлением аллопуринола (4-гидроксипиразоло-3,4-d-пиримидин) — соединения, известного как структурный аналог гипоксантина и являющегося эффективным и селективным ингибитором ксантиноксидазы [10, 12].

Дальнейшим этапом работы явилось исследование активности ксантиноксидазы в тимоцитах при инкубации с гипоксантином и аллопуринолом.

Как следует из полученных результатов, активность ксантиноксидазы резко возрастала в тимоцитах при добавлении гипоксантина без аллопуринола. При наличии в среде аллопуринола активность фермента существенно снижалась, хотя и оставалась несколько выше контрольных значений (табл. 2).

Наличие ксантиноксидазной активности в гомо-

Активность ксантиноксидазы и показатели интенсивности процессов ПОЛ в гомогенатах тимоцитов при инкубации с гипоксантином и аллопуринолом

Условия инкубации	Активность ксантиноксидазы, мкмоль на 1 г белка	Содержание ДК, нмоль на 1 мг белка	Содержание МДА, нмоль на 1 мг белка
Контроль	$2,17 \pm 0,41$	$0,79 \pm 0,09$	$9,22 \pm 0,18$
Гипоксантин	$4,31 \pm 0,85$	$2,66 \pm 0,17$	$18,70 \pm 0,23$
Гипоксантин + аллопуринол	$2,43 \pm 0,67$	$1,19 \pm 0,37$	$13,90 \pm 0,20$

Примечание. Время инкубации 7,5 ч.

генатах тимоцитов, а также аналогичная направленность изменений ее активности в разных сериях опытов были подтверждены электрофоретическими исследованиями. Электрофорез белков тимоцитов в 5 % ПААГ с последующим специфическим окрашиванием ксантиноксидазы выявил белковую полосу, обладающую ксантиноксидазной активностью, интенсивность которой была максимальна в клетках, инкубированных с гипоксантином, и значительно снижена в случае добавления аллопуринола. Электрофореграммы опытов представлены на рис. 2. Ксантиноксидазная активность обнаруживалась также на электрофореграммах белков, полученных из очищенных ядер тимоцитов, причем направленность изменений ее активности в ядрах полностью соответствовала таковой в гомогенатах. Факт наличия ксантиноксидазной активности в ядрах клеток отмечен в литературе [18]. Известно, что в хроматиновом комплексе содержится ионизированное железо, поэтому любая активация прооксидантного фермента может запускать мощный механизм генерации гидроксильного радикала и существенно усиливать токсическое действие продуктов избыточной пероксидации на хроматин и белки ядерного матрикса.

Косвенным доказательством изменений активности ксантиноксидазы может быть и изменение уровня свободнорадикального окисления. Как видно, содержание ДК и МДА хорошо коррели-

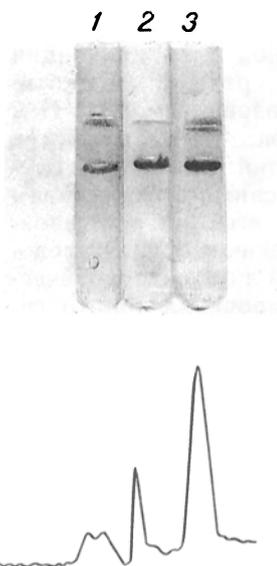


Рис. 2. Электрофоретическая характеристика активности ксантиноксидазы в гомогенатах тимоцитов, инкубированных в разных средах.

1, 2 и 3 — то же, что на рис. 1.

Таблица 1

Жизнеспособность тимоцитов при инкубации с гипоксантином и последующем добавлении аллопуринола

Условия инкубации	Общее время инкубации, ч	Время преинкубации с гипоксантином, ч	Время инкубации гипоксантином и аллопуринолом, ч	Количество погибших клеток, %
Контроль	4	0	0	$7,0 \pm 0,8$
Гипоксантин	4	4	0	$33,1 \pm 2,8$
Гипоксантин + аллопуринол	4	0,5	3,5	$7,2 \pm 1,3$
То же	4	1,0	3,0	$11,5 \pm 1,6$
» »	4	2,0	2,0	$27,1 \pm 1,9$

Примечание: Концентрации те же, что на рис. 1.

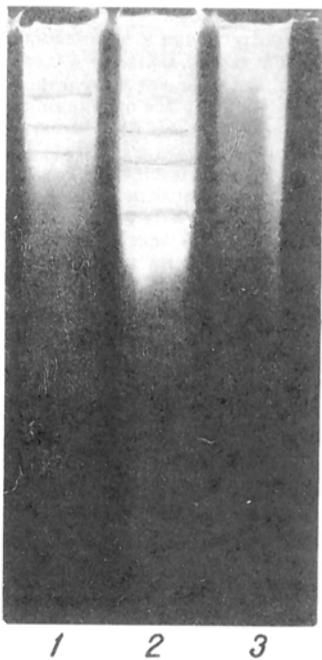


Рис. 3. Электрофоретическое разделение ПДН, экстрагированных из ядер тимоцитов при инкубации тимоцитов в разных средах.

1 — гипоксантин и аллопуринол; 2 — гипоксантин; 3 — контроль.

рует с обнаруженными изменениями активности ксантиноксидазы (см. табл. 2).

Для выяснения связи активности ксантиноксидазы с процессами деградации хроматина было проведено исследование ПДН, экстрагируемых из ядер клеток в каждой серии опытов, параллельно с изучением динамики этого фермента. Полученные электрофореграммы ПДН представлены на рис. 3. Видно, что степень деградации хроматина, определяемая по электрофорезу ПДН, экстрагированных 0,7 мМ раствором ЭДТА, резко увеличенная в клетках, инкубированных с гипоксантином, значительно снижается в среде гипоксантина и аллопуринола. Таким образом, наблюдается негативная кооперативная зависимость между эффектом селективного ингибирования ксантиноксидазы и степенью деградации хроматина. Полученные данные свидетельствуют о том, что процесс фрагментации хроматина в случае избытка гипоксантина в среде может быть связан с модификацией активности ксантиноксидазы: инициация фермента избытком субстрата усиливает процессы деградации хроматина, в то время как специфическое ингибирование фермента значительно ослабляет этот процесс.

Ксантиноксидаза *in vivo* в тканях млекопитающих существует предпочтительно в виде НАД⁺-зависимой дегидрогеназы (D-форма), которая при определенных условиях может быть переведена в кислородзависимую оксидазу (O-форма). Именно появление этой формы ксантиноксидазы приводит к увеличению продукции супероксидных радикалов с последующим появлением в среде более сильных прооксидантных факторов — гидроксильных радикалов, обуславливающих формирование избыточной интенсивности реакций ПОЛ [13, 16].

В целом представленные результаты дают основание связать возможность модификации хроматина продуктами ПОЛ с нарушением регуляции трансформационных переходов прооксидантной и дегидрогеназной форм ферментного комплекса ксантиноксидазы. В свою очередь именно гипоксантин, вероятно, стимулирует возможность пре-

имущественной активации O-формы ксантиноксидазы, что, возможно, и является одним из общих механизмов формирования интерфазной гибели тимоцитов в условиях экстремальных воздействий и избыточной концентрации ключевого метаболита пуринового обмена.

Кроме того, упорядоченная фрагментация хроматина с образованием ПДН — это ферментативный процесс, протекающий с участием ферментов группы нуклеаз [2, 5]. Тот факт, что процесс фрагментации хроматина может быть усилен или ослаблен изменением активности ксантиноксидазы, позволяет высказать предположение о связи этого фермента с ферментами метаболизма генома, которые обеспечивают реализацию программы клеточной гибели (или перестройку систем, определяющих стабильность генома). Это предположение кажется еще более вероятным, если учесть сложную систему регуляции этих ферментов в клетке, в частности эндонуклеаз, лабильными эндогенными белковыми ингибиторами, чрезвычайно чувствительными к активным формам кислорода и продуктам свободнорадикального окисления [4].

ЛИТЕРАТУРА

1. Виленчик М. И. Нестабильность ДНК и отдаленные последствия воздействия излучений. — М., 1987.
2. Звонарева Н. Б., Животовский Б. Д., Хансон К. П. // Радиобиология. — 1982. — Т. 22, № 5. — С. 579—584.
3. Иванчик Б. П., Синькова Р. В., Конов А. В. и др. // Там же. — 1986. — Т. 26, № 2. — С. 162—166.
4. Керова Н. Н., Пухова Г. Г., Чеботарев Е. Е. Естественные ингибиторы нуклеаз. — Киев., 1974.
5. Никонова Л. В., Нелипович Н. А., Уманский С. Р. // Радиобиология. — 1982. Т. 22, № 4. — С. 441—445.
6. Стальная И. Д. // Современные методы в биохимии. — М., 1977. — С. 63—64.
7. Требенюк Э. А., Солдатенко В. А., Сорокина Н. И. и др. // Радиобиология. — 1985. — Т. 25, № 4. — С. 521—524.
8. Хансон К. П., Комар В. Е. Биохимические аспекты действия ионизирующей радиации на живой организм. — Л., 1977. — Вып. 2.
9. Brawn K., Fridovich J. // Arch. Biochem. — 1981. — Vol. 206, N 2. — P. 414—419.
10. Elion G. B., Kovenski A., Hitchings G. H. et al. // Biochem. Pharmacol. — 1966. — Vol. 15, N 6. — P. 863—880.
11. Fried R. // Analyt. Biochem. — 1966. — Vol. 16, N 4. — P. 427—432.
12. Hille R., Massey V. // Pharmacol. Ther. — 1981. — Vol. 14, N 1. — P. 249—263.
13. Parks D. A., Granger D. N. // Amer. J. Physiol. — 1983. — Vol. 245. — P. G285—G289.
14. Rowley D. A., Hallivel B. // Biochim. biophys. Acta. — 1983. — Vol. 761, N 1. — P. 86—93.
15. Show C. R., Prasad R. // Biochem. Genet. — 1970. — Vol. 4. — P. 297—320.
16. Stirpe F., Della Corte E. // J. biol. Chem. — 1969. — Vol. 244. — P. 3855—3863.
17. Uchiyama M., Michara M. // Analyt. Biochem. — 1978. — Vol. 83, N 1. — P. 271—278.
18. Yasuda K., Suzuki T., Takano K. // Acta histochem. cytochem. — 1968. — Vol. 1, N 1. — P. 265.

Поступила 25.05.89

THE XANTHINE OXIDASE ACTIVITY OF THYMOCYTES AND LYMPHOCYTOLYTIC EFFECT OF HYPOXANTHINE

L. A. Kozhemyakin, E. P. Shelepina, V. G. Antonov
S. M. Kirov Military-Medical Academy, Leningrad

Destruction of thymocytes, caused by incubation with hypoxanthine, was decreased distinctly after addition of allopurinol as shown by eosin staining. Lymphocytolytic effect of hypoxanthine was accompanied by considerable activation in thymocytes of endogenous xanthine oxidase, which was measured by

superoxide anion production; allopurinol decreased the enzyme activity. Enzymatic activity of nucleases participating in degradation of chromatin appears to be a component of prooxidant enzymatic systems of cell.

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 1990

УДК 616.5-007.281-07: [616.5+616.712.1-018.3]-008.939.629-07

Б. П. Соколов, Б. М. Шер, Е. А. Козлов, Т. А. Цветкова, С. С. Рудаков, А. А. Дельвиг, В. Н. Калинин

СТРУКТУРНЫЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ КОЛЛАГЕНОВ КОЖИ И РЕБЕРНОГО ХРЯЩА БОЛЬНЫХ С СИНДРОМОМ ЭЛЕРСА — ДАНЛО II ТИПА

Институт медицинской генетики АМН СССР, Институт медицинской энзимологии АМН СССР, Москва

Синдром Элерса — Данло (СЭД) — группа наследственных заболеваний соединительной ткани, характеризующаяся гиперподвижностью суставов с частыми вывихами, повышенной растяжимостью кожи с развитием атрофичных рубцов, повышенной ломкостью кровеносных сосудов, склонностью к кровотечениям; диафрагмальными, паховыми и пупочными грыжами, деформациями грудной клетки [1, 2]. Выделяют II типов СЭД, различающихся по клинико-генетическим характеристикам [1, 2]. При некоторых формах СЭД выявлен первичный биохимический дефект. СЭД IV типа связан со снижением содержания в тканях коллагена III типа, обусловленным нарушением синтеза, секреции или стабильности коллагена III типа [4, 13, 16]. При СЭД VII типа описано нарушение отщепления N-пропептида в молекулах проколлагена I типа, которое является результатом либо снижения активности N-протеиназы [11], либо мутаций в участке отщепления N-пропептидов [7, 8, 15]. При СЭД VI типа выявлен дефицит лизилгидроксилазы [12], при СЭД IX типа дефицит лизиоксидазы [5], при СЭД X типа — дефицит фибронектина [3]. Для наиболее распространенных форм СЭД, а именно: СЭД I, II, III типов, первичный биохимический дефект неизвестен. Однако аутосомно-доминантный тип наследования и преимущественное поражение тканей с преобладанием коллагенов I и III типов позволяют предполагать, что клинические проявления данных типов СЭД обусловлены аномалиями структуры или метаболизма коллагенов I или III типов. Одним из частых клинических проявлений СЭД II типа являются врожденные воронкообразные деформации грудной клетки (ВДГК), что указывает на возможные нарушения в коллагене II типа реберного хряща при данной патологии. В настоящей работе проведено изучение коллагенов I и III типов кожи 6 больных с СЭД II типа, а также анализ коллагенов II типа реберного хряща 4 больных с СЭД II типа, имеющих воронкообразные деформации грудной клетки. Целью работы было выявление первичных или вторичных структурных и метаболических изменений коллагенов при указанных заболеваниях.

Методика

Образцы кожи больных получали при биопсии, образцы реберного хряща — при хирургической коррекции деформации

грудной клетки. В качестве контроля использовали кожу и хрящ 10 детей, погибших от несчастного случая и не имевших признаков поражения соединительной ткани. Больные и дети из контрольной группы принадлежали к одной возрастной группе. Образцы тканей хранили при -20°C . Все операции по выделению коллагенов проводили при 4°C .

Коллагены кожи выделяли по методу В. Sykes и соавт. [17]. Образцы кожи очищали от жира, мелко измельчали, инкубировали в 100 объемах 0,5 М уксусной кислоты в течение суток, гомогенизировали в гомогенизаторе "Virtis", добавляли еще 100 объемов 0,5 М уксусной кислоты и экстрагировали в течение суток. К экстракту добавляли пепсин до конечной концентрации 100 мкг/мл, инкубировали в течение 16 ч и центрифугировали в течение 1 ч при 5000 об/мин. Для осаждения коллагенов к супернатанту добавляли NaCl до конечной концентрации 2 М, осадок отделяли центрифугированием (30 000 g, 1 ч), растворяли в небольшом объеме 0,5 М уксусной кислоты и диализовали против 0,5 М уксусной кислоты до полного удаления NaCl, после чего лиофилизовали.

Выделение коллагена II типа из реберного хряща проводили по методу R. Burgeson и соавт. [6] с небольшими изменениями. Хрящ очищали от надхрящницы, гомогенизировали и промывали 4 М гуанидинхлоридом. Гомогенат хряща экстрагировали раствором пепсина (100 мкг/мл) в 0,5 М уксусной кислоте в течение суток. Экстракт центрифугировали (5000 об/мин, 30 мин), к супернатанту добавляли NaCl до конечной концентрации 2 М для осаждения коллагенов с последующим центрифугированием (30 000 g, 30 мин). Осадок растворяли в небольшом количестве 0,5 М уксусной кислоты и диализовали против 0,5 М уксусной кислоты до полного удаления NaCl, после чего лиофилизовали.

Электрофорез коллагеновых белков проводили в градиентном (5—10 %) полиакриламидном геле (ПААГ) в системе буферов Laemmli [10]. После электрофореза гели окрашивали Кумасси R-250.

Пептидное картирование коллагенов проводили по методу H. Sage [14] с небольшими изменениями. Препараты коллагеновых белков (1 мг) растворяли в 200 мкл раствора бромциана (0,1 мг/мл) в 70 % муравьиной кислоте, выдерживали 3 ч при 37°C , высушивали и подвергали электрофорезу в ПААГ (10—25 %).

Сканирование гелей проводили при длине волны 570 нм, соотношение площадей пиков на электрофореграммах определяли при помощи системы анализа изображений "IBAS-1" ("Opton", ФРГ).

Тотальное соотношение коллагенов III и I типов в экстрактах кожи определяли по формуле, аналогичной предложенной в работе A. Hanson [9].

% коллагена III типа =

$$\frac{A[\alpha 1(III)CB5] \cdot 100\%}{A[\alpha 1(I)CB8] \cdot 1,5 \cdot 0,848 + A[\alpha 1(III)CB5]}$$

где A — площадь пика соответствующего пептида на денситограмме.

Соотношение интактных молекул коллагенов III и I типов, не имеющих сшивок определяли по формуле:

$$\% \text{ коллагена III типа} = \frac{X-Y}{X+1} \times 100\%$$

где $X = \frac{A[\alpha 1(I) + \alpha 1(III)]}{A[\alpha 2(I)]}$ — восстанавливающие условия

электрофореза, $Y = \frac{A[\alpha 1(I)]}{A[\alpha 2(I)]}$ — невосстанавливающие условия электрофореза, A — площадь пика на денситограмме.

Для определения чувствительности к пепсину образцы коллагенов (100 мкг) растворяли на холоду в 100 мкл 0,5 М уксусной кислоты, добавляли 5 мкл раствора пепсина (5 мг/мл, «Serva») и помещали на водяную баню с соответствующей температурой. Через 1 ч после начала инкубации пробирки с образцами помещали в жидкий азот и после замораживания лиофилизовали. Лиофилизованные образцы подвергали электрофорезу в ПААГ.

Общую чувствительность коллагена II типа к пепсину при 37°C оценивали по соотношению площадей пиков цепи $\alpha 1(II)$ до и после обработки препаратов коллагенов пепсином.

Содержание фракций молекул коллагенов I и II типов, способных к протеолитическому отщеплению N-концевых участков, оценивали по отношению площадей пиков полноразмерных цепей $\alpha 1(I)$, $\alpha 2(I)$, $\alpha 1(II)$ и соответствующих цепей $\alpha 1(I)^P$, $\alpha 1,2(II)^{PP}$, $\alpha 1(II)^P$, не содержащих N-концевых участков.

Результаты и обсуждение

Коллагены, экстрагированные из кожи 6 больных с СЭД II типа и контрольной группы детей, анализировали с помощью электрофореза в градиентном ПААГ (5—10 %) в восстанавливающих и в невосстанавливающих условиях. На рис. 1 (см. вклейку) приведены результаты электрофореза для некоторых больных в невосстанавливающих условиях. На электрофореграммах представлены цепи $\alpha 1$ (I) и $\alpha 2$ (I), димеры β_{11} , β_{12} , γ -компоненты коллагена I типа, а также полипептиды $\alpha 1$ (I)^p и $\alpha 1,2$ (I)^p, представляющие собой укороченные цепи $\alpha 1$ (I) и $\alpha 2$ (I), не содержащие N-концевых участков [18]. Цепи коллагена III типа в составе молекул связаны дисульфидными мостиками и мигрируют в невосстанавливающих условиях в виде тримера [$\alpha 1$ (III)]₃ вместе с γ -компонентом коллагена I типа. В восстанавливающих условиях цепи $\alpha 1$ (III) мигрируют в виде одной полосы с цепями $\alpha 1$ (I). Ни у одного из больных отличий электрофоретических подвижностей коллагеновых полипептидов по сравнению с нормой не обнаруживается. На рис. 2 (см. вклейку) приведены результаты электрофореза коллагенов, экстрагированных из реберного хряща больных с СЭД II типа, сочетающимся с ВДГК, и здоровых лиц. Видны полосы, соответствующие цепи $\alpha 1$ (II), укороченной цепи $\alpha 1$ (II)^p, β - и γ -компонентам. Изменений электрофоретических подвижностей цепей коллагенов II типа у обследованных больных не выявляется. Для более тонкого анализа коллагеновых белков было проведено пептидное картирование с использованием расщепления бромцианом. С этой целью пепсиновые экстракты коллагенов кожи обрабатывали бромцианом и полученные пептиды анализировали электрофорезом в градиентном (10—25 %) ПААГ. На электрофореграммах (рис. 3, см. вклейку) видны все высокомолекулярные пептиды коллагенов I и III типов: $\alpha 1$ (I) СВ 7, $\alpha 1$ (I) СВ 8, $\alpha 1$ (I) СВ 6, $\alpha 1$ (I) СВ 3, которые составляют 87 % последовательности цепи $\alpha 1$ (I); $\alpha 2$ (I) СВ 3,5 и $\alpha 2$ (I) СВ 4, которые составляют 97 % цепи $\alpha 2$ (I), $\alpha 1$ (III) СВ 9, $\alpha 1$ (III) СВ 5, $\alpha 1$ (III) СВ 4, $\alpha 1$ (III) СВ 8, $\alpha 1$ (III) СВ 3, составляющие около 75 % цепи $\alpha 1$ (III). Ни у одного из обследованных больных изменений в наборе пептидов, полученных фрагментацией коллагенов I и III типов бромцианом, и изменений электрофоретических подвижностей пептидов не выявлено. На рис. 4 (см. вклейку) приведены результаты

пептидного анализа коллагенов реберного хряща 6 больных с СЭД II типа, имеющих ВДГК, и коллагенов ребенка из контрольной группы. На электрофореграммах и у больных, и в контроле представлены только продукты гидролиза коллагена II типа, а именно: пептиды $\alpha 1$ (II) СВ 10,5, $\alpha 1$ (II) СВ 11, $\alpha 1$ (II) СВ 8, $\alpha 1$ (II) СВ 9,7, $\alpha 1$ (II) СВ 12, составляющие 92 % последовательности цепи $\alpha 1$ (II) коллагена II типа. Ни у одного из больных изменений в наборе пептидов или скорости их миграции не обнаружено. Не выявлено также наличия пептидов коллагенов I и III типов в пепсиновых гидролизатах экстрактов реберного хряща. Таким образом, результаты электрофоретического анализа коллагенов кожи и хряща, а также результаты пептидного картирования свидетельствуют об отсутствии у больных крупных структурных перестроек в молекулах коллагенов I, II и III типов, либо значительных нарушений их внутриклеточного процессинга, что согласуется с относительно мягкими проявлениями заболевания при СЭД II типа. Тем не менее, нельзя исключить локальных, непротяженных структурных изменений в коллагенах или в регуляторных участках кодирующих их генов, которые могли бы приводить к нарушению координации синтеза коллагенов, их стабильности, образования внутри- и межмолекулярных сшивок и, в конечном счете, к патологическим отклонениям в соединительной ткани.

Учитывая вышеизложенное, мы провели оценку ряда количественных параметров, характеризующих состав коллагенов кожи и хряща больных в сравнении с нормой. Соотношение коллагенов III и I типов определяли двумя методами: по соотношению цепей $\alpha 1$ (III) и $\alpha 1$ (I) на электрофореграммах препаратов коллагенов и по соотношению маркерных пептидов $\alpha 1$ (III) СВ 5 и $\alpha 1$ (I) СВ 8 на электрофореграммах коллагенов, обработанных бромцианом. Первый метод позволяет определить соотношение только интактных молекул коллагенов III и I типов, не имеющих сшивок. Второй метод позволяет определить тотальное соотношение типов коллагенов, включая интактные молекулы, не имеющие межцепочечных сшивок, молекулы со сшивками и частично деградировавшие молекулы, у которых не повреждена область маркерных пептидов.

Как видно из табл. 1, в коже детей контрольной группы относительное содержание коллагена III типа, определенное по маркерным CNB γ -пеп-

Таблица 1

Основные количественные характеристики коллагенов, экстрагированных из кожи больных с СЭД II типа

Больные	Относительное содержание (в %) коллагена III типа, определенное по		Соотношение цепей в коллагене	
	маркерным CNB γ -пептидам	интактным α -цепям	β/α	$\alpha 1$ (I)/ $\alpha 2$ (I)
1.Э.И	26	47	0,14	2,0
2.Э.И	26	42	0,14	1,7
3.Э.И	29	27	0,25	2,2
4.Э.И	27	14	0,22	1,8
5.Э.И.	21	17	0,48	2,2
6.Э.И.	31	—	0,52	1,8
Среднее значение для больных	27±3,4	29±14,7	—	—
Среднее значение для контрольной группы	22±4,3	12±6,5	0,45±0,15	2,3±0,21

Таблица 2

Основные количественные характеристики коллагенов, экстрагированных из реберных хрящей больных с СЭД II типа, имеющих ВДГК

Больные	Относительное содержание (в %) цепи $\alpha 1 (II)^p$ в экстракте коллагенов хряща		% цепей $\alpha 1$ деградированных при обработке пепсином при 37 °С в течение 1 ч	Соотношение цепей β/α в коллагене II типа
	не обработанном дополнительно пепсином	обработанном пепсином при 30 °С в течение 1 ч		
1.Э.П.	22	23	41	0,11
6.Э.П.	29	38	52	0,23
7.Э.П.	39	42	95	0,04
8.Э.П.	26	28	71	0,17
Среднее значение для контрольной группы	$16 \pm 1,5$	$17 \pm 1,6$	14 ± 4	$0,11 \pm 0,03$

тидам, составляет $22 \pm 4,3$ %. Среднее содержание коллагена III типа в группе больных с СЭД II типа существенно повышено ($27 \pm 3,4$ %; $p=0,95$), хотя у одного из больных (5.Э.П.) оно соответствует среднему значению нормы.

Соотношение интактных молекул коллагенов III и I типов, не имеющих сшивок, которое определяли по соотношению $\alpha 1 (III)/\alpha 1 (I)$, у больных существенно различается. В норме доля коллагена III типа среди интактных молекул коллагенов кожи, не имеющих сшивок, составляет $12 \pm 6,5$ %. У больных 1.Э.П., 2.Э.П. и 3.Э.П., эта величина составляет 47, 42 и 27 % соответственно, у больных 4.Э.П. и 5.Э.П. — 14 и 17 % соответственно. Среднее значение по группе больных достоверно ($p=0,95$) превышает среднее значение в контрольной группе и составляет $29 \pm 14,7$ %.

Была проведена также оценка количества молекул коллагена I типа с пониженной стабильностью, у которых при обработке пепсином при температуре ниже 33 °С отщепляются N-концевые участки трехспиральной области с образованием полипептидов $\alpha 1 (I)^p$ и $\alpha 1,2 (I)^p$ [18]. Содержание таких молекул в коже больных с СЭД II типа не отличалось от нормы (данные не приведены).

В табл. 2 приведены некоторые характеристики коллагена II типа, выделенного из реберного хряща 4 больных с СЭД II типа, имеющих ВДГК, и детей контрольной группы. Как видно, соотношение β/α в коллагене II типа, экстрагированном из реберного хряща детей контрольной группы, составляет $0,11 \pm 0,03$. У больного 6.Э.П. соотношение β/α значительно выше и составляет 0,23 (превышение над контролем $>3\sigma$), что позволяет предполагать увеличение уровня сшивок в коллагене II типа. У больных 1.Э.П. и 8.Э.П. содержание β -компонента не отличается от нормы (0,11 и 0,17 соответственно). У больного 7.Э.П. димеры на электрофореграмме коллагенов II типа практически не выявляются, что указывает на нарушения образования сшивок в коллагене II типа данного больного.

Была проведена также оценка общей чувствительности молекул коллагена II типа к пепсину и содержания фракции молекул, у которых при об-

работке пепсином при температурах до 30 °С наблюдается гидролиз концевых участков с образованием полипептида $\alpha 1 (II)^p$. Общую чувствительность определяли по соотношению площадей пиков цепи $\alpha 1 (II)$ до и после обработки пепсином при 37 °С в течение 1 ч. Содержание фракции молекул, способных к отщеплению концевых участков, оценивали по соотношению: $\alpha 1 (II)^p / [\alpha 1 (II)^p + \alpha 1 (II)]$. Поскольку в процессе получения препаратов коллагенов экстракцией раствором пепсина может происходить неполный переход молекул со сниженной стабильностью в частично расщепленную форму, данное соотношение определяли как в исходных пепсиновых экстрактах коллагенов (экстракция проводилась при 4 °С), так и после дополнительной обработки пепсином при 30 °С в течение 1 ч.

В норме доля полипептида $\alpha 1 (II)^p$ составляет $16 \pm 1,5$ % и после дополнительной обработки пепсином существенно не увеличивается. У больных 6.Э.П., 8.Э.П. и 7.Э.П. содержание полипептида $\alpha 1 (II)^p$ резко повышено и составляет 26—42 %. У больного 1.Э.П. содержание данного полипептида составляет 22—23 %.

Результаты обработки пепсином при 37 °С показали, что через 1 ч после начала обработки количество цепей $\alpha 1 (II)$ в препаратах коллагенов детей контрольной группы снижается в среднем на 14 ± 4 %, т. е. около 14 % молекул коллагена II типа расщепляется пепсином. В этих же условиях обработки коллаген II типа больного 7.Э.П. гидролизует практически полностью, у больных 1.Э.П., 6.Э.П., 8.Э.П. разрушается 41, 52, 71 % молекул коллагена II типа.

Повышенное содержание фракции молекул коллагена II типа, способных к отщеплению концевых участков при низких температурах, а также, в целом, повышенная чувствительность коллагена II типа к гидролизу пепсином свидетельствуют, что коллаген II типа обследованных больных с СЭД II типа, имеющих ВДГК, характеризуется сниженной стабильностью и, вероятно, более активно метаболизируется в реберном хряще больных по сравнению с нормой.

Проведенный нами анализ коллагенов кожи 6 больных с СЭД II типа выявил достоверное ($p=0,95$) снижение среднего соотношения как общего количества коллагенов I и III типов, определенного по CNBг-пептидам, так и соотношения интактных молекул коллагенов I и III типов, не имеющих сшивок, которое было определено по соотношению цепей $\alpha 1 (I)$ и $\alpha 1 (III)$. Следует отметить, что хотя среднее содержание коллагена I типа по группе больных достоверно ниже, чем в контрольной группе, имеются вариации этого параметра у разных больных. Особенно это заметно при определении соотношения коллагенов I и III типов по соотношению цепей $\alpha 1 (I) / \alpha 1 (III)$, которое зависит от 3 параметров: тотального соотношения коллагенов I и III типов, уровня сшивок в них, и от того, какая часть молекул имеет полностью неповрежденные трехспиральные области. У больных 1.Э.П., 2.Э.П. и 3.Э.П. снижение содержания коллагена I типа при определении по соотношению цепей $\alpha 1 (I)/\alpha 1 (III)$ выражено в гораздо большей степени, чем при определении по CNBг-пептидам. С учетом этого представляется более вероятным, что общее сниже-

ние содержания коллагена I типа обусловлено не снижением синтеза или секреции коллагена I типа, а снижением стабильности молекул. Можно предположить, что снижение стабильности носит в основном локальный характер. В результате действия протеаз первоначально образуются молекулы с единичными разрывами α -цепей. Единичные разрывы существенно сказываются на результатах определения соотношения коллагенов по α -цепям, и лишь незначительно на результатах определения по CNBr-пептидам. Поэтому снижение относительного содержания коллагена I типа, определенного по α -цепям, выражено сильнее, чем определенного по CNBr-пептидам. Молекулы с единичными разрывами подвергаются далее более полной деградации, что проявляется в снижении тотального содержания коллагена I типа, определяемого по CNBr-пептидам.

Анализ соотношения α -цепей и β -компонентов указывает на то, что у больных I.Э.П., 2.Э.П. и, в меньшей степени, у больного 3.Э.П. имеет место нарушение образования сшивок, в коллагене I типа.

Поскольку коллаген I типа является основным структурным элементом тканей, поражаемых при СЭД II типа, выявленные у изученных нами больных изменения свидетельствуют о том, что этиология и патогенез СЭД II типа связаны с нарушениями в коллагене I типа, снижающими его стабильность и, в некоторых случаях, образование сшивок. Различия в характеристиках коллагенов кожи разных больных указывают на возможную биохимическую гетерогенность СЭД II типа.

Изучение коллагенов II типа, выделенных из реберного хряща больных с СЭД II типа, имеющих ВДГК, показало, что они имеют более высокую чувствительность к обработке пепсином при 37 °С, чем коллагены хряща контрольной группы детей. Обнаружено также повышенное содержание фракции молекул коллагена II типа, предрасположенных к протеолитическому отщеплению концевых участков при низких температурах. Эти изменения указывают на сниженную стабильность и повышенный метаболизм коллагена II типа у больных с ВДГК. Выявленные различия имеют, возможно, вторичный характер и являются, по-видимому, следствием ВДГК, а не ее первопричиной, поскольку основные и наиболее типичные проявления СЭД II типа касаются преимущественно кожи и других тканей, в которых преобладают коллагены I и III типов.

Кроме того, у одного из больных с СЭД II типа, имеющих ВДГК; выявлено резкое снижение содержания димеров коллагена II типа, у другого больного, наоборот, существенное повышение. Связь этих изменений с ВДГК остается неясной, поскольку у двух других обследованных больных содержание димеров не отличается от нормы.

4. Byers P. H., Holbrook K. A., McGillivray B. et al. // Hum. Genet.— 1979.— Vol. 47.— P. 141—150.
5. Byers P. H., Siegel R. C., Holbrook K. A. et al. // New Engl. J. Med.— 1980.— Vol. 303.— P. 61—65.
6. Burgeson R. E., Hollister D. W. // Biochem. biophys. Res. Commun.— 1979.— Vol. 87.— P. 1124—1131.
7. Cole W. G., Chan D., Chambers G. W. et al. // J. biol. Chem.— 1986.— Vol. 261.— P. 5496—5503.
8. Eyre D. R., Shapiro F. D., Aldridge J. F. // Ibid.— 1985.— Vol. 260.— P. 11322—11329.
9. Hanson A. N., Benleg S. P. // Analyt. Biochem.— 1983.— Vol. 130.— P. 32—40.
10. Laemmli U. K. // Nature.— 1970.— Vol. 227.— P. 680—685.
11. Lichtenstein J. R., Martin G. R., Kohn L. D. et al. // Science.— 1973.— Vol. 182.— P. 298—300.
12. Finnell S. R., Krane S. M., Kensora J. E., Glimcher M. J. // New Engl. J. Med.— 1972.— Vol. 286.— P. 1013—1020.
13. Pope F. M., Shea Nichells A. S., Jones F. M. et al. // J. roy. Soc. Med.— 1980.— Vol. 73.— P. 180—186.
14. Sage H., Bornstein P. // Meth. Enzymol.— 1982.— Vol. 82.— P. 96—127.
15. Steinmann B., Tuderman L., Pentonen L. et al. // J. biol. Chem.— 1980.— Vol. 255.— P. 8887—8893.
16. Stolle C. A., Pyeritz R. E., Myers J. C., Prockop D. J. // Ibid.— 1985.— Vol. 260.— P. 1937—1944.
17. Sykes B., Francis M. J. O., Smith R. // New Engl. J. Med.— 1977.— Vol. 296.— P. 1200—1203.
18. Van der Rest M., Hayes A., Marie P. et al. // Amer. J. med. Genet.— 1986.— Vol. 24.— P. 433—446.

Поступила 20.05.89

STRUCTURAL CHARACTERISTICS OF COLLAGENS FROM SKIN AND RIB CARTILAGE OF PATIENTS WITH EHLERS-DUNLOS SYNDROME OF THE II TYPE

B. P. Sokolov, B. M. Sher, E. A. Kozlov, T. A. Tsvetkova, S. S. Rudakov, A. A. Del'vig, V. N. Kalinin

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

Collagens were analyzed in skin and rib cartilage of 9 patients with Ehlers-Dunlos syndrome of the II type. Electrophoresis and CNBr-peptide mapping showed that extended inserts and deletions as well as rough impairments of posttranslation processing were not detected in collagens of the I, II and III types from these patients. In the patients with Ehlers-Dunlos syndrome of the II type distinct increase was observed both in the total ratio of collagens III/I ($P=0.95$) and in the ratio of intact collagens III/I free of cross-links. A decrease in content of dimers β_{11} and β_{12} was found in two patients. The data obtained suggest that the Ehlers-Dunlos syndrome of the II type involved deteriorations in the structure of collagens I responsible for decrease in stability and sometimes for impairments in cross-link formation. Increase in content of collagen II fraction, predisposed to proteolytic hydrolysis of terminal sites, as well as elevated sensitivity of collagen II to pepsin hydrolysis were found in collagens of rib cartilage from patients with the syndrome and with funnel chest deformation. This suggests the lowered stability of collagen II from rib cartilage in funnel chest deformation.

ЛИТЕРАТУРА

1. Блинникова О. Е. // Мед. генетика. Экспресс-информ. ВНИИМИ.— 1985.— № 6.— С. 1—26.
2. Бочкова Д. П., Тернова Т. И., Костиков М. В., Федоров А. М. // Тер. арх.— 1985.— № 4.— С. 140—143.
3. Arneson M. A., Hammerschmidt L. T., Furchts L., King R. // J. A. M. A.— 1980.— Vol. 244.— P. 144—147.