

ТОМ 37

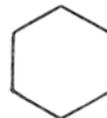
ВЫПУСК 2

МАРТ — АПРЕЛЬ

Двухмесячный научно-теоретический журнал

Основан в 1955 г.

ВОПРОСЫ МЕДИЦИНСКОЙ ХИМИИ



РЕДАКЦИОННАЯ КОЛЛЕГИЯ:

Главный редактор С. С. ДЕБОВ

В. А. ТУТЕЛЬЯН (зам. редактора), А. И. ЛРЧАКОВ, И. П. ЛШМАРИН, Т. Т. БЕРЕЗОВ,
Ю. В. БУКИН, А. В. ВАСИЛЬЕВ, Е. Н. ГЕРАСИМОВА, В. З. ГОРКИН, И. Б. ЗБАРСКИЙ,
В. Л. КОЗЕЛЫЦЕВ (ответственный секретарь), А. Н. КЛИМОВ, Б. Ф. КОРОВКИН,
Л. А. ЛОКШИНА, В. Н. ОРЕХОВИЧ, Л. Ф. ПАНЧЕНКО, М. Ш. ПРОМЫСЛОВ,
Ю. А. РОМАКОВ, В. А. САКС, С. Е. СЕВЕРИН, В. Б. СПИРИЧЕВ, Е. А. СТРОЕВ

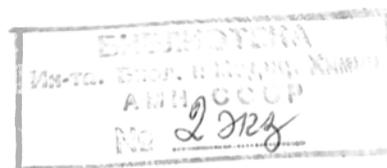
РЕДАКЦИОННЫЙ СОВЕТ:

БАЕВ А. А. (Москва)
БЫЧКОВ С. М. (Москва)
КОНСТАНТИНОВ А. А. (Хабаровск)
КУДРЯШОВ Б. А. (Москва)
ЛЯХОВИЧ В. В. (Новосибирск)
ПАСХИНА Т. С. (Москва)

ТРОИЦКИЙ Г. В. (Симферополь)
ТУРАКУЛОВ Я. Х. (Ташкент)
ТЯХЕПЫЛД Л. Я. (Тарту)
ЯКОВЛЕВ Н. Н. (Ленинград)
ЯСАЙТИС А. А. (Вильнюс)



МОСКВА · МЕДИЦИНА. 1991



© С. В. ПИРОЖКОВ, Л. Ф. ПАНЧЕНКО, 1991

УДК 615.212.7.015.44:612.017.4

*С. В. Пирожков, Л. Ф. Панченко***МОЛЕКУЛЯРНЫЕ МЕХАНИЗМЫ ЦИТОТОКСИЧНОСТИ НАРКОТИЧЕСКИХ ЛЕКАРСТВ**

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

Психотропную активность лекарств, в том числе наркотических, можно рассматривать как констелляцию множества эффектов. Исходя из этого, целесообразно выделить специфическое действие наркотика на центральную нервную систему — психоактивация (обычно опосредована взаимодействием со специфическими рецепторами) и неспецифическое, тесно связанное с его токсичностью, — депрессия. В процессе формирования наркомании как болезни токсические эффекты наркотических веществ начинают играть все более заметную роль. Этому способствуют как постепенная аккумуляция лекарства в организме при его длительном применении, так и развитие толерантности, вынуждающей человека, страдающего наркотической зависимостью, вводить все более возрастающие дозы для достижения желаемого психического состояния. В этих условиях «мишенью» для неблагоприятных эффектов наркотика становятся не только нейроны, но и другие клетки организма. Именно токсическое поражение и функциональная недостаточность жизненно важных органов являются причиной снижения резистентности к агрессивным факторам внешней среды, преждевременного старения и смерти больного наркоманией. Повреждение головного мозга и хронический токсикоз наряду с физической зависимостью от наркотика лежат в основе распада личности и глубоких изменений поведения, характерных для развернутых форм заболевания.

Попадая в организм в токсических дозах, наркотическое вещество оказывает влияние на большинство органов и тканей, так как в одних клетках оно связывается со специфическими рецепторами, в других — превращается в более активные метаболиты, а третьи подвергаются действию гормонального фона. Таким образом, неблагоприятное влияние наркотического лекарства может реализовываться на уровне рецептора (на поверхности клетки-мишени), опосредоваться продуктами его метаболизма (внутриклеточная токсичность) или являться результатом его центрального действия, т. е. избыточного образования и секреции биологически активных веществ, например катехоламинов. В действительности картина соматического поражения на фоне приема наркотиков представляет собой сочетание всех 3 возможных путей их влияния на организм, а преобладание одного из них зависит от дли-

тельности наркотизации, особенностей химической природы и метаболизма лекарства и способности клеток органа-мишени к адаптации.

В настоящем обзоре обобщаются данные, касающиеся механизмов цитотоксичности 3 наиболее распространенных наркотических препаратов: морфина, кокаина и марихуаны, а также представлены некоторые собственные результаты.

Известны многочисленные факты поражения внутренних органов у больных наркоманией. Наиболее часто выявляются воспалительные процессы в печени благодаря достаточно простому и чувствительному способу диагностики по активности сывороточных трансаминаз и разработанной технике взятия биопсии. Например, согласно клиническим наблюдениям [34], из 20 больных наркоманией у 11 обнаружены аномально высокие значения сывороточных тестов и у 19 — отклонения морфологической структуры гепатоцитов при биопсии. Другие авторы [41] выявили дисфункцию печени у 80 из 89 наркоманов, употребляющих героин и кокаин, причем у 6 из них была явно выраженная желтуха. В 75 % случаев изменения носят характер хронического персистирующего гепатита. При длительном употреблении лекарства микроскопический анализ показывает нарастание выраженности инфильтрата из малых лимфоцитов, сочетающегося с портальным фиброзом и умеренной пролиферацией желчных канальцев. В ранних исследованиях 1920—1950 гг. повышение активности сывороточных трансаминаз рассматривали как дополнительное подтверждение приема препаратов опиума. Нередко причиной гепатита является вирусная инфекция, проникающая в организм через нестерильные иглы.

Весьма распространены различные формы нефропатий. По данным колумбийских авторов [54], 56 % героиновых наркоманов страдают почечной патологией. Ультроструктурные изменения в ткани почек находят у всех больных наркоманией. Они проявляются фокальными утолщениями базальной мембраны эпителия почечных канальцев и отложением в ней гомогенного гранулярного электронно-плотного материала. Клинически описаны 2 формы нефротического синдрома. 1-я характеризуется массивной протеинурией при нормальной концентрации мочевины в крови. При 2-й форме происходит быстрое ухудшение функции почек с неизбежной протеинурией. Поражение почек может быть вторичным по отношению к миоглобинурии. Последнее состояние является следствием острого рабдомиолиза, развивающегося при употреблении наркотических средств. Имеются сообщения о появлении острого рабдомиолиза при внутривенных инъекциях героина, когда уровни миоглобина в сыворотке крови возрастают в 100 раз, а активность креатинфосфокиназы превышает нормальные значения в 700 раз [31, 34]. Гистологический анализ ука-

зывает на миолиз мышечных волокон I и II типов. Описан случай острого кокаинового токсикоза после приема лекарства с целью развлечения [42]. Токсикоз сопровождался возбуждением, драчливым поведением и бредом. Клинически выявляли тахикардию, гипертензию, потливость и лихорадочное состояние с гипертермией. Лабораторные анализы показали наличие рабдомиолиза и почечной недостаточности с миоглобуинурией.

Сердечная патология является наиболее типичным последствием употребления кокаина. Имеется немало сообщений об инфаркте миокарда, фибрилляции желудочков, полной блокаде сердца и внезапной смерти при этой форме наркомании [27, 29, 63]. Причем инфаркт миокарда после приема кокаина может развиваться и без предшествующей патологии коронарных сосудов [29]. Характерным морфологическим изменением у кокаиистов; умерших от сердечного приступа; было наличие полос миокардиальной контрактуры [58]. Их количество коррелировало с уровнем кокаина в моче и крови при аутопсии. Считают, что эти полосы могут представлять собой анатомический субстрат для аритмии.

Известно, что кокаин обладает сильным сосудосуживающим действием [44]. Описан случай обширного инфаркта мозга после курения «крэка» — предшественника кокаина в форме свободного основания [28]. Причиной инфаркта было резкое сужение ветви каротидной артерии.

Сообщалось о поражениях легких после внутривенного введения размельченной таблетки наркотика, содержащей примеси. В этом случае в интерстиции легочной ткани обнаруживают мелкие частицы силиката магния. В то же время наблюдали развитие угрожающей для жизни альвеолярной геморагии после повторной ингаляции кокаина [46]. Нередко после внутривенной инъекции наркотика появляется острая ишемия отдельных членов тела. Это опасное состояние, приводящее к гангрене, провоцируется введением инородных тел или воздуха с последующей эмболией сосуда; артериальным спазмом, гиперсвертываемостью крови и связанным с ней развитием атеромы; сепсисом, целлюлитом и мышечным некрозом [12].

Долгое время считалось, что морфин сам по себе малотоксичен, а соматическая патология у опийных наркоманов связана с введением грубых препаратов, в состав которых входят токсикогенные примеси. Недавно установили возможность синтеза морфина и кодеина в организме млекопитающих, что ставит вопрос о роли этих веществ как естественных медиаторов нервной передачи, опосредованной опиоидными рецепторами. Однако концентрации эндогенного морфина и кодеина в ткани головного мозга не превышают 1 пмоль/г [38], а в спинномозговой жидкости составляют 2—340 фмоль/мл [17], тогда как после подкожной инъекции морфина в дозе 5 мг/кг его концентрация в ткани мозга достигает 180 нг/г, а в плазме крови — примерно 1 мкг/мл [35], т. е. превышает эндогенные уровни на 3—5 порядков. В этом случае на передний план выходят побочные, в том числе токсические эффекты лекарства. Изучение фармакодинамики морфина показало, что он примерно одинаково распределяется в различных органах, при-

чем в тех тканях, где он активно метаболизируется (печень, почки), концентрация связанных форм на 1—2 порядка превышает уровни свободного лекарства [64]. Через 4 ч после инъекции в дозе 30 мг/кг в большинстве органов, кроме скелетной мышцы, выявляют свободный морфин в концентрации от 6 до 12 мкг/г, а в желчи содержание связанных форм достигает 7 мг/мл. Хотя в нервной ткани морфин избирательно не накапливается, признаки толерантности к нему могут сохраняться в течение 1 года даже после однократного введения, а конъюгированные с биомолекулами продукты метаболизма радиоактивно-меченного морфина в концентрации 10—20 нг/г обнаружены в мозге через 3 нед после однократной инъекции [43].

В организме примерно 45 % дозы морфина экскретируется в виде морфин-3-глюкуронида, около 0,3 % — как морфин-6-глюкуронид [51]. Причем в результате повторных введений активность глюкуронилтрансферазы, катализирующей эти реакции в микросомах печени, уменьшается. Кроме того, образуется морфин-3-эфирное производное сульфата. Около 7 % дозы морфина претерпевает N-деметилирование неспецифическими монооксигеназами микросом и экскретируется в виде норморфина. *In vitro* показана возможность превращения морфина в катехольные производные, которые затем метилируются. Морфин и кодеин способны взаимопревращаться в реакциях O-метилирования — деметилирования. Наконец, в катализируемой морфин-6-дегидрогеназой реакции морфин окисляется до морфинона [66].

Признаки повреждения печени наблюдаются уже в первые часы после однократного введения морфина лабораторным животным. При внутрибрюшинной инъекции крысам 50 мг/кг наркотика активность сывороточных аланинаминотрансферазы (АЛТ) и аспартатаминотрансферазы (АСТ) возрастала в 3—4 раза через 1 ч после начала опыта [21]. В другой серии экспериментов на мышцах через 16 ч после инъекции 100 мг/кг морфина уровни АСТ возрастали в 6,5 раз, что совпадало с началом микровезикулярной жировой инфильтрации гепатоцитов [52]. К 48 ч от начала опыта эти изменения захватывали каждую клетку печени, а начиная с 69 ч происходило постепенное восстановление нормальной морфологической картины. Интересно, что рассасывание липидных включений в гепатоцитах идет несмотря на продолжающееся распространение наркотика в организме из имплантированной таблетки. Напротив, обратная эволюция алкогольного ожирения печени наступает только после прекращения приема этанола.

Ряд данных свидетельствует в пользу центральных механизмов ожирения печени под действием морфина. Во-первых, введение морфина в желудочек мозга в дозах от 20 до 100 мг/кг через 16 ч приводит к 1, 6, 4,-кратному возрастанию активности сывороточной АЛТ [52]. Аналогичный эффект наблюдается также и при инъекции синтетического опиоидного пептида D-Ала²-Мет-энкефалина. Во-вторых, повышение уровней трансаминаз полностью блокируется гипофизэктомией [18]. Таким образом повреждающие эффекты морфина могут быть опосредованы его активирующим действием на гипофизарно-адrenalовую сек-

рецию. Известно, что однократные дозы морфина стимулируют кортикальный ответ надпочечников за счет гиперсекреции АКТГ. При этом морфин способствует выбросу до 50 % запасов адреналина надпочечников в течение 24 ч после введения [60]. На фоне инъекции мышам резерпина или β -адреноблокатора пропранолола эффекты морфина на АЛТ уменьшаются примерно на 50 %, хотя α -адреноблокатор дибензилин не оказывал влияния [52]. Ранее было показано, что инфузия катехоламинов приводит к ожирению печени у собак [25]. В основе этого действия могут лежать способность адреналина усиливать мобилизацию свободных жирных кислот из жировой ткани и их повышенное усвоение клетками печени.

В то же время антагонист опиоидных рецепторов налоксон в зависимости от сроков его введения до или одновременно с морфином полностью или частично блокировал его эффекты на АСТ [18, 52]. Это позволяет предположить, что токсические эффекты морфина могут реализовываться на уровне поверхностей мембраны клеток, в области локализации опиоидных рецепторов. Недавно было показано, что морфин влияет на текучесть липидного бислоя в мембранах нервных клеток как *in vivo*, так и *in vitro* [32]. *In vitro* микровязкость мембраны клеток гиппокампа уменьшалась уже при концентрации наркотика 10 нМ. Противоположные сдвиги возникали в присутствии 1 нМ налоксона. Низкие эффективные концентрации агентов говорят об участии рецепторных участков в модуляции параметров текучести мембран. По-видимому, оккупированный лигандом опиоидный рецептор претерпевает конформационные изменения, которые в свою очередь ведут к структурным изменениям липидного домена. Однако частично флуидизирующий эффект морфина может определяться и непосредственным специфическим и неспецифическим взаимодействием наркотика с липидами мембраны. Последнее может реализовываться в клетках, обедненных опиоидными рецепторами. В настоящее время неясно, может ли сама молекула морфина влиять на микровязкость липидов в клетках, практически лишенных опиоидных рецепторов, например в гепатоцитах или эритроцитах.

Вместе с тем защитное действие налоксона против повреждающих эффектов морфина может быть связано с конкурентным ингибированием ферментов его метаболической активации. Предположение о том, что не сам морфин, а его более реакционноспособные метаболиты играют заметную роль в повреждении клеточных биомолекул имеет веские основания. Известно, что радиоактивно-меченные фрагменты молекул морфина необратимо связываются с белками нейроцитов и клеток печени [21, 43]. Причем, связывание с микросомальными белками печени возрастает в 2 раза, если процесс глюкуроноидации морфина замедляется добавлением галактозамина [21]. Был предложен следующий механизм метаболической активации морфина в нервной ткани [43]. В присутствии следов меди и H_2O_2 в участках с относительно высокой концентрацией аммиака молекула морфина окисляется до весьма реакционноспособных 2:3-О-хиноновых производных. О-Хиноны легко взаимодействуют с NH_2 - и SH -группами белков и других биомолекул с образо-

ванием N- или S-катехольных и хиноновых конъюгатов и вызывают нарушение их нативной структуры. Описанные условия вполне могут создаваться в таких компартментах нейронов, как первичные окончания, синапсосомы или синаптические пузырьки, где запасаются катехоламины и серотонин в виде тройных координационных комплексов с медью и АТФ.

В печени потенциация токсических свойств морфина происходит в результате окисления цитохромом P-450 в микросомах и морфин-6-дегидрогеназой в цитозоле. Продукты микросомальной активации морфина пока не идентифицированы. Сообщалось, что индуктор цитохрома P-450 фенотербитал способствует более заметной утечке АЛТ и АСТ из клеток печени в плазму крови, а ковалентное связывание дигидроморфина с белками зависит от O_2 и НАДФ·Н [21]. Однако в опытах других исследователей [52] влияние индукторов и ингибиторов цитохрома P-450 на токсичность морфина не подтвердилось.

LD_{50} для продукта морфин-6-дегидрогеназной реакции морфинона на порядок ниже, чем для его метаболического предшественника. Морфинон образуется при дегидрировании оксигруппы фенольного кольца молекулы морфина в 6 положении. Японские исследователи, используя культуру гепатоцитов, рассмотрели вопрос об относительной роли цитохрома P-450 и морфин-6-дегидрогеназы в токсичности морфина [53]. В присутствии 0,5 мМ морфина жизнеспособность гепатоцитов снижалась до 7 % от исходного уровня за 30 мин инкубации, а внутриклеточная концентрация восстановленного глутатиона (GSH) уменьшалась в 5,4 раза. Оба процесса были нечувствительны к ингибиторам цитохрома P-450, однако значительно замедлялись налоксоном и налтрексоном, которые являются конкурентными ингибиторами морфин-6-дегидрогеназы. Налтрексон замедлял скорость образования норморфина, глюкуронилморфина и продукта конъюгации морфинона с GSH. Обнаружена связь между уменьшением внутриклеточной концентрации GSH и накоплением продукта его конъюгации с морфином. Важность морфин-6-дегидрогеназы для гепатотоксичности морфина подтверждает и тот факт, что при введении крысам морфинона *in vivo* налоксон не оказывает защитного действия [49].

GSH играет особую роль в детоксикации морфинона, так как этот метаболит легко реагирует с SH-группами белков с образованием ковалентной связи. Через 1 ч после введения морфинона (0,15 ммоль/кг) крысам концентрация GSH в печени снижалась на 60 %, что совпадало с резким повышением активности сывороточных трансаминаз [21]. Исследуя способность различных производных морфина уменьшать концентрацию GSH в печени, пришли к заключению, что токсичность морфина связана с (—)-3-окси-N-метилморфинановой структурой в составе его молекулы [21].

Паряду с предполагаемыми свойствами метаболитов морфина, несущих электрофильные участки, необратимо связываться и повреждать биомолекулы, имеющие витальное значение для клетки, необходимо учитывать, что их свободнорадикальные формы могут действовать как инициаторы перекисного окисления липидов (ПОЛ)

и незаряженных аминокислот вдоль α -цепи. Спектр поперечной исчерченности уникален как для отдельных фрагментов молекулы, так и для коллагена различных типов.

SLS-агрегаты — один из уникальных случаев, когда детали первичной структуры белка обнаруживаются в электронном микроскопе. Этот подход широко применяется для быстрой локализации полипептидных фрагментов, полученных после расщепления α -цепей, в исходных цепях, что особенно важно для «реконструкции» полной аминокислотной последовательности на основании первичной структуры пептидных фрагментов [33].

Ультраструктурный анализ нашел применение и для выяснения особенностей внутриклеточного транспорта и секреции белковых продуктов. SLS-агрегаты, впервые сформированные искусственным путем при создании условий, далеких от существующих в клетках [53], в более поздних исследованиях были обнаружены во внутриклеточных органеллах, участвующих в транспорте белка и его выведении из клеток: в шероховатом ретикулуме, области аппарата Гольджи, цитоплазматических гранулах [59]. Подобные структуры были также обнаружены в секрете, выделяемом растущими в культуре фибробластами, и в экстрацеллюлярном матриксе при анализе цельной ткани [10]. В связи с этим было высказано предположение, что надмолекулярные образования являются транспортной формой коллагена и, возможно, других белков [59].

Цели приведенных исследований и подходы к их реализации демонстрируют, насколько разнообразны, остроумны и изощренны методологические основы современной биохимии белкового синтеза.

Например, сборка SLS-агрегатов внутри клетки представляется трудно объяснимым феноменом, поскольку они, как указывалось, первоначально были открыты в виде искусственных структур, формирующихся в условиях, далеких от природных [53], в частности, для их образования необходимы относительно высокие концентрации коллагена, которые в клетке, по-видимому, не достигаются. Во всяком случае в среде культивируемых фибробластов эти структуры не обнаруживаются [25]. Однако можно было предположить, что локальное повышение концентрации коллагена, как и других белков, в клетке имеет место, например в так называемых «конденсирующих вакуолях», где происходит сгущение (конденсация) белкового секрета перед экзоцитозом. Проверка такой возможности была осуществлена в очень простом модельном опыте. Культуральную среду, содержащую мономеры коллагена, подвергли ультрацентрифугированию, т. е. имитировали своего рода конденсацию белкового материала. В результате в образованном осадке удалось обнаружить SLS-агрегаты [25].

Электронно-микроскопический анализ применяется для изучения структурной организации и физиологической роли всех белков матрикса [8, 23, 28, 47]. Так, в ультраструктурных исследованиях было установлено, что три полипептидные цепочки в молекуле ламинина образуют крестообразную структуру таким образом, что плечи «креста» на большей своей протяженности спирализованы и заканчиваются глобулярными

участками [68]. Спирализация центральной части молекулы и формирование глобул на ее концах характерны не только для ламинина, но и для другого важного компонента базальной мембраны — коллагена IV типа [34]. По-видимому, такая организация имеет существенное значение для межмолекулярных взаимодействий в базальной мембране, в то время как центральная часть важна для взаимодействия мембраны с клеточными элементами [35, 51, 56, 69]. Этот вывод подтверждается в работах, где использовалась иммуномикроскопическая техника, причем в качестве маркеров применялись моноклональные антитела [13, 56].

Важным и перспективным направлением в методологии исследований белкового синтеза являются иммунохимические подходы, получившие особое развитие в связи с разработкой гибридной техники и возможностью получения моноклональных антител. С помощью этих высокоспецифических зондов была установлена доменная структура коллагена, фибронектина, ламинина и других макрокомпонентов бесклеточного вещества, выяснена локализация доменов — этих структурно и физиологически «обособленных» фрагментов — в нативных молекулах и в ряде случаев расшифрована их конкретная роль как в физиологических процессах, так и при определенных патологических состояниях [13, 51, 57, 68].

При исследовании про- α -цепей коллагена типа I, синтезированных *de novo* и связанных с полирибосомами (т. е. насцентных цепей, не прошедших процессирования и сохранивших концевые пропептиды), удалось установить принципиально важную особенность трансляции коллагеновых и, возможно, других мРНК, заключающуюся в том, что «считывание» этих матриц осуществляется не непрерывно, а в форме импульсов, разделенных временными паузами [31]. В методическом отношении указанный вывод основывался на анализе различающихся по размерам насцентных про- α -цепей с помощью электрофореза и выявления N- и C-концевых пропептидов в реакции иммуноблоттинга с использованием моноклональных антител к этим участкам молекулы.

Иммуноспецифическая локализация с помощью моноклональных антител отдельных доменов в молекулах фибронектинов, продуцируемых нормальными и онкотрансформированными клетками, показала, что различия между изоформами этих белков в норме и при трансформации обусловлена различиями в сплайсинге (так называемый альтернативный сплайсинг) фибронектиновых мРНК в указанных клетках [7].

Иммунохимические подходы широко применяются при исследовании надмолекулярных форм белков межклеточного вещества. Известно, например, что образование надмолекулярных агрегатов коллагена IV типа, во многом определяющее структуру базальных мембран, обусловлено ковалентными межмолекулярными связями, в которых участвуют спирализованные домены 4 молекул, и нековалентным взаимодействием глобулярных участков 2 молекул коллагена [34]. С помощью иммуноэлектронной микроскопии была проведена локализация этих доменов в нативной молекуле, которая показала, что спирализованные фрагменты локализованы в N-концевой

области молекул и формируют так называемый 7S-домен, в то время как глобулярные участки (так называемые NC-1-домены) расположены в С-концевой области коллагена IV типа [34, 39].

Нарушение взаимодействий между макрокомпонентами базальной мембраны и других структур соединительной ткани может приводить к серьезным, иногда фатальным изменениям функции различных органов и тканей. К такой патологии можно отнести аутоиммунные заболевания, обусловленные выработкой антител к фрагментам коллагена и, по-видимому, других макромолекул соединительной ткани [9]. Взаимодействие аутоантител с соответствующим антигеном вызывает дезагрегацию соединительнотканых структур, что приводит к последствиям, тяжесть которых определяется локализацией антигена. Например, в случае синдрома Гудпасчера объектом аутоиммунной атаки являются упомянутые NC-1-домены коллагена IV типа — коллагена базальной мембраны, разрушение которой приводит к тяжелым поражениям почек и легких — органов, в функционировании которых роль базальных мембран исключительно важна [9, 12]. Диагностика синдрома Гудпасчера основана на обнаружении циркулирующего в крови антигена — фрагмента коллагена IV типа с помощью поли- или моноклональных антител [9, 12]. Иммунизация животных NC-1-фрагментом коллагена IV типа стимулирует развитие гломерулонефрита и поражений легких, характерных по клинике для синдрома Гудпасчера [16, 64].

Таким образом, иммунологическая «техника» во всем ее многообразии является важной и перспективной методологической основой изучения структуры, биосинтеза белков в норме и при различных заболеваниях.

В последнее время бурно развиваются исследования, направленные на выяснение роли белков межклеточного вещества в таких общебиологических процессах, как пролиферация и дифференцировка клеток, морфогенез органов и тканей, а также в возникновении на их основе патологических состояний, к которым относятся воспаление, нарушение регенерации, злокачественное перерождение клеток и др. [4, 6, 14, 17, 38, 49, 51, 57].

Для этих исследований в такой же степени, как для описанных выше, характерно применение очень разнообразных методических приемов. Вместе с тем объединяющей их методологической идеей является «вычленение» из сложных и многоэтапных процессов отдельных звеньев и воспроизведение их *in vitro*. Таким образом, мы опять сталкиваемся с проблемой создания моделей.

Значительный прогресс достигнут, в частности, в изучении роли матрикса при дифференцировке клеток эпителия. В ряде работ, посвященных этой проблеме, с помощью конструирования *in vitro* трехмерных коллагеновых гелей моделируется пространственная организация эпителиальных клеток, которую внеклеточное вещество обеспечивает им в организме [3, 21, 37, 61]. Эпителий молочной железы в случае роста на плоских гелях утрачивает признаки дифференцировки, обусловленные действием факторов, с чем сви-

детельствуют прекращение синтеза казеина и изменение морфологии клеток. Если такие клетки с четко выраженными признаками дедифференцированного фенотипа поместить в трехмерный гель, то можно наблюдать не только восстановление продукции специфического белка — казеина, но также появление характерных для молочной железы сегментированных гистологических структур — ацинусов [21, 37]. Другими словами, удается моделировать как процессы биохимической дифференцировки, так и влияние матрикса на морфогенетические функции.

В аналогичных по методическому подходу опытах с изолированными клетками поджелудочной железы удалось показать, что в условиях роста в трехмерном геле эти клетки восстанавливают характерные для исходной ткани поляризованные структуры. При том иммуноцитохимическая локализация инсулина и глюкагона — фенотипических маркеров клеток поджелудочной железы — соответствовала наблюдающейся *in vivo* [3].

Имунохимические подходы позволили установить физиологическую роль и других белков межклеточного вещества, как и значение их модификаций при тех или иных заболеваниях. В качестве примера можно указать на минорные коллагены и другие незначительные по содержанию, но весьма важные по функции компоненты матрикса — нидоген, энтактин, тенасцин и др. В исследовании структуры, биосинтеза этих биополимеров, определении их локализации в тканях ключевую роль играют методы, основанные на применении иммуноаффинной хроматографии, иммуноблоттинга, а также разнообразные иммуноморфологические методики [9, 18, 32, 36].

С помощью указанных подходов было, например, установлено, что нидоген, как и коллаген IV типа, локализован в плотной пластинке базальной мембраны (*lamina densa*), в то время как ламинин входит в состав «прозрачной» пластинки (*lamina lucida*) [18, 32]. Относительно недавно идентифицированный новый тип коллагена (VII) является составной частью так называемых заякоривающих фибрилл, участвующих в дермоэпидермальных контактах [32, 66]. Особенности локализации белков матрикса определяют своеобразие морфологических и клинических проявлений, молекулярная основа которых состоит в нарушении структуры и биосинтеза этих белков. Например, тяжесть клинической картины при синдроме Гудпасчера, обусловленном дезагрегацией коллагена IV типа, связана, очевидно, с деструкцией *lamina densa* — «сердцевинной» части базальной мембраны и вызванного этим глубоким нарушением ее функций, прежде всего тех, которые регулируют взаимодействие между эпителием и эндотелием, с одной стороны, и клетками мезенхимального происхождения — с другой.

Имуноморфологический анализ кожи больных, страдающих одной из форм кожного заболевания (*Epidermolys bullosa*), клинически сходного с пузырчаткой, показал, что дерма этих больных существенно слабее связывает антитела к коллагену VII типа по сравнению с дермой здоровых людей [32]. Снижение синтеза коллагена VII типа или усиление его распада (предполагается, что клетки дермы больных в отличие от здоровых лиц продуцируют коллагеназу, расщеп-

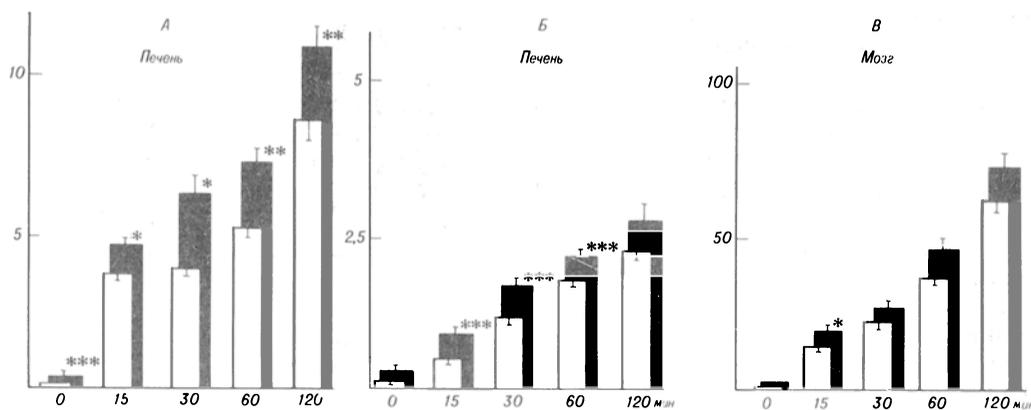


Рис. 3. Влияние хронического введения промедола на интенсивность индуцируемого Fe-АДФ-аскорбатом (А) и гидроперекисью третбутила (Б) ПОЛ в гомогенатах тканей крыс. Обозначения те же, что на рис. 2.

о повреждающем влиянии морфина на мышечную ткань. Кроме того, в плазме подопытных крыс заметно возрастает количество перекисей липидов.

Аналогичные результаты получены при хроническом введении крысам промедола. На рис. 3 показано, что интенсивность индуцируемого ПОЛ в гомогенате печени заметно увеличивается в результате действия этого наркотического средства. Так же, но менее эффективно, промедол влияет и на ткань мозга.

Таким образом, длительное введение наркотических веществ вызывает в ткани печени и мозга такие изменения, которые способствуют более активному протеканию в них ПОЛ. Кроме того, более высокие уровни перекисей липидов в плазме морфинизированных крыс свидетельствуют о фактическом возрастании ПОЛ *in vivo*. Источник дополнительного поступления перекисей липидов в систему циркуляции трудно определить. Вполне возможно, что таким источником является печень. Во-первых, здесь весьма заметно возрастает способность липидов к перекислению. Во-вторых, именно печень наряду с почками в основном регулирует состав компонентов плазмы крови. Возможные причины активации наркотическими веществами ПОЛ обсуждались выше. Здесь следует остановиться на 2 определяющих факторах. Интенсивность индуцируемого ПОЛ зависит от доступности субстрата, т. е. полиненасыщенных жирных кислот. Однако, каким образом наркотики влияют на жирнокислотный состав липидов гепатоцитов, пока неизвестно. Вторая и одна из наиболее важных причин активации ПОЛ — ослабление системы антиокислительной защиты. Этот вопрос, однако, нуждается в более подробном изучении. Согласно нашим данным, некоторое снижение концентрации GSH в ткани печени (контроль — $4,65 \pm 0,4$ мкмоль на 1 г ткани; опыт с введением морфина — $3,81 \pm 0,4$ мкмоль/г) и активности каталазы (контроль — $0,29 \pm 0,03$ отн. ед. на 1 мг белка; опыт — $0,23 \pm 0,02$ отн. ед. на 1 мг белка) не достигает статистической достоверности.

Для понимания смысла активации ПОЛ в липидах мозга необходимо выяснить, является ли она следствием патогенного или адаптационного процесса. ПОЛ постоянно протекает в клетках в нормальных условиях и направлено на увеличение жесткости липидного бислоя мембраны [61]. В то же время морфин при однократном введении оказывает на мембрану разжи-

жающее действие [32]. Уместно предположить, что в нервной ткани активация ПОЛ противодействует эффектам наркотиков и способствует адаптации клетки на уровне мембраны. Однако в случае чрезмерности и длительности такой активации возрастает значение патогенных последствий ПОЛ.

Токсичность другого распространенного наркотика кокаина, являющегося местным анестетиком и психостимулятором, может определяться теми же механизмами, которые выше обсуждались для морфина. Однократное введение кокаина мышам вызывает развитие ожирения печени и центрально- долевого или перипортального некроза. Метаболизм этого лекарства включает N-деалкилирование до норкокаина и гидролиз эфирных групп с образованием экгонина, бензоилэкгонина или бензоилнорэкгонина. В то время как однократные инъекции кокаина и норкокаина мышам в дозах соответственно 50 и 35 мг/кг приводили к 150-кратному повышению активности сывороточной АЛТ, экгонин и бензоилэкгонин были нетоксичны даже при дозе 100 мг/кг [59]. Необходимо отметить, что токсический эффект кокаина и норкокаина ярко проявляется только после предварительного введения животным индуктора цитохрома P-450 фенобарбитала. Потенцирующее действие оказывает также фосфорорганическое соединение диазинон, которое ингибирует эстеразы и тормозит превращение кокаина в неактивные дезэтерифицированные метаболиты. В то же время ингибиторы неспецифических микросомальных монооксигеназ SKF-525 и хлорамфеникол снижали гепатотоксичность кокаина. Показано, что наркокаин претерпевает дальнейшее окисление до N-оксиноркокаина, вызывающего серьезные повреждения клеток печени. Однако и этот метаболит был эффективен после индукции фенобарбиталом цитохрома P-450, но не в присутствии его ингибиторов.

В более поздних исследованиях на препарате микросом мозга крысы продемонстрировали окисление N-оксиноркокаина до 1-нитроксиноккокаина [36]. При восстановлении последнего образуются нитроксидные радикалы и супероксидный анион, способные запускать реакции ПОЛ. И действительно, инкубация микросом мозга в присутствии N-оксиноркокаина или 1-нитроксиноккокаина приводила к резкой активации ПОЛ [36]. Кокаин оказывал небольшой стимулирующий эффект на скорость ПОЛ и в препара-

те митохондрий мозга [23]. Было также установлено влияние кокаина на интенсивность перекисных процессов в липидах печени *in vivo* [45]. Через 5 ч после внутривенной инъекции кокаина (50 мг/кг) мышам, предварительно получавшим фенобарбитал, концентрация МДА в печени возрастала в 3 раза, а содержание GSH уменьшалось на 30 %. Антиоксиданты диферроксамин и диэтилдитиокарбамат, связывающие свободное железо и этим тормозящие инициацию ПОЛ, препятствовали накоплению МДА и истощению запасов GSH. В то же время введение животным соединений с активной сульфгидрильной группой, например цистеина в дозе 300 мг/кг, оказывало защитное действие против кокаинового поражения печени [59]. Таким образом, ПОЛ может играть заметную роль и в механизме токсического действия кокаина.

Патогенные последствия введения кокаина могут быть опосредованы его способностью блокировать дофаминовые рецепторы. Этот феномен обсуждают как одну из причин скоропостижной смерти у кокаиновых [37]. Вместе с тем в мембранах синапсом полосатого тела мозга крыс обнаружены высокоаффинные участки связывания кокаина с $K_d=35$ нм в количестве 2—3 пмоль на 1 мг белка [16]. Кокаин и его аналоги тормозили захват дофамина пропорционально их способности связываться с указанными высокоаффинными участками, а дофамин понижал средство кокаина к его «рецепторам» в присутствии Na без изменения величины V_{max} .

Наконец, следует упомянуть о том, что при инфузии кокаина в кровяное русло концентрация в крови адреналина, норадреналина и дофамина возрастает в 2—3 раза [55]. Это сопровождается изменением функциональных параметров сердечной деятельности: увеличением времени синоатриальной проводимости, времени проведения импульса в атриовентрикулярном узле, удлинением интервала *PR* цикла сокращений. В некоторых случаях наблюдается фибрилляция предсердий. Механизм функциональных отклонений на фоне введения кокаина в данном случае, по-видимому, опосредован катехоламинами.

Препараты индийской конопли (марихуана, гашиш), кроме основного эйфоригенного агента Δ^9 -тетрагидроканнабинола (ТГК), содержат более 60 других каннабиноидов, а также 360 различных веществ, таких как стеролы, терпены, флавоноиды, производные фурана и алкалоиды [50]. В дыме сигареты с марихуаной в газовой фазе можно обнаружить окись углерода, ацетальдегида, акролеин, толуол, нитрозамин, винилхлорид, а в фазе частиц — фенол, крезол и другие вредные вещества. Дым такой сигареты по сравнению с табачной содержит в 2 раза больше нафталина и канцерогенов (бензантрацен, бензпирен). Сам по себе ТГК характеризуется довольно низкой острой токсичностью и в отличие от морфина не вызывает угнетение дыхательного центра. Кроме того, физическая зависимость от этого вещества или вообще не развивается, или выражена слабо. Тем не менее сообщалось немало фактов о деструктивном эффекте каннабиноидов на репродуктивную функцию организма, которая нарушалась на всех этапах и у всех видов жи-

вотных (рыбы, птицы, грызуны, собаки, обезьяна, человек) [50].

Токсическое действие ТГК проявляется уже на стадии образования гамет. Предполагают, что этот психомиметик ингибирует энергетические процессы в клетках тестикул и, кроме того, стимулирует секрецию андрогенсвязывающего белка [33]. Не исключено, что именно эти нарушения лежат в основе наблюдаемой у курильщиков марихуаны олигоспермии. Как сам ТГК, так и его менее психоактивные производные каннабинол и каннабидиол вмешиваются в процесс гипофизарной секреции половых гормонов (фолликулостимулирующего, лютеинизирующего и пролактина). Введение каннабиноидов во время пренатального развития весьма неблагоприятно отражается на функции тестикул и сексуальном поведении взрослого животного, что соответствует угнетающему влиянию этих веществ на секрецию андрогенов у плода и новорожденного [22]. Добавление ТГК к зрелой плаценте *in vitro* сопровождается ингибированием транспорта α -аминоизобутирата и валина, причем эффект приобретает существенный характер, начиная с концентрации каннабиноида 20 мкМ [26]. Поскольку рост плода зависит от перехода питательных веществ через плаценту, эти данные могут объяснять известные факты о внутриутробной задержке развития плода при длительном использовании матерью препаратов каннабиса.

Предпочтительное влияние ТГК на репродуктивную систему трудно объяснить, так как это вещество весьма липофильно и легко распределяется в липидной фазе многих клеток. Кроме того, пока отсутствует информация о наличии специфического рецептора или мест связывания для самого ТГК или его производных. Можно предположить, что некоторые токсические эффекты препаратов каннабиса опосредованы разнообразными токсикогенными примесями. Как любой материал, который курят, марихуана вызывает бронхит и эмфизему легких. Причем при сравнении последствий выкуривания равных по весу сигарет с марихуаной и табаком обнаружили, что в первом случае возрастание уровня карбоксигемоглобина в крови примерно в 5 раз, а количество дегтя, осевшего в ткани легких, на $1/3$ больше, чем во втором [65]. Сообщалось о влиянии каннабиноидов на функцию сердца, включая изменения рабочей нагрузки, увеличение объема плазмы и постуральную гипотензию [33].

Цитотоксичность ТГК продемонстрировали на лейкоцитах периферической крови человека при концентрации вещества в среде инкубации 20 мкг/мл [56], однако дезорганизация функций клеток наблюдается под влиянием более низких концентраций. Например, киллерная активность лейкоцитов в отношении опухолевых клеток ингибируется в присутствии 5 мкг/мл ТГК. Такая же доза каннабиноида оказывает угнетающее действие на способность перитонеальных клеток мышей распространяться по поверхности стекла, а при более высоких дозах ингибируется и функция фагоцитоза [40]. Определенной биологической активностью обладают и некоторые метаболиты ТГК, например Δ^1 -тет-

рагидроканнабинол-7-овая кислота, которая тор- мозит стимулируемый ТГК синтез простагланди- нов [13].

Информация об эффектах каннабиноидов на субклеточном уровне весьма ограничена. Известно, что ТГК претерпевает метаболическую активацию в системе микросомальных оксигеназ и способен модулировать фармакологическое действие некоторых лекарств [45]. Аналогичное влияние оказывает каннабидиол [62]. Метаболическая активация этого вещества в микросомах печени сопровождается деградацией цитохрома Р-450 и в результате ингибированием анилин- гидроксилазной и нитроанизолдеметилазой активности. Недавно показано, что ТГК при внутривенном введении вызывает снижение концентрации спермидина в коре и среднем мозге крысы [39]. Смысл этих изменений трудно объяснить, так как основная роль спермидина, как и близкого ему полиамина спермина, состоит в регуляции быстрого деления и роста клеток. Если аналогичные сдвиги провоцируются ТГК и в клетках герминативных органов, они могут иметь непосредственное отношение к эффектам препаратов каннабиса на систему репродукции.

Таким образом, тонкие молекулярные механизмы, лежащие в основе действия наркотических веществ на клетку, пока остаются невыясненными. В настоящее время наметились направления, по которым можно ожидать получение наиболее существенных результатов. К ним прежде всего можно отнести изучение специфических эффектов наркотика на мембрану в области активного центра или модулирующего участка рецептора, а также неспецифическое влияние на липидные домены в микроокружении важных для функции мембраны компонентов (ионные каналы, ферменты, рецепторы). Не менее весомой является проблема метаболической активации наркотических веществ до более токсичных продуктов, идентификации всего набора их промежуточных метаболитов и соотношения путей превращения наркотиков в организме при различных условиях. Существенное значение для понимания механизмов токсичности наркотиков имеет выяснение характера взаимодействия их активных производных, например свободнорадикальных форм, с жизненно важными компонентами клеток (ферменты, нуклеиновые кислоты, липиды) и способность их запускать или стимулировать естественные процессы деградации, такие как ПОЛ. Наконец, раскрытие механизмов изменения адаптационных возможностей организма в результате длительного применения наркотических лекарств может помочь выработать лечебные приемы для улучшения соматического состояния больного наркоманией.

ЛИТЕРАТУРА

- Архипенко Ю. В., Джалпаридзе Л. М., Гуткин Д. В. и др. // Вопр. мед. химии.— 1987.— № 1.— С. 122—137.
- Бахова Л. К., Фадеева Т. К. // Там же.— 1988.— № 1.— С. 22—25.
- Годилов П. П., Давыдов Б. В., Матвеев С. Б. // Там же.— 1987.— № 1.— С. 47—50.
- Каган В. Е., Архипенко Ю. В., Меерсон Ф. З., Козлов Ю. П. // Биохимия.— 1983.— № 7.— С. 1141—1148.
- Каган В. Е., Савов В. М., Диденко В. В., Архипенко Ю. В. // Бюл. экпер. биол.— 1983.— № 4.— С. 46—48.
- Соколовский В. В. // Вопр. мед. химии.— 1988.— № 6.— С. 2—11.
- Тадевосян Ю. В., Карагезян К. Г., Геворкян Г. А., Батукян Т. Б. // Бюл. экпер. биол.— 1985.— № 11.— С. 553—554.
- Albano E., Poli G., Chiarpotto E., Biasi F. et al. // Chem.— Biol. Interact.— 1983.— Vol. 47.— P. 249—263.
- Aldrich T. K., Fisher A. B., Cadenas E., Chance B. // J. Lab. clin. Med.— 1963.— Vol. 101.— P. 66—78.
- Amzel V., van der Hoeven T. // Fed. Proc.— 1978.— Vol. 37.— P. 305.
- Bandy B., Davison A. J. // Arch. Biochem.— 1987.— Vol. 259.— P. 305—315.
- Becquemín J. P., Elienne G., Schaeffer A. et al. // J. Mal. vasc.— 1986.— Vol. 11.— P. 35—38.
- Burslein S., Hunter S. A., Latham V., Renzulli L. // Biochem. Pharmacol.— 1986.— Vol. 35.— P. 2553—2558.
- Cadenas E., Sies H. // Europ. J. Biochem.— 1982.— Vol. 124.— P. 349—356.
- Caisova D., Eybl V. // Plzeň. lek. Sborn.— 1986.— Suppl. 53.— P. 125—126.
- Calligaro D. O., Eldefrawi M. E. // Membrane Biochem.— 1988.— Vol. 7.— P. 87—106.
- Cardinale G. J., Donnerer J., Finck A. D. et al. // Life Sci.— 1987.— Vol. 40.— P. 301—306.
- Chang Y.-Y. H., Ho J. K. // Biochem. Pharmacol.— 1979.— Vol. 28.— P. 1373—1377.
- Cohen R., Heikkila R. E. // J. biol. Chem.— 1974.— Vol. 249.— P. 2447—2452.
- Comporti M. // Lab. Invest.— 1985.— Vol. 53.— P. 599—623.
- Correia M. A., Wong J. S., Salivan E. // Chem. Biol. Interact.— 1984.— Vol. 49.— P. 255—268.
- Dalterio S. L., Michael S. D., Thomford P. J. // Neurobehav. Toxicol. Teratol.— 1986.— Vol. 8.— P. 391—397.
- Das N. P., Ratty A. K. // Biochem. Med. Metabol. Biol.— 1987.— Vol. 37.— P. 258—264.
- Dybing E., Nelson S. D., Mitchell J. R. et al. // Molec. Pharmacol.— 1976.— Vol. 12.— P. 911—920.
- Feigelson E. B., Pfaff W. W., Karmen A., Steinberg D. // J. clin. Invest.— 1961.— Vol. 40.— P. 2171—2179.
- Fisher S. E., Atkinson M., Chang B. // Pediat. Res.— 1987.— Vol. 21.— P. 104—107.
- Gilder S. B. // S. Afr. med. J.— 1987.— Vol. 71.— P. 1.
- Golbe L. I., Merkin M. D. // Neurology.— 1986.— Vol. 36.— P. 1602—1604.
- Gould L., Gopalaswamy C., Patel C., Betzu R. // N. Y. St. J. Med.— 1985.— Vol. 85.— P. 660—661.
- Halliwel B., Gutteridge J. M. C. // Molec. Aspects. Med.— 1985.— Vol. 8.— P. 89—103.
- Hecker E., Fiedli W. G. // Schweiz. med. Wschr.— 1988.— Bd 118.— S. 1982—1988.
- Heron D. S., Sjnitzky M., Zamir N., Samuel D. // Biochem. Pharmacol.— 1982.— Vol. 31.— P. 2435—2438.
- Husain S., Khan I. // Bull. Narc.— 1985.— Vol. 37.— P. 3—13.
- Irelton J., Gust I. D., Moon W. J. // Aust. N. Z. J. Med.— 1974.— Vol. 4.— P. 44.
- Jahannesson T., Woods L. A. // Acta pharmacol. (Kbh.).— 1964.— Vol. 21.— P. 381—396.
- Kloss M. W., Rosen G. M., Rauckman E. J. // Psychopharmacology.— 1984.— Vol. 84.— P. 221—224.
- Kosten T. R., Kleber H. D. // Amer. J. Drug. Alcohol Abuse.— 1988.— Vol. 14.— P. 335—346.
- Kosterlitz H. W. // Nature.— 1987.— Vol. 330.— P. 606.
- Lewis C. J., Fennesy M. R., Verberne A. J. M. et al. // Neurochem. int.— 1986.— Vol. 9.— P. 99—102.
- Lopez-Cepero M., Friedman M., Klein T., Friedman H. // J. Leucocyte Biol.— 1986.— Vol. 39.— P. 679—686.
- Marks V., Chapple P. A. L. // Brit. J. Addict.— 1967.— Vol. 62.— P. 189—196.
- Menashe Ph. I., Gottlieb J. E. // Scoth. med. J.— 1988.— Vol. 81.— P. 379—381.
- Misra A. L., Mitchell C. L., Woods L. A. // Nature.— 1971.— V. 1. 232.— P. 48—50.
- Moore T. R., Sorg J., Miller L. et al. // Amer. J. Obstet. Gynec.— 1986.— Vol. 155.— P. 883—888.
- Morrill G. A., O'Connell M. E., Kostellow A. B., Levine W. G. // Pharmacology.— 1985.— Vol. 30.— P. 20—24.
- Murray R. J., Albin R. J., Mergner W., Criner G. J. // Chest.— 1988.— Vol. 93.— P. 427—429.
- Nagamatsu K., Kido Y., Terao T. et al. // Life Sci.— 1982.— Vol. 30.— P. 1121—1127.

48. Nagamatsu K., Kido Y., Terao T. et al. // *Ibid.*— Vol. 31.— P. 1451—1457.
49. Nagamatsu K., Ohno Y., Ikebuchi H. et al. // *Biochem. Pharmacol.*— 1986.— Vol. 35.— P. 3543—3548.
50. Nahas G., Frick H. C. // *Neurotoxicology.*— 1986.— Vol. 7.— P. 381—396.
51. *Narcotic Drugs: Biochemical Pharmacology.*— New York, 1971.
52. Needham W. P., Schuster L., Kanel G. C., Thompson M. L. // *Toxicol. appl. Pharmacol.*— 1981.— Vol. 58.— P. 157—170.
53. Ohno Y., Nagamatsu K., Kawanishi T. et al. // *Biochem. Pharmacol.*— 1988.— Vol. 37.— P. 2862—2863.
54. Oster A. G. // *Med. J. Aust.*— 1977.— Vol. 1.— P. 497—499.
55. Schwartz A. B., Boyle W., Janzen D., Jones R. T. // *Canad. J. Cardiol.*— 1988.— Vol. 4.— P. 188—192.
56. Specter S. C., Klein T. W., Newton C. et al. // *Int. J. Immunopharmacol.*— 1986.— Vol. 8.— P. 741—745.
57. Steer M. L., Levitzky A. // *Arch. Biochem.*— 1975.— Vol. 167.— P. 371—376.
58. Tazelaar H. D., Karch S. B., Stephens B. G., Billingham M. E. // *Hum. Path.*— 1987.— Vol. 18.— P. 195—199.
59. Thompson M. L., Shuster L., Shaw K. // *Biochem. Pharmacol.*— 1979.— Vol. 28.— P. 2389—2395.
60. Thureson-Klein A., Wang-Yang J., Ho I. K. // *Experientia (Basel).*— 1978.— Vol. 34.— P. 773—774.
61. Ungemach F. R. // *Chem. Phys. Lipids.*— 1987.— Vol. 45.— P. 171—205.
62. Watanabe K., Arai M., Narimatsu S. et al. // *Biochem. Pharmacol.*— 1987.— Vol. 36.— P. 3371—3377.
63. Wilkins C. E., Mathur V. S., Ty R. C., Hall R. J. // *Tex. Heart. Inst. J.*— 1985.— Vol. 12.— P. 385—387.
64. Woods L. A. // *J. Pharmacol. exp. Ther.*— 1954.— Vol. 112.— P. 158—175.
65. Wu T. C., Tashkin D. P., Dhahed B., Rose J. E. // *New Engl. J. Med.*— 1988.— Vol. 318.— P. 347—351.
66. Yamano S., Kageura E., Ishida T., Taki S. // *J. biol. Chem.*— 1985.— Vol. 260.— P. 5259—5264.

Поступила 19.12.89

© А. К. БЕЛОУСОВА, 1991

УДК 615.277.3.015.44:616-018.15

А. К. Белоусова

ПРОТИВООПУХОЛЕВЫЕ ПРЕПАРАТЫ КАК ИНДУКТОРЫ ДИФФЕРЕНЦИРОВКИ ОПУХОЛЕВЫХ КЛЕТОК

Всесоюзный онкологический научный центр АМН СССР, Москва

Накопившиеся за последнее десятилетие данные о возможности индукции дифференцировки опухолевых клеток *in vitro*, а иногда и *in vivo* [2, 8, 24, 47] поколебали представление о необратимости злокачественной трансформации клеток. Эти данные свидетельствуют о том, что некоторые опухоли сохраняют генетическую информацию для завершения дифференцировки, но в силу каких-то неизвестных пока причин не могут ее экспрессировать. Индукторы дифференцировки устраняют это препятствие и в той или иной мере возвращают опухолевым клеткам утраченную способность к дифференцировке.

Индукторами дифференцировки опухолевых клеток могут быть соединения самой различной структуры. Одни из них — полярные соединения (диметилсульфоксид, диметилформамид, маслянокислый натрий) эффективны в концентрациях порядка 10—100 мкМ. Они индуцируют дифференцировку *in vitro* клеток мышинного эритролейкоза Френда в ортохромные нормобласты [47], промиелоцитарного лейкоза человека HL-60 — в гранулоциты [24], клеток аденокарцином молочной

железы и толстой кишки — в эпителиальные клетки, нейробластом — в нейроны [36].

Другая группа индукторов дифференцировки опухолевых клеток представлена соединениями, повышающими внутриклеточный уровень сАМР. К ним относятся дибутирил-сАМР, стимуляторы аденилатциклазы, простагландины, а также ингибиторы фосфодиэстеразы сАМР — метилпурины (теофиллин, кофеин). Эти соединения в миллимолярных концентрациях индуцируют дифференцировку клеток некоторых эпителиальных опухолей и нейробластом [36, 38].

Среди природных индукторов дифференцировки опухолевых клеток наиболее эффективны 1 α ,25(ОН)₂-витамин D₃, ретиноевая кислота и опухолевый промотер тетрадеканойлфорболацетат (ТРА). В концентрациях от 1 нМ до 10 мкМ они индуцируют дифференцировку лейкозных клеток животных и человека, нейробластом, остеогенных сарком, эмбриональных и эпителиальных опухолей [36, 38].

Непрерывным условием индукции дифференцировки опухолевых клеток этими соединениями является наличие на поверхности или внутри клеточных специфических рецепторов с высоким средством к индуктору. Так, способность к дифференцировке под действием 1 α ,25(ОН)₂-витамина D₃ клеток лейкоза человека HL-60 и остеогенной саркомы крыс зависит от числа рецепторов этого витамина в цитозоле [17, 43]. Высокоаффинные рецепторы ретиноевой кислоты обнаружены в лейкозных клетках, опухолях молочной железы человека [24, 33, 42].

Что же касается ТРА и других форболовых эфиров жирных кислот, то их рецептором оказалась протеинкиназа С, — фосфолипид- и кальцийзависимый фермент, играющий ключевую роль в трансмембранной передаче и модуляции сигналов, которые возникают при взаимодействии факторов роста или дифференцировки с их специфическими рецепторами [14, 41]. В организме такими факторами являются гормоны и нейромедиаторы.

Довольно большую группу индукторов дифференцировки опухолевых клеток составляют противоопухолевые препараты. Среди них самый сильный — актиномицин D, вызывающий в концентрациях 4—10 нМ дифференцировку 85—95 % лейкозных клеток *in vitro* [24, 36]. Другой антибиотик — туникамицин, специфический ингибитор синтеза мембранных гликопротеидов, индуцирует дифференцировку лейкозных клеток в более высоких концентрациях [31]. Из антрациклинов наибольшей индуцирующей способностью в отношении лейкозов обладают трисахаридные антибиотики марцелломицин и аклациномицин. В концентрациях 30—40 нМ они вызывают дифференцировку 50 % клеток лейкоза человека HL-60 и 100 % клеток мышинного лейкоза МЭЛ. Моносахаридный антибиотик адриамицин индуцирует дифференцировку клеток МЭЛ и меланомы В16-F10 [36, 39]. Антибиотики алкилирующего типа — митомицин С и блеомицин оказались сильными индукторами дифференцировки лейкозов, нейробластом, эмбриональных карцином [36], так же, как и многие антиметаболиты — метотрексат [24], 5-азациитидин и 5-аза-2'-дезоксцитидин [28, 35, 36], цитозар, 6-тиогуанин [2, 10, 24, 36, 39].

Необходимо подчеркнуть, что все противоопухолевые препараты индуцируют дифференцировку опухолевых клеток в крайне низких концентрациях, не оказывающих прямого цитотоксического действия.

Возможность вызвать с помощью синтетических и природных соединений дифференцировку клеток различных опухолей послужила стимулом для зарождения нового направления в терапии опухолей, основанного на сочетании цитостатиков с индукторами дифференцировки [8, 29, 39, 47]. Полагают, что «комбинированная терапия, направленная на уничтожение части популяции опухолевых клеток путем индукции их созревания или клеточной гибели, весьма перспективна. А тот факт, что некоторые противоопухолевые препараты являются сильными индукторами дифференцировки, может иметь значение для их лечебного эффекта» [29].

Сейчас это новое перспективное направление в химиотерапии опухолей лишь начинает выходить за рамки экспериментальных исследований. Получены первые положительные результаты по лечению больных с острыми лейкозами и миелодиспластическим синдромом низкими дозами цитозара (10 мг/м^2 каждые 12 ч в течение 21 дня) [15, 22, 23]. Полные ремиссии при остром миелолейкозе получены в 30–60%. Считают, что эффект малых доз цитозара может быть обусловлен как индукцией дифференцировки лейкозных клеток, так и цитотоксическим действием. Для обоснования и внедрения нового направления химиотерапии в практику предстоит еще решить многие задачи.

Необходимо расширить круг опухолей человека, способных к дифференцировке, а также круг соединений, в том числе и противоопухолевых, обладающих свойствами индукторов дифференцировки. Очень важно углубление наших знаний о молекулярных механизмах процесса дифференцировки и механизмах действия индукторов. Наиболее перспективным путем для решения двух первых задач представляется детальное изучение рецепторного аппарата опухолей человека, плохо поддающихся цитотоксической терапии. К ним относятся опухоли репродуктивных органов, легких, желудка, кишечника, нейроblastомы, меланомы.

Как известно, эффективность эндокринной терапии опухолей молочной железы, эндометрия, простаты, щитовидной железы связана не только с восстановлением нарушенного гормонального гомеостаза организма, но и с прямым дифференцировочным действием гормонов на опухолевую клетку через специфические высокоаффинные рецепторы [3, 4, 25]. Поэтому углубление наших знаний об особенностях рецепторного аппарата той или иной опухоли создает возможности для использования в качестве индукторов дифференцировки целого спектра гормонов, их аналогов и фрагментов. Не менее важно изучение молекулярных механизмов индукции дифференцировки опухолевых клеток известными индукторами, включая противоопухолевые препараты, и выяснение природы их рецепторов.

В настоящее время более других изучен механизм индукции дифференцировки опухолевых клеток форболовыми эфирами жирных кислот.

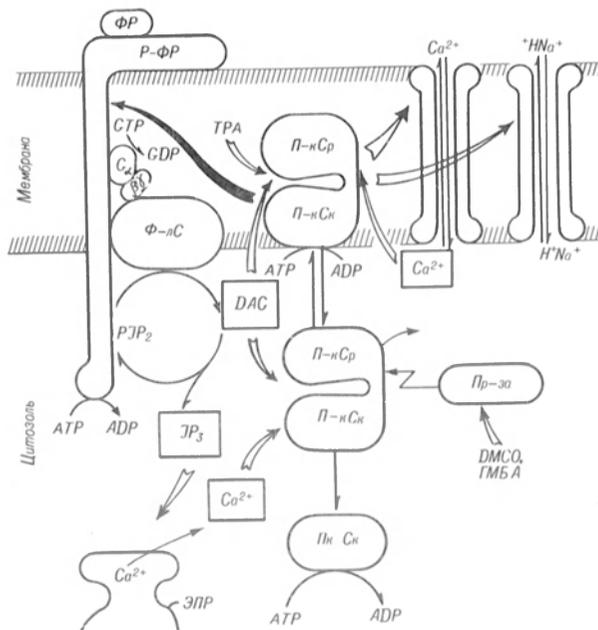


Схема активации протеинкиназы С факторами роста и некоторыми индукторами дифференцировки опухолевых клеток.

ФР — фактор роста, Р-ФР — рецептор фактора роста, обладающий тирозин-протеинкиназной активностью, G — GTP — связывающий белок, передающий ростовой сигнал на фосфолипазу С (Ф-л С), РИР — фосфатидилинозитдифосфат, субстрат Ф-л С, ДАС — диацилглицерид, специфический активатор протеинкиназы С (П-кС), IP₃ — инозиттрифосфат, стимулятор освобождения связанного кальция, ЭПР — эндоплазматический ретикулум, П-кС_р — регуляторный домен протеинкиназы С, П-кС_к — каталитический домен П-кС, Пр-за — протениаза, расщепляющая П-кС на регуляторный и каталитический домены, ТРА — тетрадеканойлфорболацетат, ДМСО — диметилсульфоксид, ГМБА — гексаметиленбисацетамид. Направление реакций и транспорта ионов обозначено стрелками, активация ферментов, рецепторов и ионных каналов обозначено белыми стрелками, угнетение — черными.

Эти соединения обладают способностью прочно и с высоким сродством связываться с протеинкиназой С. В покоящихся клетках протеинкиназа С неактивна и локализована преимущественно в цитозоле. Взаимодействие фактора роста с рецептором приводит к активации фосфолипазы С, которая расщепляет фосфатидилинозит на диацилглицерид и трифосфоинозит (см. рисунок). Диацилглицерид — специфический активатор протеинкиназы С, связываясь с ферментом в присутствии кальция, вызывает его транслокацию из цитозоля в плазматическую мембрану. Активированная мембранная форма протеинкиназы С катализирует фосфорилирование ряда белков, в результате чего начинается усиленное поступление в клетку кальция, натрия и многих метаболитов, синтез полиаминов и целый каскад реакций, приводящих к репликации ДНК и делению клетки [2, 47]. Одним из ранних событий, связанных с действием факторов роста, является активация многих онкогенов (*fos*, *myb*, *myc*, *ras*, *erb B* и др.) [47]. Форболовые эфиры жирных кислот, благодаря структурному сходству с диацилглицеридами, связываются с протеинкиназой С, вызывая ее перманентную активацию, независимую от продукции диацилглицеридов. Фосфорилирование протеинкиназой С рецептора фактора роста блокирует трансмембранную передачу ростовых сигналов и делает клетку более чувствительной к действию факторов дифференцировки. В результате происходит переключение метаболизма клетки в сторону дифференцировки: замедляется транспорт ионов и метаболитов, подавляется экс-

прессия онкогенов, синтез полиаминов, возникают митотические блоки [1, 24, 47].

Индукция дифференцировки опухолевых клеток полярными соединениями — диметилсульфоксидом, диметилформамидом, гексаметиленбисацетамидом, также осуществляется с участием протеинкиназы С. Эти соединения активируют протеиназы цитозоля, отщепляющие от молекулы протеинкиназы С ее каталитическую часть (см. рисунок). В результате протеолиза протеинкиназа С становится независимой от кальция и фосфолипидов и начинает фосфорилировать белки и ферменты, необходимые для выполнения программы дифференцировки [32, 37]. Изменение уровня свободного кальция в опухолевых клетках под действием витамина D₃ и его производных, видимо, также приводит к активации кальций-независимой протеинкиназы С [11, 32].

Большая группа соединений, повышающих уровень сАМР в опухолевых клетках, реализует свой дифференцировочный эффект через сАМР-зависимую протеинкиназу А [36, 38]. Синергично с ними действуют ретиноиды [32, 40]. Таким образом, ключевую роль в механизмах действия известных индукторов дифференцировки опухолевых клеток играют протеинкиназы С и А.

Рассматривая вопрос о механизмах индукции дифференцировки опухолевых клеток противоопухолевыми препаратами разных классов, мы исходим из представления о том, что дифференцировка — необходимый компонент их противоопухолевого эффекта. Поэтому, на наш взгляд, в механизмах цитотоксического и дифференцировочного действия должны быть общие черты.

В отношении механизма дифференцировочного эффекта актиномицина D, самого сильного индуктора среди цитостатиков, намечались две точки зрения. Так, считают [44], что в его основе лежит специфическое взаимодействие антибиотика с G:C парами ДНК, которое приводит к дестабилизации ее структуры, задержке клеток в фазе G₁ митотического цикла, угнетению синтеза ДНК, РНК и белков. Исследуя механизмы индукции дифференцировки клеток миелоидного лейкоза человека ML-1 в моноциты и макрофаги актиномицином D (1·10⁻¹⁰ M) и дауномицином (5,6·10⁻⁹ M), наблюдали [21] накопление клеток в фазе G₁ митотического цикла и угнетение синтеза мРНК 7 исследованных протоонкогенов (*myb*, *myc*, *fos*, *ras*, *sis*, *erb B*, *abl*). Но синтез специфических рецепторов и ферментов, характерных для зрелых моноцитов и макрофагов, начинается только при добавлении кондиционированной среды, содержащей факторы дифференцировки. Актиномицин D и дауномицин сенсебилизируют опухолевые клетки к действию природных факторов дифференцировки, делая возможным завершение этого процесса. Причиной дифференцировки считают взаимодействие антибиотиков с ДНК лейкозных клеток.

На наш взгляд, полученные данные свидетельствуют о сходстве биологических эффектов актиномицина D и дауномицина с дифференцирующим действием форболовых эфиров, что приводит к мысли и об единой мишени для них. Предположение о важной роли рецепторов плазматической мембраны в реализации противоопухолевого и дифференцировочного эффектов актиномицина D

находит подтверждение в ряде работ [5, 19]. Показано [19], что противоопухолевый эффект актиномицина D коррелирует не с поглощением его клетками и угнетением синтеза РНК и ДНК, но с числом рецепторов для конканавалина А на поверхности клетки. На поверхности клеток асцитной саркомы 37 обнаружены высокоаффинные рецепторы актиномицина D (K_d = 3–4 пМ) [5]. Число рецепторов составляет 5–9 тыс. на клетку. β-адреноблокатор пропранолол (10⁻⁶ M) и холинблокатор спазмолитин (10⁻⁶ M) резко уменьшают специфическое связывание ³H-актиномицина D с его рецепторами, не изменяя их сродства к антибиотику.

Так как и β-адрено- и холинблокаторы вызывают закрытие кальциевых каналов и истощение пула свободного кальция в опухолевых клетках [9], наблюдаемый эффект можно объяснить тем, что истинной мишенью для актиномицина D является мембранная форма протеинкиназы С. В условиях дефицита кальция происходит транслокация значительной части фермента в цитозоль, и он становится недоступным для актиномицина D. Для проверки этого предположения нужны специальные исследования, но независимо от их результатов уже сейчас можно думать, что индукция дифференцировки опухолевых клеток актиномицином D начинается со связывания антибиотика с высокоаффинными рецепторами на плазматической мембране, что создает условия для реализации программы дифференцировки.

Антрациклиновые антибиотики — класс высокоэффективных препаратов, молекулярные механизмы противоопухолевого и побочного цитотоксического действия которых изучены достаточно хорошо. Общепринято представление о том, что в основе противоопухолевого действия антрациклинов лежит способность интеркалировать между полинуклеотидными цепями ДНК с последующим повреждением ее структуры и торможением синтеза ДНК и РНК. Кроме того, антрациклины, восстанавливаясь до семихинонов, стимулируют образование свободных радикалов, повреждающих плазматические, митохондриальные и ядерные мембраны [6, 26]. Повреждение мембран может иметь прямое отношение не только к побочным цитотоксическим эффектам, но и к противоопухолевому действию антрациклинов [6, 26, 46]. Нам представляется, что выяснение механизма мембранных эффектов антрациклинов может пролить свет и на причины индукции дифференцировки опухолевых клеток этими препаратами. О рецепторной природе мембранных эффектов косвенно свидетельствуют данные по снятию побочной кожной и кардиотоксичности и модуляции противоопухолевого эффекта антрациклинов нейромедиаторами и их антагонистами [12, 18], а также соединениями, влияющими на уровень свободного кальция в опухолевых клетках (трифторперазином, тамоксифеном) [20].

Получены данные об угнетении активности протеинкиназы С опухолевых клеток человека адриамицином и даунорубицином в концентрациях 100–150 мкМ [34]. При этом антрациклины блокируют связывание форболдibuтирата с ферментом. Угнетение активности протеинкиназы С и связывания форболового эфира с ферментом конкурентно снимаются фосфатидилсерином. Весьма

возможно, что протеинкиназа С является мишенью для проявления дифференцирующего действия антрациклинов.

Среди известных противоопухолевых препаратов к индукторам дифференцировки, по-видимому, могут быть отнесены и некоторые бифункциональные алкилирующие агенты. Так, хлорамбуцил, мелфалан и некоторые этилендиаминохиноны оказались ингибиторами высокоаффинной фосфодиэстеразы сАМР в клетках, чувствительных к ним опухолей [45]. Угнетение фермента ведет к накоплению в клетках сАМР, активации протеинкиназы А, фосфорилированию ядерных белков, регулирующих митоз, и митотическому блоку на границе фаз $G_2 - M$. Ничего подобного не происходит в опухолях, устойчивых к алкилирующим агентам. Изменения, вызываемые в чувствительных клетках цитостатиками, весьма сходны с теми, которые происходят под действием индукторов дифференцировки.

Установлено [1, 7], что угнетение мембранной фосфодиэстеразы сАМР опухолевых клеток сарколизинном (10^{-6} М) является результатом специфического связывания препарата с β -адренорецепторами. В клетках лейкоза L-1210 с индуцированной устойчивостью к сарколизину также обнаружены β -адренорецепторы, но они не сопряжены с аденилатциклазой и фосфодиэстеразой и не отвечают на введение сарколизина повышением уровня сАМР. Поскольку сарколизин не подавляет роста устойчивого лейкоза, можно утверждать, что его противоопухолевый эффект прямо зависит от наличия на поверхности клеток функционально активных β -адренорецепторов. Таким образом, некоторые бифункциональные алкилирующие агенты могут специфически связываться с β -адренорецепторами клеток чувствительных опухолей, вызывая в них повышение уровня сАМР, активацию протеинкиназы А и сопряженные с этим молекулярные события, характерные для процесса дифференцировки.

В противоопухолевом эффекте антибиотика алкилирующего типа, митомицина С, также существенную роль играет его взаимодействие с β -адренорецепторами клеток чувствительных опухолей, поскольку β -адренергические агонисты (изопротеренол, адреналин и тербутамин) в концентрациях $10^{-8} - 10^{-14}$ М, предварительно добавленные в среду, резко усиливают его цитотоксическое действие. При этом уровень сАМР в опухолевых клетках повышается вдвое и сохраняется гораздо дольше, чем под действием одного антибиотика; β -адреноблокатор пропранолол снимает этот эффект [27]. Таким образом, в механизмах дифференцирующего и противоопухолевого действия ряда бифункциональных алкилирующих агентов и антибиотиков алкилирующего типа существенную роль играет их взаимодействие с β -адренорецепторами опухолевых клеток и активация протеинкиназы А.

Молекулярные механизмы индукции дифференцировки опухолевых клеток антимагнетоболитами до сих пор не известны. Имеются лишь косвенные данные о том, что 6-тиогуанин индуцирует дифференцировку лейкозных клеток, не превращаясь в нуклеотид, и его дифференцирующий эффект предотвращается β -адрено- и холиноблокаторами [39]. Возможно, он действует через пуринергические рецепторы. Индуцирующий дифференци-

ровку эффект 5-азациитидина обычно связывают с его вмешательством в процессы метилирования ДНК [47].

Дифференцировочный эффект метотрексата также, по-видимому, реализуется через специфические рецепторы. Так как препарат обладает сильным антиэстрогенным действием, предполагалось, что он связывается с рецепторами эстрогенов. Однако позднее это предположение не подтвердилось [30]. Данные о стимуляции метотрексатом синтеза и секреции хориогонадотропина клетками хориоэпителиомы человека *in vitro* позволяют думать, что этот эффект реализуется через специфические рецепторы [13, 40]. Наиболее вероятным кандидатом на роль таких рецепторов являются белки, связывающиеся с высоким сродством фолиевую кислоту и найденные в цитозоле эритроцитов, лейкоцитов и лейкозных бластов человека и печени крысы [16, 48]. Эти белки, по-видимому, играют важную роль в регуляции процессов клеточной пролиферации и дифференцировки.

Итак, в настоящее время имеются прямые и косвенные доказательства специфического взаимодействия противоопухолевых препаратов — индукторов дифференцировки с мембранными рецепторами опухолевых клеток. Это взаимодействие вызывает фазовые изменения уровня кальция и циклических нуклеотидов в клетках и митотические блоки на границах фаз $G_2 - M$ или $G_1 - S$.

Исследования по выяснению природы рецепторов противоопухолевых препаратов в опухолевых клетках, их идентичности с рецепторами природных факторов роста и дифференцировки находятся в самом начале. Между тем расширение фронта таких исследований важно не только в теоретическом, но и в практическом плане. Оно позволит прогнозировать эффективность препаратов в отношении той или иной опухоли человека по наличию в ней функционально активных рецепторов для этих препаратов. Комбинированное применение цитостатиков с природными лигандами общих или сопряженных рецепторов позволит снять побочные токсические эффекты и усилить противоопухолевое действие.

Мы предлагаем гипотезу о двухфазном действии противоопухолевых препаратов — индукторов дифференцировки на гетерогенную популяцию опухолевых клеток: 1-я фаза — взаимодействие цитостатика с мембранными рецепторами до его проникновения в клетку, приводящее к фазовым изменениям уровней кальция, циклических нуклеотидов и других вторичных мессенджеров, остановке клеточных делений и гибели зрелых клеток. На этой фазе к действию цитостатиков чувствительны только клетки, сохранившие некоторые признаки дифференцировки, и в частности, рецепторы для цитостатика. 2-я фаза — поступление препарата в клетку и взаимодействие с внутриклеточными мишенями, приводящее к гибели субпопуляции активно делящихся, малодифференцированных клеток, не содержащих рецепторов. Противоопухолевый эффект является результатом суммирования обоих процессов.

ЛИТЕРАТУРА

1. Белоусова А. К., Солнцева Т. И., Хабаров С. В. // Биохимия. — 1985. — Т. 50. — С. 1909—1919.

2. Белоусова А. К. // Экспер. онкол.— 1987.— Т. 9, № 6.— С. 17—25.
3. Дильман В. М. Эндокринологическая онкология.— Л., 1983.
4. Механизмы противоопухолевого действия гормонов / Лазарев И. И., Шароухова К. С., Гончарова М. Г. и др.— М., 1974.
5. Солнцева Т. И., Власенкова И. К., Белоусова А. К. // Актуальные проблемы экспериментальной химиотерапии опухолей.— Черноголовка, 1987.— Т. 2.— С. 67—69.
6. Тараховский А. М., Жмарева Е. И., Ромоданов С. А. // Бюл. экспер. биол.— 1983.— Т. 99.— С. 86—88.
7. Хабаров С. В. // Там же.— Т. 103.— С. 715—717.
8. Bloch A. // Cancer Treat. Rep.— 1984.— Vol. 68.— P. 199—206.
9. Bodewei R., Fischer W., Hering S., Wollenberger A. // Biomed. biochim. Acta.— 1988.— Vol. 47.— P. 233—238.
10. Bodner A. G., Ting R. C., Gallo R. C. // J. nat. Cancer Inst.— 1981.— Vol. 67.— P. 1025—1029.
11. Brelvi Z. S., Christakos S., Studzinski G. P. // Lab. Invest.— 1986.— Vol. 55.— P. 269—273.
12. Bristow M. R., Billingham M. E., Daniels J. R. // Proc. Amer. Ass. Cancer Res.— 1979.— Vol. 20.— P. 118.
13. Brown P., Bagshawe K. D. // Brit. J. Cancer.— 1982.— Vol. 46.— P. 22—29.
14. Castagna M. R. // Biomed. and Pharmacother.— 1983.— Vol. 37.— P. 380—386.
15. Castagne S., Daniel M. T., Tilley H. et al. // Blood.— 1983.— Vol. 62.— P. 85—86.
16. Corrocher R., Pachor M. L., Bambana L. M. et al. // J. exp. clin. Cancer Res.— 1984.— Vol. 3.— P. 193—197.
17. Dokoh S., Donaldson C. A., Haussler M. R. // Cancer Res.— 1984.— Vol. 44.— P. 2103—2109.
18. Dorr R. T., Alberts D. S. // Ibid.— 1981.— Vol. 41.— P. 2428—2432.
19. Fico R. M., Chen T. K., Canellakis E. S. // Science.— 1977.— Vol. 198.— P. 53—56.
20. Gonapathi R., Grabowski D., Schmidt H. et al. // Cancer Res.— 1986.— Vol. 46.— P. 5553—5557.
21. Honma J., Honma C., Bloch A. // Ibid.— P. 6311—6315.
22. Jehn U., De Bock R., Haanen C. // Blut.— 1984.— Bd 48.— S. 255—261.
23. Jensen M. K., Ahlbom G. // Scand. J. Haemat.— 1985.— Vol. 34.— P. 261—263.
24. Koefler H. P. // Blood.— 1983.— Vol. 62.— P. 709—721.
25. Lippman M. E., Kasid A. // Cancer Treat. Rep.— 1984.— Vol. 68.— P. 265—280.
26. Mimnaugh E. G., Gram T. E., Trush M. // J. pharmacol. exp. Ther.— 1983.— Vol. 226.— P. 806—816.
27. Miyamoto K., Sanae F., Iwasaki M. et al. // Jap. J. Pharmacol.— 1982.— Vol. 32.— P. 1019—1026.
28. Momparter R. L., Bouchard J. // Leukemia Res.— 1985.— Vol. 9.— P. 1361—1366.
29. Morin M., Sartorelli A. // Cancer Res.— 1984.— Vol. 44.— P. 2807—2812.
30. Morris J. D., Stephen T. M. // Europ. J. Cancer.— 1983.— Vol. 47.— P. 433—437.
31. Nakayasu M., Terada M., Tomura G. et al. // Proc. nat. Acad. Sci. USA.— 1980.— Vol. 77.— P. 409—413.
32. Okazaki T., Mochizuki T., Tashima M. et al. // Cancer Res.— 1986.— Vol. 46.— P. 6059—6063.
33. Olsson J. L., Breitman T. R. // Ibid.— 1982.— Vol. 42.— P. 3924—3927.
34. Palayoor T. P., Stein J. M., Hait W. N. // Biochem. biophys. Res. Commun.— 1987.— Vol. 148.— P. 718—725.
35. Pinto A., Attadia V., Fisco A. et al. // Blood.— 1984.— Vol. 64.— P. 922—929.
36. Reiss M., Gamba-Vitalo C., Sartorelli A. // Cancer Treat. Rep.— 1986.— Vol. 70.— P. 201—208.
37. Rifkind R. A., Sheffery M., Marks P. A. // Blood Cells.— 1987.— Vol. 13.— P. 277—284.
38. Rupniak H. T., Rein G., Powell J. F. et al. // Cancer Res.— 1984.— Vol. 44.— P. 2600—2605.
39. Schwartz E. L., Ishiguro K., Sartorelli A. // Advanc. Enzyme Regul.— 1983.— Vol. 21.— P. 3—19.
40. Sekiya S., Kaiho T., Shirotake S. et al. // Amer. J. Obstet. Gynec.— 1983.— Vol. 1.— P. 67—69.
41. Sharkey N. A., Leach K. L., Beumberg P. M. // Proc. nat. Acad. Sci. USA.— 1984.— Vol. 81.— P. 607—610.
42. Skoog L., Humba S., Klintonborg C. et al. // J. Cancer clin. Oncol.— 1985.— Vol. 21.— P. 901—906.
43. Tanaka H., Abe E., Miura C. et al. // Biochem. J.— 1982.— Vol. 204.— P. 713—719.

44. Terada M., Epner E., Nudel U. et al. // Proc. nat. Acad. Sci. USA.— 1978.— Vol. 76.— P. 2795—2799.
45. Tisdale M. J. // Handbook exp. Pharmacol.— 1982.— Vol. 72.— P. 376—385.
46. Tritton T. R., Yee G. // Science.— 1982.— Vol. 217.— P. 248—250.
47. Tsiptsoglou A. S., Wong W. // Anticancer Res.— 1983.— Vol. 5.— P. 81—100.
48. Zamierowski M., Wagner C. // Biochem. biophys. Res. Commun.— 1974.— Vol. 60.— P. 81—87.

Поступила 21.12.89

© Д. А. СОРКИНА, 1991

УДК 612.124:612.6.052(048.8)

Д. А. Соркина

ГЕТЕРОГЕННОСТЬ СЫВОРОТОЧНОГО АЛЬБУМИНА

Симферопольский университет

К настоящему времени получены достаточно убедительные доказательства того, что молекулярная гетерогенность сывороточного альбумина (СА) не только обусловлена генетически, но и может явиться следствием постсинтетических перестроек структуры белка и изменения его физико-химических свойств в процессе функционирования [6, 8, 10, 23]. Современное представление о трехдоменной структуре организации СА (рис. 1) [17, 18] позволяет считать, что этот белок *in vivo* обладает гибкой структурой, обеспечивающей стерическую приспособляемость молекулы при связывании и транспорте различных низкомолекулярных метаболитов [22]. Учитывая разнокачественность специфических лигандов, присоединяющихся к циркулирующему в крови СА, можно допустить возможность возникновения этой системы изомеров белка [12, 45].

При традиционном электрофорезе на бумаге в слабощелочных буферах СА мигрирует от места нанесения к аноду в виде одной белковой зоны. Однако в некоторых случаях он проявляет гетерогенность и разделяется на две (или более) фракции, которые могут быть обнаружены с применением специальных условий электрофореза или другими методами фракционирования (ионообменная хроматография, изоэлектрофокусирование и др.). Можно выделить два основных типа гетерогенности СА, которые находятся в тесной зависимости от условий анализа. К первому типу относятся наследственные различия в аминокислотном составе белковых вариантов — так

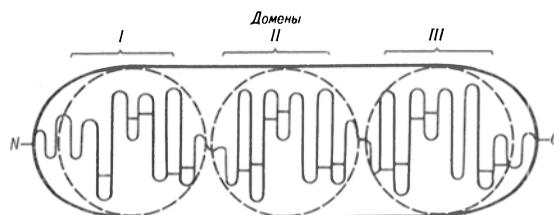


Рис. 1. Трехдоменная модель сывороточного альбумина. Петлевая укладка полипептидной цепи [32].

N и C — соответствующие концевые участки полипептидной цепи. Поперечные черточки в петлях — дисульфидные мостики.

называемый генетически обусловленный полиморфизм [15, 23]. Второй тип — это гетерогенность СА, обусловленная наличием в крови конформационно измененных молекул (конформеров), образующихся в процессе функционирования белка. Возникновение подобных конформеров было показано в экспериментах по изучению взаимодействия СА животных с химически активными веществами и метаболитами [1, 9]. Обнаруженные изменения структуры и физико-химических свойств СА некоторые авторы [2, 3] связывали с выполнением этим сывороточным белком функции транспорта низкомолекулярных метаболитов. Выдвинутое представление о конформационной изменчивости СА в процессе функционирования получило дальнейшее развитие в работах, показавших, что СА, циркулирующий в кровяном русле, является гетерогенной системой молекул [4, 29, 49].

Возможность конформационных превращений СА в процессе связывания лигандов может быть продемонстрирована на способности этого белка взаимодействовать с жирными кислотами [39, 40]. Молекулярные механизмы связывания белком жирных кислот изучены на примере образования модельных комплексов их синтетических спинмеченых аналогов с СА [30]. Показано, что присоединение к белку каждого молярного эквивалента жирной кислоты влияет на состояние конформации белка и его взаимодействие с другими лигандами, имеющими на белковой молекуле самостоятельные участки. Молекулярные механизмы взаимодействия жирных кислот с СА, получившие в последние годы более конкретные формы [7], могут служить обоснованием для развития представлений об аллостерическом влиянии жирных кислот на активность других связывающих участков на белке [28]. Указанные свойства СА обусловлены особенностями его трехмерной структуры, обладающей способностью отдельных участков на белковой молекуле к связыванию специфических лигандов или их высвобождению [32]. Проявление таких структурно-функциональных свойств СА может быть обеспечено его уникальной петлевой структурой, формирующей в белковой цепи индивидуальные глобулярные области — домены [19, 22].

Недавно показана зависимость гетерогенности СА от наличия в белке связанных жирных кислот и возникновения конформационных превращений белковой молекулы [14, 44]. В частности, человеческий СА после инкубации при температуре 65 °С, вызывающей его денатурацию, фракционировался при гель-электрофорезе в виде компонентов, представляющих собой мономеры, димеры, а также более сложные агрегаты белковых молекул, образовавшиеся, по мнению авторов, в результате межмолекулярных реакций дисульфидного обмена. Установлено, что мономерный компонент состоит из двух форм белка, обозначенных N и N'. Компонент N является нативным СА, а N' образуется при прогревании белка из N-формы в результате небольших конформационных изменений. При длительной (60 мин) тепловой обработке форма N полностью превращается в N', обладающую терморезистентностью к более высокой температуре (75 °С). Эта фракция была

выделена, и оказалось, что терморезистентный компонент СА содержит большее количество жирных кислот, чем до длительной тепловой обработки, и больше, чем смесь полимерных фракций. На этом основании сделано заключение, что в процессе денатурации СА жирные кислоты высвобождаются из агрегированных молекул и связываются с мономером, образуя устойчивую к дальнейшему нагреванию форму белка.

Некоторые лиганды, вызывающие конформационные изменения СА, могут связываться с белком ковалентно. Например, при неэнзиматическом гликозилировании СА происходит ковалентное взаимодействие глюкозы с белковой молекулой, сопровождающееся ее структурной модификацией [20, 37]. Установлено, что у людей уровень гликозилирования СА в крови повышается при гипергликемии [33]. Химизм связывания глюкозы с СА основан на реакции между альдегидной группой глюкозы и ε-NH₂-группой лизина в белке [24, 36]. Остатками лизина, взаимодействующими с глюкозой, являются Lys-199, Lys-281, Lys-439, Lys-525. Основным участком связывания служит Lys-525 (петля 91) [27, 37].

Приведенные данные находятся в соответствии с выдвинутым ранее положением о том, что СА представляет собой гетерогенную систему молекул, различающихся устойчивостью к тепловой денатурации [25, 42].

Таким образом, накопленный материал свидетельствует о том, что молекулярная гетерогенность СА *in vivo* может быть обусловлена постсинтетическими перестройками его структуры и изменениями физико-химических свойств в условиях взаимодействия белка с естественными метаболитами [3, 6, 21, 41]. Характеристика и терминология постсинтетических структурных модификаций СА не имеют еще полной определенности [11]. Очевидно, что в данном случае необходимо учитывать структурные особенности этого белка, создающие возможность обратимых конформационных изменений его молекулы. Возникающие при этом структурные изомеры (конформеры) определяют гетерогенность, которую можно отнести к «функциональной гетерогенности» [23]. Это определение предусматривает появление молекулярной гетерогенности СА в условиях «прижизненных» структурных перестроек, обеспечивающих физиологическое функционирование белка за счет конформационных изменений [5, 49].

Специфическое место распада СА не установлено, как и не раскрыты пути его катаболизма (рис. 2). Механизм деградации СА *in vivo* до сих

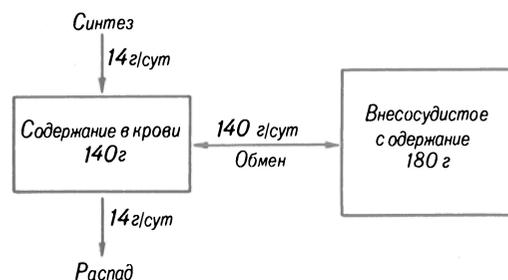


Рис. 2. Содержание и обмен сывороточного альбумина в организме (для человека массой 70 кг) [31].

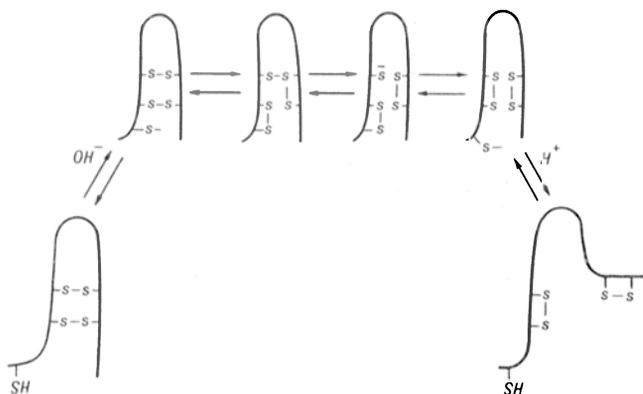


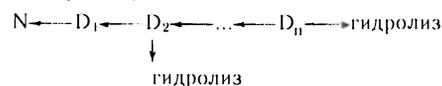
Рис. 3. Схема реорганизации позиций дисульфидных мостиков в полипептидной цепи сывороточного альбумина и образование изомеров белка [13].

пор гипотетичен, но к последнему времени сложилось представление о том, что распаду подвергаются только структурно модифицированные белковые молекулы [2, 3, 49]. В соответствии с этим в основу механизма деградации СА положены два возможных пути структурных превращений — спонтанная изомеризация, которая может определяться такими факторами, как концентрация ионов водорода и температура [34], и конформационные изменения белка при специфическом лигандировании в процессе транспорта метаболитов [1, 9].

В формировании пространственной структуры СА участвуют 17 дисульфидных связей, которые могут изменять позиции внутри молекулы (рис. 3). Это так называемый тиолдисульфидный обмен (S—S-обмен) [13, 34]. Реорганизация позиций S—S-мостиков приводит к появлению изомеров с более кислыми или более щелочными значениями изоэлектрической точки (см. рис. 3) [12]. Имеются данные о том, что $1/10$ часть СА *in vivo* находится в виде S—S-обменных изомеров, которые катаболизируются значительно быстрее, чем нативная форма [46]. В соответствии с этим высказано предположение о том, что дисульфидный обмен в СА является одним из возможных путей в механизме деградации данного белка в организме.

Другая возможность влияния структурно-функциональных свойств СА на интенсивность его катаболизма может быть связана с реакциями изомеризации, обусловленными pH-зависимыми конформационными изменениями, возникающими в пределах физиологических pH. Это так называемые N—B-переходы [26]. В последние годы получены данные, свидетельствующие о том, что некоторые лиганды, например ионы Ca^{2+} , антикоагулянт варфарин, при взаимодействии с СА вызывают в нем N—B-переходы [29]. В условиях взаимодействия с лигандами переход СА из нативного (N) конформационного состояния в новую изомерную форму (B) сопровождается деструкцией белковой молекулы [35]. В соответствии с этим обращает на себя внимание высказанное К. Волевиком [48] предположение, что структурная модификация СА детерминирует его деградацию. Предполагается, что циркулирующий в крови СА в процессе взаимодействия с лигандами проходит через ряд конформационных изменений, приводящих к образованию обратимых структур-

ных форм, более доступных для протеолитического распада. Общую схему превращений СА *in vivo* автор выражает в виде схемы:



Здесь N — нативная структура, наиболее устойчивая к протеолизу; D_1 , D_2 и D_n — различные структурные формы, чувствительные к протеолизу.

Таким образом, гетерогенная система циркулирующего в крови СА состоит из белковых молекул с различной степенью (или характером) конформационных изменений, которые могут быть менее устойчивы к протеолизу *in vivo*, чем нативные. В качестве доказательства К. Волевик приводит два свойства белка: 1) в условиях *in vitro* как B-форма СА, так и денатурированный теплом белок более подвержены протеолизу, чем нативный; 2) в условиях *in vivo* S—S-обменный СА катаболизируется быстрее нативного [47].

Предложенный К. Волевиком механизм деградации СА *in vivo* во многом остается гипотетичным, однако причинно-следственная модель катаболизма этого белка может служить программой для поиска экспериментальных доказательств. Возможно, одним из подходов может явиться установление меры «подготовленности» СА к распаду и определение «факторов отбора» таких молекул среди гетерогенного пула функционирующего в кровяном русле белка. Возможно, что в процессе взаимодействия СА с лигандами могут происходить структурные трансформации, соответствующие состоянию «критического лигандирования», т. е. способные приводить к появлению функционально инертных, но легко деградирующих молекул [5].

Исследование гетерогенности СА *in vivo*, обусловленной обратимыми конформационными изменениями белка в процессе взаимодействия с лигандами, представляет интерес с позиций появившейся в последние годы информации относительно существования рецептора для СА. Ранее в отдельных работах [38] было показано, что связанные с СА жирные кислоты поглощаются из этого комплекса поверхностью клеток печени. Были также представлены экспериментальные доказательства возможности поглощения билирубина из комплекса с СА с помощью специфических макромолекул на плазматической мембране гепатоцитов [16].

Позже в эксперименте с перфузией печени крысы растворами, содержащими возрастающие концентрации ^{14}C -олеата и постоянную концентрацию бычьего СА, получены данные, свидетельствующие о более активном поглощении клетками олеата в комплексе с белком, чем свободной жирной кислоты [50]. Дополнительные эксперименты по изучению связывания ^{125}I -меченого СА с изолированными клетками печени также указывали на возможность существования альбуминового рецептора на поверхности гепатоцитов. Было сделано заключение, что рецептор альбумина осуществляет высвобождение лиганда из комплекса с белком и захват его клеткой.

Вместе с тем результаты исследований по изучению связывания нативного и обезжиренного

¹²⁵I-меченого СА с плазматическими мембранами клеток печени показали, что оно было незначительным, не ингибировалось избытком меченого белка и не снижалось при тепловой денатурации мембран [43]. Это ставит под сомнение существование специфического альбуминового рецептора на поверхности гепатоцитов по крайней мере на основании того общего представления, какое вкладывается в понятие «рецептор» с учетом его белкового происхождения.

Таким образом, к настоящему времени еще не решен до конца вопрос о взаимосвязи между гетерогенностью СА и его функциональным свойством активно взаимодействовать с низкомолекулярными метаболитами, как неясен и вопрос о механизме «разгрузки» белка от лигандов. Очевидно, что нельзя полностью исключить возможность влияния клеточных мембран на процессы диссоциации комплекса СА — лиганд и проникновения лиганда в клетку. Очевидно также, что процессы лигандирования СА и освобождение белка от лигандов не могут не находиться в связи со свойством белка существовать *in vivo* в форме гетерогенной системы конформеров и с механизмом катаболизма этого белка.

ЛИТЕРАТУРА

1. Соркина Д. А. // Биохимия. — 1963. — Т. 28, № 4. — С. 589—594.
2. Соркина Д. А. // Вопр. мед. химии. — 1967. — № 3. — С. 263—270.
3. Соркина Д. А., Троицкий Г. В., Каминская Г. А. // Биохимия. — 1968. — Т. 33, № 2. — С. 220—227.
4. Соркина Д. О., Бородина Н. И., Ажицкий Г. Ю. // Укр. біохім. журн. — 1976. — Т. 48, № 1. — С. 51—56.
5. Соркина Д. А., Остаповский Е. М., Задорожный Б. А. // Там же. — 1979. — Т. 41, № 6. — С. 600—605.
6. Соркина Д. А. // Биохимия животных и человека. — М., 1984. — Вып. 8. — С. 40—50.
7. Соркина Д. А. // Вопр. мед. химии. — 1988. — № 2. — С. 8—16.
8. Тринус Ф. П., Бравер-Чернобульская Б. С., Луйк А. И. и др. // Там же. — 1984. — № 4. — С. 48—50.
9. Троицкий Г. В., Соркина Д. А. // Биохимия. — 1956. — Т. 21, № 6. — С. 784—792.
10. Троицкий Г. В. // Укр. біохім. журн. — 1970. — Т. 42, № 2. — С. 234—242.
11. Троицкий Г. В. // Там же. — 1985. — Т. 57, № 1. — С. 81—98.
12. Троицкий Г. В., Шараева Т. К., Ажицкий Г. Ю., Машин В. В. // Там же. — 1986. — Т. 58, № 5. — С. 11—22.
13. Anderson L. O. // Biochim. biophys. Acta. — 1966. — Vol. 117, N 1. — P. 115—133.
14. Aoki K., Hayakawa N., Noda K., Hiramatsu K. // Colloid. Polymer. Sci. — 1983. — Vol. 261, N 4. — P. 359—364.
15. Barbaree J. M., Decker W. J. // Biochem. Med. — 1971. — Vol. 5, N 3. — P. 181—187.
16. Bloomer J. R., Berk P. D., Vergalla J., Berlin N. I. // Clin. Sci. — 1973. — Vol. 45. — P. 505—516.
17. Brown J. R. // Fed. Proc. — 1975. — Vol. 34. — P. 591.
18. Brown J. R. // Ibid. — 1976. — Vol. 35, N 1. — P. 21—41.
19. Damodaran S. // Int. J. Peptide Protein Res. — 1986. — Vol. 27, N 6. — P. 589—596.
20. Day J. F., Thorpe S. R., Baynes J. W. // J. biol. Chem. — 1979. — Vol. 254, N 2. — P. 595—597.
21. Foster J. F., Sogamy M., Peterson H., Leonard W. // Ibid. — 1965. — Vol. 240, N 6. — P. 2495—2502.
22. Giesow M. // New Sci. — 1978. — Vol. 9, N 1120. — P. 777—779.
23. Giuliani A., Hassan H. J., Casalbore P. et al. // Clin. chim. Acta. — 1981. — Vol. 113, N 1. — P. 43—49.
24. Harding J. J. // Advanc. Protein Chem. — 1985. — Vol. 37. — P. 248—334.
25. Janatova J., Fuller J. K., Hunter M. J. // J. biol. Chem. — 1968. — Vol. 243, N 13. — P. 3612—3622.
26. Janssen L. H. M., Van Wilgenburg M. T., Willing J. // Biochim. biophys. Acta. — 1981. — Vol. 669, N 2. — P. 244—250.
27. Iberg N., Fluckiger R. // J. biol. Chem. — 1986. — Vol. 261, N 29. — P. 13 542—13 545.
28. Kragh-Hansen U. // Biochem. J. — 1981. — Vol. 195, N 3. — P. 603—613.
29. Kremer J. M. H., Bakker G., Willing J. // Biochim. biophys. Acta. — 1982. — Vol. 708, N 2. — P. 239—242.
30. Muller N., Mead R. J. // Biochemistry. (Wash.). — 1973. — Vol. 12, N 16. — P. 3831—3835.
31. Peters T., Reed R. // FEBS Symp. — 1978. — N 58. — P. 57—78.
32. Peters T. // Advanc. Protein Chem. — 1985. — Vol. 37. — P. 161—245.
33. Ryan E. A., Stark R., Crockford P. M., Suthijumroon A. // Diabetes Care. — 1987. — Vol. 10, N 2. — P. 213—216.
34. Sagami M., Peterson H. A., Foster J. F. // Biochemistry. (Wash.). — 1969. — Vol. 8, N 1. — P. 49—58.
35. Shahid M., Gomez J. E., Birnbaum E., Darnall D. W. // J. biol. Chem. — 1982. — Vol. 257, N 10. — P. 5618—5622.
36. Schwartz H. M., Lea C. H. // Biochem. J. — 1962. — Vol. 50, N 5. — P. 713—716.
37. Shaklai N., Garlick R. L., Bunn H. F. // J. biol. Chem. — 1984. — Vol. 259, N 8. — P. 3812—3817.
38. Spector A. A., Steinberg D., Tanaka A. // Ibid. — 1965. — Vol. 240, N 3. — P. 1032—1041.
39. Spector A. A., Saboroff J. M. // J. lipid Res. — 1972. — Vol. 13, N 8. — P. 790—796.
40. Spector A. A. // Ibid. — 1975. — Vol. 16, N 3. — P. 165—179.
41. Spencer E. M., King Te Piao // J. biol. Chem. — 1971. — Vol. 246, N 1. — P. 201—208.
42. Stokrova S., Janatova J. // Collect. Czech. Chem. Commun. — 1967. — Vol. 32, N 6. — P. 2386—2391.
43. Stremmel W., Potler B. J., Berk P. D. // Biochim. biophys. Acta. — 1983. — Vol. 756, N 1. — P. 20—27.
44. Terada H., Watanabe K., Kametani F. // Bull. chem. Soc. Jap. — 1980. — Vol. 53, N 11. — P. 3138—3142.
45. Uchida H., Hanano M. // Chem. pharm. Bull. — 1974. — Vol. 22, N 7. — P. 1571—1579.
46. Wallevik K. // Clin. Sci. — 1973. — Vol. 45, N 2. — P. 665—675.
47. Wallevik K. // J. clin. Invest. — 1976. — Vol. 57, N 2. — P. 398—407.
48. Wallevik K. // Scand. J. clin. lab. Invest. — 1978. — Vol. 38, N 8. — P. 693—698.
49. Wallevik K. // Acta physiol. scand. — 1979. — Suppl. 471. — P. 5—56.
50. Weisiger R., Gollan J., Ockner R. // Science. — 1981. — Vol. 211, N 4486. — P. 1048—1051.

Поступила 13.03.89

ОРИГИНАЛЬНЫЕ СТАТЬИ

© С. Н. ЛАВРОВСКИЙ, Т. Т. БЕРЕЗОВ, 1991

УДК 379.843.1:[579.222:577.152:35] 08

С. Н. Лавровский, Т. Т. Березов

ХАРАКТЕРИСТИКА НЕКОТОРЫХ ФИЗИКО-ХИМИЧЕСКИХ СВОЙСТВ НЕЙРАМИНИДАЗЫ ВИБРИОНОВ

Университет дружбы народов им. Патриса Лумумбы, Москва
2 В-сы мед. химии № 2

Интерес к микробной нейраминидазе (мукополисахарид N-ацетилнейраминилгидролаза, КФ 3.2.1.18) обусловлен ее многосторонними биологическими функциями в связи с широким распространением сиаловых кислот и их производных в различных биологических структурах.

В Горьковском НИИ эпидемиологии и микробиологии разработана и внедрена в производство

оригинальная технология получения очищенного ферментного препарата микробной нейраминидазы [6]. Фермент выделяют из культуральных фильтратов после глубинного культивирования нехолерных вибрионов методом ионообменной хроматографии на отечественном катионите биокарбе [11]. Отечественный ферментный препарат нейраминидазы нехолерных вибрионов находит широкое применение для диагностики в вирусологии [7], иммунологии [4], экспериментальной онкологии [10]. В литературе [2, 3, 5] имеются данные и о других возможностях практического использования фермента в разных областях биологии и медицины. Эти данные вызывают большой интерес исследователей, стремящихся к получению возможно более полной информации о свойствах, структуре и функциях нейраминидазы.

В настоящей работе приводятся результаты изучения ряда физико-химических свойств отечественных коммерческих препаратов нейраминидазы нехолерных вибрионов.

Методика. В работе использованы лиофилизированные препараты нейраминидазы нехолерных вибрионов, полученные по разработанной ранее отечественной производственной технологии [6].

Диск-электрофорез нейраминидазы в ПААГ проводили в кислой, нейтральной и щелочной системах геля [8]. Гели с 7—15 % содержанием акриламида приготовлены методом фото- и хемополимеризации [18]. Электрофореграммы окрашивали амидо черным 10 В, кумасси G-200 и G-250, зеленым легким, азокармином В [13], а также сверхчувствительным способом с использованием солей серебра [16].

Углеводные компоненты в ПААГ выявляли методом Шиффа, а также с использованием альтаианового синего [17] и красителя Stains all [12].

Неокрашенные и нефиксированные столбики геля разрезали на фрагменты толщиной 1 мм, гомогенизировали в 0,05 М ацетатном буфере pH 5,5, в гомогенатах определяли нейраминидазную активность резорциновым методом [8] с овомуцином в качестве субстрата [9].

Изоэлектрофокусирование нейраминидазы в ПААГ проводили с использованием амфолинов, сервалитов и отечественно полиэлектролита мурейлайт-Т [19]. В качестве стандарта использовали набор тест-белков для изоэлектрофокусирования фирмы «Serva», ФРГ. Гели окрашивали кумасси R-200 фиолетовым.

Молекулярную массу нейраминидазы нехолерных вибрионов определяли тремя методами: гель-фильтрацией на сефадексе G-200 [11], электрофоретически в ПААГ в присутствии додецилсульфата натрия [15], с использованием в качестве белков-маркеров лизоцима, цитохрома с, человеческого сывороточного альбумина, пепсина, ДНК-азы и ферритина, а также методом аналитического ультрацентрифугирования на центрифуге МОМ 3170 в, ротор 70 А-60-2 [14].

Кроме того, для анализа препаратов нейраминидазы нехолерных вибрионов применяли методы рентгенодифрактометрии на установке ДРОН-2, микрокалориметрии на дифференциальном сканирующем микрокалориметре и эмиссионный спектральный анализ на спектрографе ИСП-28.

Результаты и обсуждение. Результаты электрофоретического исследования препаратов нейраминидазы нехолерных вибрионов свидетельствуют о том, что фермент локализуется в верхней трети столбика ПААГ в виде гомогенной зоны, окрашивающейся на белок. Присутствие примесей других балластных белков не установлено даже с использованием сверхчувствительного метода окрашивания гелей солями серебра, который способен выявлять белки в концентрации порядка 1 мкг. Из всех изученных методов разделения, буферных систем, концентраций акриламида, видов полимеризации ПААГ, и способов окраски наилучшие результаты были получены в

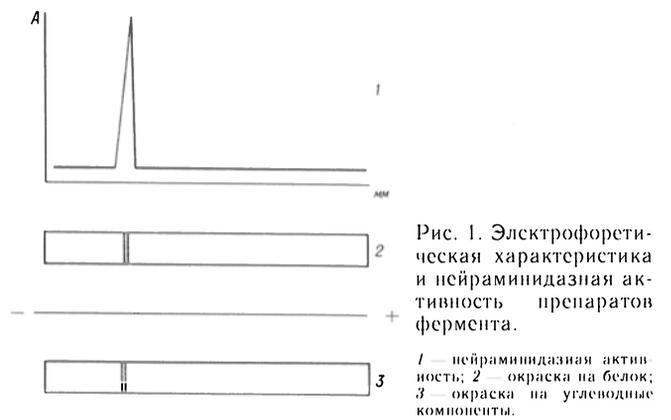


Рис. 1. Электрофоретическая характеристика и нейраминидазная активность препаратов фермента.
1 — нейраминидазная активность; 2 — окраска на белок; 3 — окраска на углеводные компоненты.

10 % ПААГ, приготовленном методом хемополимеризации, в щелочной системе геля. Из использованных красителей наиболее эффективным оказался кумасси синий G-250.

Известно, что по химической природе нейраминидаза представляет собой гликопротеин. Поэтому с целью дальнейшей идентификации фермента в ПААГ применяли методы окраски углеводных компонентов. Метод Шиффа и специфический краситель альтаиановый синий дали полностью совпадающие результаты.

Наконец, было проведено определение нейраминидазной активности в элюатах из фрагментов нефиксированных и неокрашенных гелей. Полученные результаты представлены на рис. 1. Видно, что исследуемый белок не только содержит углеводные компоненты, природа которых подробно изучается, но и обладает специфической нейраминидазной активностью. Таким образом, были показаны высокая степень чистоты и электрофоретическая гомогенность исследованных коммерческих отечественных образцов нейраминидазы нехолерных вибрионов.

При изоэлектрофокусировании нейраминидазы в ПААГ с использованием различных полиэлектролитов установлено, что нейраминидаза нехолерных вибрионов является слабокислым белком и ее изоэлектрическая точка располагается в области $5,0 \pm 0,1$ рН.

Молекулярная масса нейраминидазы холерных вибрионов, определенная тремя независимыми методами, во всех случаях оказалась одинаковой и составила 90 ± 5 кДа.

На рис. 2 в качестве иллюстрации приводится седиментограмма, полученная при аналитическом ультрацентрифугировании нейраминидазы. Был рассчитан также коэффициент седиментации фермента, который составил 5,37 S. Следует отметить, что методом аналитического ультрацентрифугирования была подтверждена гомогенность нейраминидазы, которая на седиментограмме представлена в виде единичного белкового пика.

Следующая серия опытов была посвящена изучению других физико-химических свойств препаратов нейраминидазы нехолерных вибрионов. Для этого был применен ряд нетрадиционных методов анализа, в частности метод рентгенодифрактометрии на аппарате ДРОН-2 на $\text{CuK}\alpha$ -излучении ($\lambda_{\text{K}\alpha}$ 0,154 нм) при режиме работы трубки 36 кВ — 20 мА.

Полученные результаты свидетельствуют о том, что препарат нейраминидазы представляет собой

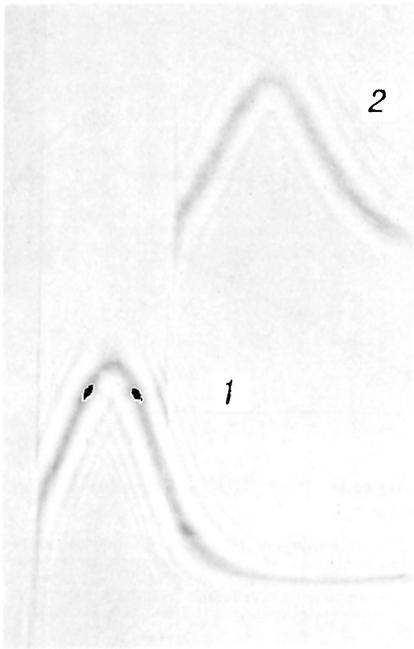


Рис. 2. Аналитическое ультрацентрифугирование нейраминидазы нехолерных вибрионов.

Седиментограмма через 60 (1) и 90 (2) мин от начала центрифугирования.

квазикристаллический продукт с характерными длинами межатомных связей $d_1=0,337$ нм, $d_2=0,655$ нм, $d_3=0,423$ нм, $d_4=0,305$ нм, $d_5=0,290$ нм, $d_6=0,22$ нм, $d_7=0,199$ нм, $d_8=0,18$ нм.

Было проведено также калориметрическое исследование препаратов нейраминидазы на дифференциальном сканирующем микрокалориметре в пределах температур 60–300 °С. Показано, что теплота фазового перехода препаратов нейраминидазы, при которой наблюдается экзотермический эффект, связанный, по-видимому, с разрушением белка, составляет 212 °С.

С целью изучения набора ионов металлов в зольном остатке препаратов нейраминидазы был применен метод эмиссионного спектрального анализа на ИСП-28. При этом выявлены следующие ионы металлов: 0,01 % кальция, 0,1 % фосфора, 1 % натрия, 10 % калия. Присутствие указанных ионов обусловлено тем, что на разных технологических стадиях приготовления препарата использовали фосфатный буфер (ионы калия, натрия, фосфора) и в качестве стабилизатора активности фермента — хлористый кальций. Другие ионы металлов, которые могли бы оказывать ингибирующее или дестабилизирующее действие на фермент, не найдены.

Таким образом, проведенные исследования позволили определить некоторые физико-химические свойства отечественных препаратов нейраминидазы нехолерных вибрионов. Показано, что нейраминидаза представляет собой слабокислый гликопротеин с молекулярной массой 90 ± 5 кДа, константой седиментации 5,37 S и изоэлектрической точкой $5,0 \pm 0,1$ рН. Установлено также, что рентгенодифрактометрически препарат нейраминидазы представляет собой квазикристаллический продукт.

Все изученные образцы препарата характеризовались высокой степенью чистоты, были электрофоретически гомогенны, в них не содержа-

лось примесей балластных белков, а также постоянных ионов металлов.

Полученные результаты были использованы при разработке и оптимизации методов промышленного получения и контроля коммерческих препаратов фермента.

ЛИТЕРАТУРА

1. Дегерман Г. Гель-хроматография: Пер. с англ.— М., 1970.
2. Долматова Л. А., Голосеев Ю. А., Нарбутевич П. И. // Журн. микробиол.— 1985.— № 9.— С. 35–37.
3. Езепчук Ю. В., Вертиев Ю. В., Денисов Л. А. // Молекул. генетика.— 1983.— № 1.— С. 21.
4. Лавровский С. П., Барышников Ю. А., Табагари Д. З., Копылова Г. Е. // Всесоюзный симпозиум по медицинской энзимологии, 4-й: Тезисы.— Алма-Ата, 1983.— С. 147.
5. Лавровский С. П., Таранюк З. Е., Перучева С. Я., Рязанова С. Х. // Стандарты, штаммы и методы контроля бактериальных и вирусных препаратов.— М., 1984.— С. 78–81.
6. Лавровский С. П., Таранюк З. Е., Перучева С. Я. и др. // Актуальные вопросы разработки препаратов медицинской биотехнологии.— Махачкала, 1985.— С. 224–226.
7. Львов Д. К., Закстельская Л. Я., Шендерович С. Ф. и др. // А. с. 1188951 СССР.— 1985.
8. Маурер Г. Диск-электрофорез: Пер. с англ.— М., 1971.
9. Орлова Н. Г., Мехедов Л. П. // Вопр. вирусол.— 1970.— № 3.— С. 341.
10. Соловьев В. Д., Гутман П. Г., Агеенко А. И. // Там же.— 1983.— № 3.— С. 292.
11. Юргалева Н. М., Назарьев О. Е., Лавровский С. П. // Новые биотехнологические процессы и биологические препараты.— Горький, 1985.— С. 35–38.
12. Green M., Paste wka J., Peacock A. // *Analyt. Biochem.*— 1973.— Vol. 105.— P. 43–51.
13. Hajeez M., El-Sherbini A., Harb N., Adel M. // *Lab. Pract.*— 1975.— Vol. 26.— P. 339.
14. Halsall H. // *Nature.*— 1967.— Vol. 215.— P. 5108.
15. Laemmli U. // *Nature.*— 1970.— Vol. 227.— P. 680–685.
16. Oakley B., Kirsch D., Morris A. // *Analyt. Biochem.*— 1980.— Vol. 105.— P. 361–363.
17. Wardi A., Michos G. // *Ibid.*— 1972.— Vol. 49.— P. 607–609.
18. Wengenmayer F., Ueberschar K., Kurz G. // *FEBS Lett.*— 1974.— Vol. 40.— P. 224–228.
19. Wrigley C. // *Sci. Tools.*— 1968.— Vol. 15.— P. 17–23.

Поступила 11.12.89

SOME PHYSICO-CHEMICAL PROPERTIES OF VIBRIO NEURAMINIDASE

S. N. Lavrovsky, T. T. Beresov

P. Lumumba University of People's Friendship, Moscow

Some physico-chemical properties of commercially available neuraminidase preparations from non-choleraic vibrios were studied. The neuraminidase was shown to be weakly acid glycoprotein with molecular mass 90 ± 5 kDa, sedimentation constant 5.37 S and pI 5.0 ± 0.1 . As shown by roentgenodiffraction technique the neuraminidase preparations possessed a quazicrystalline structure. All the preparations studied were highly purified, exhibited electrophoretic homogeneity, did not contain any protein and Me^+ contaminations.

Т. Я. Кондратенко, Н. В. Кузина, Е. С. Северин,
З. Х. Корнилова, Э. В. Тихомирова, М. И. Перельман

β-АДРЕНЕРГИЧЕСКИЕ И МУСКАРИНОВЫЕ АЦЕТИЛХОЛИНОВЫЕ РЕЦЕПТОРЫ В ПАРЕНХИМЕ ЛЕГКИХ ЧЕЛОВЕКА ПРИ ЗЛОКАЧЕСТВЕННЫХ НОВООБРАЗОВАНИЯХ

Научный центр молекулярной диагностики Минздрава СССР, Московская медицинская академия им. И. М. Сеченова

В настоящее время предполагается важная роль β-адренергических и мускариновых ацетилхолиновых рецепторов в развитии заболеваний легких, и в частности хронических обструктивных заболеваний дыхательных путей [4].

Адренергические и мускариновые рецепторы, широко представленные в паренхиме легких животных и человека [2, 3, 6, 7], претерпевают значительные изменения при хроническом бронхите, бронхиальной астме [1, 10, 13]. По данным J. Raaijmakers и соавт. [13], уменьшение количества β-адренорецепторов, в эпителии бронхиол человека является одним из патогенетических факторов развития обструктивных заболеваний легких. При злокачественных новообразованиях рецепторы легких практически не изучены. В предварительных экспериментах нами было обнаружено повышение количества мускариновых рецепторов в паренхиме легких человека при злокачественных опухолях.

Целью настоящей работы являлось изучение β-адренергических и мускариновых ацетилхолиновых рецепторов у больных раком легких.

Методика. Кусочки паренхимы легких получали во время операций, производимых больным легочной аденокарциномой (курящие мужчины 40–60 лет). Диагноз во всех случаях был подтвержден гистологическим исследованием. Больные не получали β-агонистов и кортикостероидов. Контролем служили кусочки легких, полученные от пациентов с диагнозом туберкулема (курящие мужчины 30–60 лет) при сегментарной резекции в пределах здоровых тканей.

Все кусочки легких после взятия немедленно замораживали в жидком азоте и хранили при температуре -70°C .

Выделение мембран легких проводили по методу [9]. Ткань гомогенизировали в буфере, содержащем 50 мМ трис-НСl, рН 7,4, 0,32 М сахарозу, 0,154 М NaCl, в гомогенизаторе «Virtis-45» (США). Гомогенат фильтровали через несколько слоев марли, центрифугировали 10 мин при 1000 g; полученный надосадок центрифугировали 40 мин при 40 000 g. Осадок суспендировали в 10 мл буфера, содержащего 50 мМ трис-НСl, рН 7,4, 10 мМ MgCl₂, и центрифугировали при тех же условиях. Конечный осадок суспендировали в 5 мл буфера и хранили при -70°C до анализа связывания.

Анализ связывания [³H]-дигидроалprenолола ([³H]-ДГЛ) с β-адренорецепторами проводили инкубированием мембранных белков (100 мкг) в общем объеме 500 мкл с 50 мМ трис-НСl, рН 7,5, 10 мМ MgCl₂, 0,1–5 нМ [³H]-ДГЛ (82 Ки/ммоль; «Amersham», Англия) 20 мин при 30 °С. Разделение свободного и связанного с мембранами лиганда осуществляли фильтрацией проб на фильтрах GF/C («Whatman», Англия). Фильтры высушивали и просчитывали на жидкостном радиоспектрометре «Rack-beta» (LKB, Швеция) с эффективностью счета 40 %.

Специфическое связывание [³H]-ДГЛ определяли как разницу между общим связыванием в отсутствие 1-альprenолола («Sigma», США) и неспецифическим связыванием в присутствии 10 мкМ альprenолола.

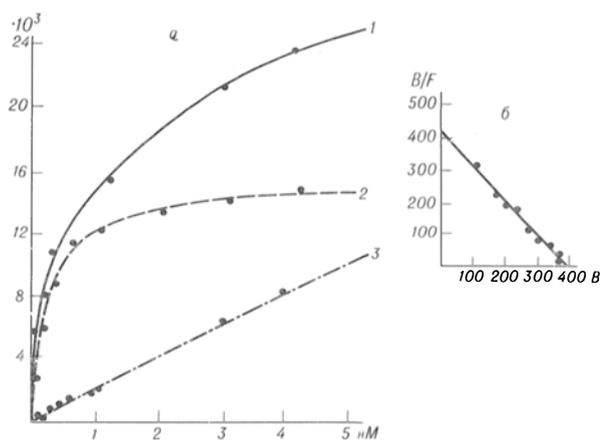


Рис. 1. Связывание [³H]-ДГЛ мембранами здоровой ткани легких человека.

Здесь и на рис. 2: а — связывание [³H]-ДГЛ: 1 — общее; 2 — специфическое; 3 — неспецифическое. По оси абсцисс — концентрация лиганда, нМ; по оси ординат — [³H]-ДГЛ, имп/мин на 1 мкг белка. б — график в координатах Скетчарда. По оси абсцисс — связанный [³H]-ДГЛ, фмоль на 1 мкг белка; по оси ординат — отношение связанного [³H]-ДГЛ к свободному, фмоль на 1 мкг/нМ ($r=0,99$).

Связывание [³H]-квиноклидинилбензилата ([³H]-QNB) с мускариновыми рецепторами анализировали путем инкубирования мембранных белков (200 мкг) при 37 °С в течение 60 мин в 1 мл Na, К-фосфатного буфера (81 мМ Na, 9 мМ К), рН 7,4 с 0,1–8 нМ [³H]-QNB (39 и 46 Ки/ммоль; «Amersham», Англия). Реакцию останавливали быстрой фильтрацией проб на фильтрах GF/B («Whatman», Англия), далее промывали фильтры холодным буфером (3 раза по 3 мл), высушивали и просчитывали на жидкостном радиоспектрометре («Rack-beta», LKB, Швеция) с эффективностью счета 40 %.

Специфическое связывание [³H]-QNB определяли как разницу между связыванием в отсутствие и в присутствии 10 мкМ атропина («Sigma», США), концентрацию белка — по методу M. Bradford [5], используя в качестве стандарта бычий сывороточный альбумин.

Определение параметров рецепторного связывания — константы диссоциации и максимального числа мест связывания (K_d и B_{max}) — проводили в координатах Скетчарда [14].

Результаты и обсуждение. Связывание β-адренергического радиолиганда [³H]-ДГЛ мембранами паренхимы легких было насыщаемым как в контрольных образцах, так и при злокачественном росте (рис. 1, 2). Насыщение наступало при концентрации лиганда 3 нМ. Неспецифическое связывание [³H]-ДГЛ в присутствии 10 мкМ альprenолола в контрольных образцах составляло 20–30 % от общего связывания при тех же концентрациях лиганда (0,1–

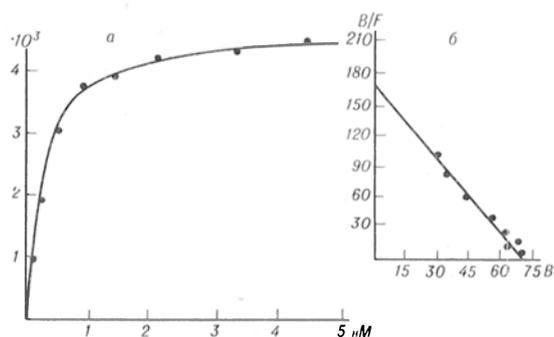


Рис. 2. Специфическое связывание [³H]-ДГЛ мембранами паренхимы легких больных аденокарциномой.

$r=0,96$.

Характеристика связывания [³H]-ДГА и [³H]-QNB в здоровой ткани легких и при аденокарциноме легких человека

Радиолиганд	Параметр связывания	Контроль (n=10)	Рак (n=12)
³ H]-ДГА	V _{max} , фмоль на 1 мг белка	456,7±73,7	84,1±14,5
	K _d , нМ	1,0±0,1	0,5±0,08
³ H]-QNB	V _{max} , фмоль на 1 мг белка	108,9±12,1	377,5±65,5
	K _d , нМ	0,45±0,07	0,55±0,09

5 нМ) (см. рис. 1, а). Анализ в координатах Скэтчарда выявил высокоаффинный участок связывания [³H]-ДГА в контрольных образцах, характеризующийся следующими параметрами: K_d=1,0±0,1 нМ, V_{max}=456,7±73,7 фмоль на 1 мг белка (средние значения ± SEM, n=10) (см. рис. 1, б). Высокая аффинность и величина V_{max} связывания [³H]-ДГА в паренхиме легких согласуется с данными, полученными рядом авторов в легких морской свинки [8] и человека [1, 11].

Анализ в координатах Скэтчарда для группы больных раком показал, что аффинность связывания [³H]-ДГА не меняется (K_d=0,5±0,08 нМ) (см. рис. 2, б), в то время как число мест связывания [³H]-ДГА значительно снижается (V_{max}=84,1±14,5 фмоль на 1 мг белка, средние значения ± SEM, n=12). Связывание [³H]-QNB в паренхиме легких было насыщенным и высокоаффинным как в контрольных образцах, так и при злокачественном росте. Аффинность связывания [³H]-QNB практически не изменялась, однако наблюдалось значительное повышение числа мест связывания в группе больных раком (см. таблицу).

Изменения адренергических и мускариновых рецепторов, связанные с патологическими состояниями легких человека, были показаны в ряде лабораторий [1, 10–12]. Однако эти исследования касались в основном хронических обструктивных заболеваний дыхательных путей. В настоящей работе обнаружены изменения β-адренергических и мускариновых ацетилхолиновых рецепторов в паренхиме легких при злокачественных новообразованиях по сравнению со здоровой тканью. Выявлены значительные изменения концентрации β-адренергических (уменьшение) и мускариновых (повышение) рецепторов в группе больных раком легких.

Полученные данные позволяют предположить определенную роль β-адренергических и мускариновых ацетилхолиновых рецепторов в патогенезе злокачественных опухолей легких человека и, возможно, наметить некоторые новые пути терапии направленного действия.

Изучение рецепторов при заболеваниях органов дыхания человека, относящихся к факторам риска злокачественных новообразований легких, станет предметом наших дальнейших исследований.

ЛИТЕРАТУРА

1. Barnes P. J., Karliner J. S., Dollery C. T. // Clin. Sci.— 1980.— Vol. 58.— P. 457—461.
2. Barnes P. J., Basbaum C. B., Nadel J. A. // Amer. Rev. resp. Dis.— 1983.— Vol. 127.— P. 758—762.

3. Barnes P. J., Jacobs M. M., Roberts J. M. // Pediat. Res.— 1984.— Vol. 18.— P. 1191—1194.
4. Barnes P. J., Minette P., MacLagan J. // TIPS.— 1988.— Vol. 9.— P. 412—416.
5. Bradford M. M. // Analyt. Biochem.— 1976.— Vol. 72.— P. 248—254.
6. Carstairs J. R., Nimmo A. J., Barnes P. J. // Amer. Rev. resp. Dis.— 1985.— Vol. 132.— P. 541—547.
7. Carswell H., Nahorski S. R. // Brit. J. Pharmacol.— 1982.— Vol. 80.— P. 520.
8. Nelson C. A., Multher T. F., Pitha J., Baker S. P. // J. Pharmacol. exp. Ther.— 1986.— Vol. 237.— P. 830—836.
9. Norman P., Abram T. S., Kluender H. C. et al. // Europ. J. Pharmacol.— 1987.— Vol. 143.— P. 323—334.
10. Raaijmakers J. A. M., Terpstra G. K., Van Rosen A. J. et al. // Clin. Sci.— 1983.— Vol. 66.— P. 585—590.
11. Raaijmakers J. A. M., Wassink G. A., Kreukniel J., Terpstra G. K. // Europ. J. resp. Dis.— 1984.— Vol. 65.— P. 215—220.
12. Raaijmakers J. A. M., Van Rozen A. J., Terpstra G. K. et al. // Progr. resp. Res.— 1985.— Vol. 19.— P. 153—158.
13. Raaijmakers J. A. M., Beneker C., Dol R., De Ruiter-Bootsma A. I. // Cell. molec. Biol.— 1987.— Vol. 33.— P. 515—518.
14. Scatchard G. // Ann. N. Y. Acad. Sci.— 1949.— Vol. 51.— P. 660—672.

Поступила 14.12.89

β-ADRENERGIC AND MUSCARINE ACETYLCHOLINERGIC RECEPTORS OF HUMAN LUNG PARENCHYMA IN MALIGNANT TUMORS

T. Ya. Kondratenko, N. V. Kuzina, E. S. Severin, Z. Kh. Kornilova, E. V. Tikhomirova, M. I. Perelman

Research Centre of Molecular Diagnosis, Ministry of Public Health of the USSR, Chair of Phthisiopulmonology, I. M. Sechenov I Medical School, Moscow

β-Adrenergic and muscarine acetylcholinergic receptors were studied in human lung parenchyma obtained from patients with tuberculoma (after segmental resection of tuberculoma surrounding normal tissues were performed to obtain control samples) as well as from patients with pulmonary adenocarcinoma. Assays of binding of β-adrenergic radioligand ³H-dihydroalprenolol (³H-DHA) exhibited high affinity in lung parenchyma membranes in both control samples and in that of patients with tumors. Binding of muscarine antagonist ³H-quinuclidinyl benzylate (³H-QNB) also showed high rate of affinity in lung parenchyma. High number of ³H-DHA binding sites was distinctly decreased and ³H-QNB — was increased in lung malignant tumors as compared with normal tissue. Considerable decrease of β-adrenergic and increase of muscarine receptors were found in patients with pulmonary adenocarcinoma. β-Adrenergic and muscarine receptors appear to be of importance in pathogenesis of human lung malignant tumors.

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 1991

УДК 616-006.6-07:616.153.952-074

О. Г. Сомова, Е. А. Текиева, Э. В. Дятловицкая, Л. С. Бассалык, Л. Д. Бергельсон

ГАНГЛИОЗИД (GD₃) В СЫВОРОТКЕ КРОВИ РАКОВЫХ БОЛЬНЫХ

Институт биоорганической химии им. М. М. Шемякина АН СССР, Москва

Как было показано ранее [9, 10, 13], в сыворотке крови опухоленосителей значительно увеличивается количество липидносвязанных сиаловых кислот. У пациентов с меланомой [12, 15], лимфогрануломатозом, раком яичников и прямой кишки [3] в сыворотке крови был идентифицирован ганглиозид GD₃, который в норме присутствует лишь в небольших количествах.

Поскольку этот ганглиозид значительно ингибирует бласттрансформацию лимфоцитов [7] и цитотоксическую активность естественных киллеров [1, 2, 5, 6], увеличение его содержания в сыворотке крови при злокачественной патологии, вероятно, может приводить к угнетению иммунного ответа организма.

Представляло интерес выяснить, насколько широко распространено его появление в сыворотке крови пациентов с другими формами рака. Поэтому в настоящей работе исследован ганглиозидный состав сыворотки крови больных с раком молочной железы и раком желудка.

Методика. Ганглиозиды выделяли из сыворотки крови следующим образом. К 3—7 мл сыворотки добавляли 5 объемов смеси хлороформ — метанол (1:2), энергично встряхивали и центрифугировали при 800 g в течение 10 мин. Надосадочную жидкость отделяли, а осадок дважды экстрагировали смесью хлороформ — метанол (2:1), а затем (1:2) до полного извлечения ганглиозидов. Объединенные экстракты упаривали досуха, остаток растворяли в 15 мл смеси хлороформ — метанол (2:1) и встряхивали с 3 мл воды в течение 15 мин. Нижний слой отделяли, упаривали и операцию повторяли еще дважды. Объединенные верхние (водно-метанольные) слои упаривали и остаток, содержащий ганглиозиды, растворяли в 0,8 мл воды. Очистку ганглиозидов проводили гель-фильтрацией на колонке с сефадексом G-50 (1,1×9 см). Первые 5 мл водного элюата, содержащие ганглиозиды, упаривали досуха и остаток растворяли в 50 мкл смеси хлороформ — метанол (2:1).

Ганглиозиды идентифицировали тонкослойной хроматографией на пластинках НРТЛС на алюминиевой подложке (фирма «Merck», ФРГ) с последующим связыванием разделенных индивидуальных ганглиозидных фракций со специфическими антителами кролика и обнаружением комплекса антиген — антитело вторыми антителами к иммуноглобулинам кролика, мечеными пероксидазой (иммуностейнинг). Для этого на пластинку наносили всю выделенную из сыворотки крови смесь ганглиозидов и хроматограмму проявляли в системе хлороформ — метанол — вода (60:40:9), содержащей 0,02% CaCl₂. Затем для иммуноферментного анализа разделенную на НРТЛС-пластинках смесь ганглиозидов переносили с силикагеля на нитроцеллюлозу [16] и далее проводили иммуностейнинг, как указано ранее [3]. Ганглиозиды, оставшиеся на НРТЛС-пластинке, обнаруживали резорциновым реагентом.

Антисыворотки к ганглиозидам GM₃ и GD₃ получали иммунизацией кроликов, как указано ранее [4].

Результаты и обсуждение. Как видно из данных, приведенных в таблице, во всех сыворотках здоровых доноров и раковых пациентов был обнаружен ганглиозид GM₃. Это совпадает со всеми известными литературными данными, поскольку GM₃ является основным ганглиозидом сыворотки крови. Ганглиозид GD₃ с помощью специфической антисыворотки к GD₃ был обнаружен у 15% исследованных здоровых доноров и у 60—65% больных раком желудка и раком молочной железы. При этом следует отметить, что при изучении крови раковых больных использовали 3—4 мл сыворотки, в случае донорской крови

для выделения ганглиозидов брали 6—7 мл сыворотки.

Имеющиеся многочисленные литературные данные свидетельствуют о том, что ганглиозид GD₃ присутствует в нормальной сыворотке крови в незначительных количествах. Лишь недавно появилась работа [14], по данным которой содержание ганглиозидов GD₃ в сыворотке нормальной крови человека достигало 25% от суммы ганглиозидов. Столь высокое содержание этого ганглиозидов, видимо, можно объяснить тем, что авторы для идентификации использовали только тонкослойную хроматографию. Между тем в наших экспериментах тоже весьма часто в сыворотке нормальной крови обнаруживался компонент, подобный ганглиозиду GD₃ по хроматографической подвижности, но не реагирующий со специфической антисывороткой к этому ганглиозиду. Поскольку сыворотка крови содержит ганглиозиды с различной структурой углеводной цепи [11], какие-то компоненты, видимо, имеют сходную с GD₃ хроматографическую подвижность.

В сыворотке крови пациентов с раком молочной железы и раком желудка присутствие ганглиозидов GD₃ отмечается в 4—4,5 раза чаще, чем в норме, причем его содержание значительно выше: в случае сыворотки крови раковых пациентов ганглиозид GD₃ обнаруживался в суммарной фракции, выделенной из 3—4 мл, в то время как в случае сыворотки донорской крови требовалось не менее 6—7 мл.

Полученные в настоящей работе результаты в дополнение к известным литературным данным свидетельствуют о том, что ганглиозид GD₃, обнаруживаемый у многих опухолей [8], присутствует также и в сыворотке крови пациентов с различными формами рака.

ЛИТЕРАТУРА

1. Дятловская Э. В., Сеницына Е. В., Леменовская А. Ф., Бергельсон Л. Д. // Биохимия. — 1984. — Т. 49. — С. 432—436.
2. Дятловская Э. В., Ключарева Т. Е., Матвеева В. А. и др. // Там же. — 1985. — Т. 50. — С. 1514—1516.
3. Дятловская Э. В., Сомова О. Г., Новиков А. М. и др. // Там же. — С. 1933—1935.
4. Дятловская Э. В., Сомова О. Г., Фомина-Агеева Е. В., Бергельсон Л. Д. // Там же. — С. 412—415.
5. Дятловская Э. В., Матвеева В. А., Ключарева Т. Е. и др. // Докл. АН СССР. — 1987. — Т. 297. — С. 495—497.
6. Дятловская Э. В., Сеницына Е. В., Ключарева Т. Е. и др. // Вопр. мед. химии. — 1987. — № 3. — С. 95—98.
7. Дятловская Э. В., Сукова В. С., Емец В. И. и др. // Иммунология. — 1987. — № 5. — С. 69—72.
8. Dyaltovtitskaya E. V., Bergelson L. D. // Biochim. biophys. Acta. — 1987. — Vol. 907. — P. 125—143.
9. Horgan J. E. // Clin. chim. Acta. — 1982. — Vol. 118. — P. 327—331.
10. Kloppel T. M., Keenan T. W., Freeman M. J., Morre D. J. // Proc. nat. Acad. Sci. USA. — 1977. — Vol. 74. — P. 3011—3013.
11. Kundo S. K., Diego I., Osovitz S., Marcus D. M. // Arch. Biochem. — 1985. — Vol. 238. — P. 388—400.
12. Portoukalian J., Zwingelstein G., Abdul-Malak N., Dore J. F. // Biochem. biophys. Res. Commun. — 1978. — Vol. 85. — P. 916—920.
13. Portoukalian J., David M.-J., Shen X. et al. // Biochem. Int. — 1989. — Vol. 18. — P. 759—765.
14. Senn H.-J., Orth M., Fitzke E. et al. // Europ. J. Biochem. — 1989. — Vol. 181. — P. 657—662.
15. Tai T., Cahan L. D., Tsuchida T. et al. // Int. J. Cancer. — 1985. — Vol. 35. — P. 607—612.

Идентификация ганглиозидов в сыворотке крови человека с помощью специфических антисывороток

Сыворотка крови	Количество образцов	Количество положительных реакций с антисыворотками к ганглиозидам	
		GM ₃	GD ₃
Норма	26	26	4
Рак молочной железы	19	19	12
Рак желудка	5	5	3

GANGLIOSIDE GD₃ IN BLOOD SERUM OF PATIENTS WITH CANCER

O. G. Somova, E. A., Tekieva, E. V. Dyatlovitskaya,
L. S. Bassalyk, L. D. Bergelson

M. M. Shemyakin Institute of Bioorganic Chemistry, Academy of Sciences of the USSR, Moscow

Gangliosides were studied in blood serum of healthy volunteers and of patients with cancer of mammary gland and stomach. Blood serum of the majority of patients with cancer and only 15% of healthy persons were shown to contain ganglioside GD₃, which was detected in blood of patients with some other tumors.

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 1991

УДК 616.12-005.4-07:616.153:577.112.856]-02:613.288

И. А. Щербакова, Н. В. Перова, Е. И. Соколов,
Г. Н. Щукина, В. А. Метельская, Н. А. Никитина,
В. М. Фомина

ВЛИЯНИЕ ОДНОРАЗОВОЙ ЖИРОВОЙ НАГРУЗКИ НА ПОКАЗАТЕЛИ СИСТЕМЫ ЛИПОПРОТЕИДОВ ПЛАЗМЫ КРОВИ БОЛЬНЫХ ИШЕМИЧЕСКОЙ БОЛЕЗНЬЮ СЕРДЦА И ЗДОРОВЫХ ЛИЦ

Всесоюзный научно-исследовательский центр профилактической медицины Минздрава СССР, Москва; Московский медицинский стоматологический институт им. Н. А. Семашко

Моделирование пищевой липемии, регулярно повторяющейся после каждого приема пищи, путем однократной жировой нагрузки (ЖН) использовано для выяснения влияния пищевых воздействий на уровни липидов и липопротеидов (ЛП) плазмы [1, 6, 10, 13, 18, 20]. Примененные ЖН были разными по составу, но по калорийности существенно не различались и составляли около 1300 ккал. Все авторы через 2—6 ч после ЖН отмечали увеличение в плазме крови содержания триглицеридов (ТГ) с последующим возвращением его к исходному уровню через 8—9 ч [5, 10, 18]. Наблюдалось также повышение через 3—6 ч липолитической активности плазмы крови [1, 2, 15] и через 5—6 ч содержания в плазме незатерифицированных жирных кислот [16]. Исследование, проведенное у 28 здоровых добровольцев, принимавших ЖН, выявило отрицательную связь между исходным уровнем ТГ и содержанием в плазме частиц подфракции ЛП высокой плотности (ЛПВП₂). Соответственно после однократной ЖН в виде сливок у лиц с низким уровнем в плазме ЛПВП₂ зарегистрирован более выраженный триглицеридемический ответ через 2, 4, 6 и 8 ч [18, 20], что может быть одним из факторов, влияющих на развитие атеросклероза [19].

Показано, что у больных ишемической болезнью сердца (ИБС) с выраженным атеросклерозом венечных артерий встречаются разные варианты нарушений в системе транспорта липидов плазмы крови [3]. Они проявляются между приемами пищи (натощак) в повышенном содержании общего холестерина (ХС), а также ХС, входящего в

состав ЛП низкой и (или) очень низкой плотности (ЛПНП, ЛПОНП). Но у части больных ИБС отклонения в уровнях липидов и аполипипротейдов отсутствуют или нерезко выражены [3]. Однако нельзя исключить того факта, что на процессы накопления ХС в артериальной стенке могут повлиять изменения в транспортной системе липидов в период, непосредственно следующей за приемом пищи, т. е. в период пищевой липемии, которая повторяется в течение дня у каждого человека 3—4 раза и продолжается несколько часов.

Для выявления возможных латентных атерогенных сдвигов в транспортной системе липидов было проведено сравнительное исследование динамики уровня липидов, аполипипротейдов и субфракционного спектра ЛПВП после однократной стандартной ЖН у больных ИБС с документированным атеросклерозом и здоровых людей как при наличии дислипидемий натощак, так и при нормолипидемии.

Методика. Обследовано 39 больных ИБС мужчин в возрасте 27—60 лет (средний возраст $45 \pm 2,9$ года). 35 из этих больных не менее года назад перенесли инфаркт миокарда, у 33 коронарный атеросклероз (КА) верифицирован коронарографически, у 2 признаки КА не выявлены. У всех больных на период исследования отсутствовали симптомы артериальной гипертонии, сахарный диабет, гипер- и гипотиреоз. Медикаментозное лечение у этих пациентов не проводилось в течение предшествующих исследованию 2 нед. Все они были обследованы в стационаре ММСИ им. Н. А. Семашко.

Группа лиц, не имевших признаков ИБС, состояла из 21 мужчины-добровольца в возрасте 21—50 лет (средний возраст $30 \pm 2,9$ года).

Кровь натощак брали из локтевой вены утром через 12—14 ч после последнего приема пищи в пробирки с сухой ЭДТА (1 мг/мл). Определение содержания ХС, ТГ, ХС ЛПВП проводили химическим методом на автоанализаторе АА11 фирмы «Техникон» [15], содержания апоА1 и апоВ — методом количественного «ракетного» иммуноэлектрофореза [11] с применением антисывороток, приготовленных в нашей лаборатории, субфракционный спектр ЛПВП — с помощью электрофореза в полиакриламидном геле линейного градиента концентрации 4—30% по методу P. Blanche и соавт. [8, 17]. Контроль электрофоретической подвижности осуществляли добавлением в качестве внутренних стандартов размера частиц тиреоглобулина и бычьего сывороточного альбумина со стандартными размерами 17 и 7,1 нм соответственно. Суммарно фракцию ЛПВП для электрофореза выделяли в солевой плотности 1,21 г/мл препаративным ультрацентрифугированием на ультрацентрифуге L8-55 (фирма «Beckman», США) в режиме 36 ч, t 17 °С, 105 000 g, ротор 40,3 по методу [14].

ЖН давали по методике, используемой J. Patsch и соавт. [18, 19]: натощак в течение 5 мин однократно обследуемые принимали 500 мл 20% сливок (около 1300 ккал). Параметры системы ЛПВП определяли через 3 ч после ЖН у 31 больного ИБС и 18 здоровых лиц, через 6 ч — у 27 и 9 обследуемых соответственно. Для выделения групп с атерогенными дислипидемиями были использованы критерии, предложенные Европейским обществом атеросклероза (ЕОА). К группе с атерогенными дислипидемиями относили лиц, у которых натощак зафиксированы уровни ХС и ТГ 200 мг/дл и выше, ХС ЛПВП 35 мг/дл и ниже, т. е. нормой считали уровни ХС и ТГ ниже 200 мг/дл, ХС ЛПВП выше 35 мг/дл.

Результаты и обсуждение. Как видно из табл. 1, группа больных ИБС, у которых было проведено исследование до и через 3 ч после ЖН, исходно отличались от группы здоровых лиц более высокими средними уровнями ХС, ТГ, ХС ЛПВП, апоВ, отношением апоВ/апоА1 и более низкими уровнями ХС ЛПВП и апоА1. Из-за большого разброса данных оказалось недостоверной разница в средних значениях процентной доли подфракций ЛПВП_{2b} у больных по сравнению со здоровыми, как следовало ожидать в связи с более низким

Таблица 1
Содержание (в мг/дл) липидов, аполипротеинов и субфракционный спектр ЛПВП плазмы здоровых лиц и больных ИБС через 3 ч после однократной ЖН

Группа обследуемых	Время исследования	ХС	ТГ	ХС ЛПВП	АпоА1	АпоВ	В/А1	Доля части ЛПВП, %		
								2В	3В	3В
Здоровые лица (n=18)	До ЖН	207±4,4	84±11,8	50±3,0	141±4,0	127±9,0	0,91±0,069	29±3,6	25±1,7	10,2±0,05
	После ЖН	203±3,5	167±24,2**а	49±2,3	145±5,4	130±9,4	0,92±0,080	28±3,3	27±1,7	7,8±0,02
Больные ИБС (n=31)	До ЖН	244±8,0*а	138±8,0*а	39±1,6*а	119±2,4*а	159±6,8*а	1,34±0,062*а	23±4,0	24±3,1	10,2±0,03*а
	После ЖН	240±10,7*б	159±15,2*б*в	37±2,1*б	117±2,2*б	152±5,9*б	1,32±0,062*б	23±4,6	29±1,9*вв	10,2±0,05 10,2±0,09 7,9±0,04*вв

Примечание. Здесь и в табл. 2 одна звездочка — $p < 0,05$ по критерию Стьюдента, две — $p_1 < 0,05$ по критерию Вилкоксона; а — достоверно по сравнению с показателем у здоровых натошак, б — у здоровых после ЖН, в — у больных ИБС натошак.

Таблица 2
Показатели системы липопротеидов (содержание в плазме, мг/дл) у здоровых лиц с нормальным и нарушенным спектром липидов через 3 ч после однократной ЖН

Липидный спектр	Время исследования	ХС	ТГ	ХС ЛПВП	АпоА1	АпоВ	В/А1	Доля ЛПВП, %	
								2В	3В
Нормальный (n=9)	До ЖН	179±7,1	60±5,8	51±2,5	136±3,5	111±5,3	0,81±0,043	31±4,9	21±2,4
	После ЖН	176±5,9	124±22,7**а	52±3,1	149±7,1**а	111±4,6	0,76±0,051	34±4,4	22±2,4
Дислипидемия (n=8)	До ЖН	251±21,8*а	118±20,5*а	49±6,3	144±7,2	153±14,8*а	1,08±0,122*а	25±5,4	28±1,9*а
	После ЖН	245±20,5*б	227±10,0*б,в	47±3,7	141±9,4	158±5,0*б	1,15±0,131	23±4,9	31±1,5*б

Примечание. а — достоверно по сравнению с показателем у здоровых с нормальным спектром натошак, б — у здоровых с нормальным спектром после ЖН, в — у здоровых с дислипидемиями натошак.

содержанием ХС ЛПВП1 и апоА1 у больных. Размеры частиц подфракций ЛПВП_{2В} и ЛПВП_{3В} находились в пределах, указанных в литературе для каждой из подфракций [4], а также в границах данных, полученных в предыдущих популяционных исследованиях среди мужчин, проживающих в Москве [21].

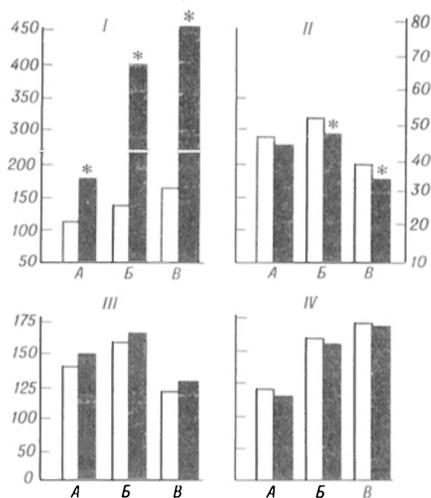
Через 3 ч после ЖН исходно имеющиеся различия в показателях системы ЛП в группах больных ИБС и здоровых сохранялись. В ответ на ЖН в каждой группе приблизительно в 2 раза достоверно увеличилось содержание ТГ плазмы, но степень алиментарной гипертриглицеридемии в группе больных оказалась значительно выше, чем в группе здоровых лиц, и это было сопряжено с достоверным повышением процентной доли подфракции ЛПВП₃ у больных ИБС. Степень повышения уровня ТГ в ответ на одинаковую ЖН у отдельных индивидуумов значительно варьировала — от 8 до 324 % в группе здоровых и от 27 до 212 % у больных ИБС, что может быть связано с разной свойственной каждому обследуемому активностью липопротеидолиза, которая, как показано [18—20], отражается и на уровне ЛПВП, особенно их подфракции ЛПВП_{2В}. Для решения этого вопроса в каждой из групп были выделены подгруппы с низкой и высокой долей ЛПВП_{2В} в соответствии с отклонениями от отрезных точек, разделяющих весь ряд значений доли ЛПВП_{2В} на три части (терцили), т. е. ниже 15 % или выше 34 %.

Было обнаружено, что как у здоровых, так и у больных ИБС с низкой долей ЛПВП₂ ($14 \pm 0,37$ и $12 \pm 1,6$ %) выше и исходный уровень ТГ ($117 \pm 33,4$ и $161 \pm 22,1$ мг/дл), и гипертриглицеридемический ответ ($143 \pm 31,2$ и $103 \pm 25,1$ %) по сравнению с таковыми у лиц, имеющих высокую долю ЛПВП_{2В} ($44 \pm 3,4$ и $41 \pm 2,5$ %), у которых более низок исходный уровень ТГ ($77 \pm 18,2$ и $96 \pm 11,2$ мг/дл) и меньше триглицеридемический ответ (на $53 \pm 14,1$ и $58 \pm 13,3$ %).

Для ответа на вопрос, имеется ли специфика в ответе на ЖН у больных ИБС и здоровых в зависимости от исходного спектра липидов, данные были проанализированы с учетом отклонений их от «норм» уровней липидов, принятых согласно рекомендациям ЕОА. Было установлено, что такие отклонения имели все больные ИБС ($n=31$) и 8 из 18 здоровых лиц (у всех 8 была гиперхолестеринемия, в одном случае сопряженная с гипертриглицеридемией).

Как видно из табл. 2, подгруппа здоровых лиц с дислипидемиями отличалась от подгруппы здоровых лиц с нормальным спектром липидов не только более высокими уровнями общего ХС, ТГ, апоВ и большей величиной отношения апоВ/апоА1, но и более высокими значениями процентной доли ЛПВП_{3В}.

Через 3 ч после ЖН у здоровых лиц (как с нормолипидемией, так и с дислипидемиями) приблизительно в 2 раза увеличилось среднее содержание ТГ плазмы. У здоровых лиц с нормальным липидным спектром уровень апоА1 достоверно повысился в среднем на 14 ± 6 %, у отдельных лиц отклонения его от исходного уровня колебались от 0 до 47 %, т. е. в пределах физиологической нормы. У здоровых лиц с дислипидемиями уровень апоА1 в среднем не изменился и находился



Содержание (в мг/дл) липидов и аполипопротеидов в плазме здоровых лиц и больных ИБС через 6 ч ЖН.

I — ТГ; II — ХС ЛПВП; III — апоА1; IV — апоВ. А — нормолипидемия ($n=6$); В — здоровые лица с дислипидемиями ($n=6$); В — больные ИБС с дислипидемиями ($n=24$). Светлые столбики — до ЖН, темные — после ЖН. Звездочка — $p < 0,05$ по критерию Вилкоксона.

в пределах от -10 до 16% . У больных ИБС уровень апоА1 через 3 ч после нагрузки в среднем не изменился, при этом у 10 больных он снизился на $5-26\%$, у 17 остался прежним и только у 2 лиц он повысился не более чем на 5% .

Исследование через 6 ч после ЖН было проведено у 9 здоровых лиц и 27 больных ИБС. Из них в каждой группе с нормолипидемиями оказалось только по 3 человека, которые не различались между собой по уровням липидов и апопротеидов. Поэтому для сравнительного анализа с группами лиц, имеющих дислипидемии (6 здоровых и 24 больных ИБС), использовали данные по суммарной группе обследованных с нормолипидемиями ($n=6$). Как видно из рисунка, через 6 ч после приема ЖН еще были увеличены уровни ТГ во всех группах. Однако только в группах лиц с дислипидемиями (как у здоровых, так и у больных) снизился уровень ХС ЛПВП ($p < 0,05$). Уровни основных апопротеидов не были изменены.

Обычно наблюдающаяся в состоянии натощак отрицательная корреляция между уровнями ТГ и ХС ЛПВП, которая была обнаружена и в обследованных нами группах, обусловлена тем, что в процессе липопротеидлиполиза частиц, обогащенных ТГ, часть ХС поверхностного их слоя отщепляется и переходит в состав частиц ЛПВП1. Задачей корреляционного анализа полученных нами данных было выяснить, вовлечен ли и в какой степени этот процесс в детерминацию показателей системы

обратного транспорта ХС ЛПВП после ЖН. Как видно из табл. 3, величины отрицательных коэффициентов корреляции показателей ТГ и ХС ЛПВП_{2В} достигали значимых величин после ЖН. Это указывает на сохранение, если не на увеличение, значения активности процесса липопротеидлиполиза у каждого человека в интенсификации оттока ХС с хиломикронов на частицы ЛПВП1 с образованием крупных частиц ЛПВП_{2В}, транспортирующих ХС в печень [18].

В то же время было показано [20], что увеличение содержания ТГ в ядре частиц ЛПВП₂ у лиц с гипертриглицеридемией делает такие частицы удобным субстратом для печеночной триглицеридлипазы, обладающей также фосфолипазной активностью: после гидролиза фосфолипидов и ТГ во фракции ЛПВП_{2В} последние уменьшаются в размере, не теряя, однако, ХС, и возвращаются в кровотоки в виде ЛПВП_{3В}. По-видимому, у больных ИБС с гипертриглицеридемией преобладает путь, предполагающий нарушение оттока ХС в составе ЛПВП_{2В} в печень как исходно, так и после ЖН и возврат ХС в кровотоки. Об этом может свидетельствовать положительная корреляционная взаимосвязь ТГ — ЛПВП_{3В} у больных ИБС. Очевидно, такое нарушение вносит свой вклад в снижение функциональной активности и нарушение антиатерогенных свойств ЛПВП1.

У больных ИБС обнаружена отрицательная корреляционная связь между показателями ТГ и апоА1 как до, так и после ЖН. В литературе имеются различные представления относительно динамики уровней апоА1 после ЖН. Так, с помощью радиальной иммунодиффузии было показано увеличение в плазме апоА1 после ЖН [12, 22]. Однако другие авторы [9] не обнаружили у 10 обследованных лиц изменений в концентрации апоА1 через 5 ч после ЖН. Известно, что часть апоА1 имеет кишечное происхождение: из образующихся после ЖН апоА1 до 70% их поступает в кровяное русло с хиломикронами, сразу переходя от хиломикронов к ЛПВП1 [7]. У разных людей этот процесс, по-видимому, имеет разный удельный вес. Если повышение уровня апоА1 у здоровых лиц через 3 ч после ЖН играет как бы защитную, «антиатерогенную» роль в утилизации жиров после регулярной пищевой липемии, то отсутствие такой реакции у больных ИБС позволяет предполагать нарушение этого защитного механизма. Снижение через 6 ч после нагрузки уровня ХС ЛПВП1 как у больных ИБС, так и у здоровых с дислипидемиями ухудшает систему оттока ХС из периферических тканей вследствие нарушений в каскаде реакций

Таблица 3

Корреляционные связи между исследуемыми параметрами

Группа обследуемых	Время исследования (3 ч)	ТГ — ХС ЛПВП1	ТГ — доля ЛПВП1 _{2В}	ТГ — доля ЛПВП1 _{3В}	ТГ — апоА1
Здоровые лица ($n=19$)	До ЖН	$-0,5372^*$	$-0,3260$	$0,1970$	$0,3470$
	После ЖН	$-0,4679^a$	$-0,5328^*$	$0,1970$	$0,5710$
Больные ИБС ($n=13$)	До ЖН	$-0,6552^a$	$-0,5297$	$0,5951^a$	$-0,7150^*$
	После ЖН	$-0,4212$	$-0,6022^a$	$0,6515^*$	$-0,6587^*$

Примечание. Звездочка — $p < 0,05$; а — $0,05 < p < 0,01$.

захвата ХС липопротеидами высокой плотности.

Таким образом, использование ЖН позволило обнаружить латентные сдвиги в системе ЛП у больных ИБС по сравнению со здоровыми лицами, имеющими нормальный липидный спектр: отсутствие увеличения содержания апоА1 и повышения доли подфракции ЛПВЛ_{3В} через 3 ч и снижение уровня ХС ЛПВП к 6 ч после ЖН. Очевидно, эти отклонения могут служить тестами для выявления скрытых атерогенных дефектов в системе ЛПВП.

ЛИТЕРАТУРА

1. Никульчева Н. Г., Солдтернова И. Б., Криворученко И. В. // Вопр. мед. химии.—1980.— № 6.— С. 808—812.
2. Никульчева Н. Г., Солдтернова И. Б., Криворученко И. В. // Там же.—1983.— № 2.— С. 35—40.
3. Перова Н. В., Щербакова И. А., Печав А. С. и др. // Кардиология.—1985.— № 10.— С. 91—95.
4. Фортэ Т. // Липопротеиды высокой плотности и атеросклероз.— М., 1983.— С. 51—61.
5. Щербакова И. А., Перова Н. В., Метельская В. А. и др. // Вопр. мед. химии.—1986.— № 2.— С. 93—102.
6. Щербакова И. А., Перова Н. В., Щельцина Н. В. // Там же.—1989.— № 1.— С. 81—89.
7. Anderson D. W., Schaefer E. J., Bronzert T. J. et al. // J. clin. Invest.—1981.— Vol. 67.— P. 857—866.
8. Blanche P. J., Gong E. L., Forte T. M. et al. // Biochim. biophys. Acta.—1981.— Vol. 665.— P. 409—419.
9. Castro G. R., Fielding C. J. // J. clin. Invest.—1985.— Vol. 75.— P. 874—882.
10. Cohn J. S., McNamara J. R., Cohn S. D. et al. // J. Lipid. Res.—1988.— Vol. 29.— P. 469—479.
11. Curry M. D., Alaupovic P., Suernam C. A. // Clin. Chem.—1976.— Vol. 22.— P. 315—322.
12. Groot P. H. E., Scheek L. M. // J. Lipid. Res.—1984.— Vol. 25.— P. 684—692.
13. Krauss X. H., Groot P., Van Ramshorst E. et al. // Circulation.—1987.— T. 14.— Suppl. 4, N 1285.
14. Lindgren F. T. // Analysis of Lipid and Lipoprotein / Ed. E. C. Perkins.— Champaign, 1975.— P. 204—224.
15. Manual of Laboratory Operations: Lipid Research Clinics Program.— Washington, 1974.— Vol. 1.
16. Maruhama J., Abe R., Okuguchi F. et al. // J. exp. Med.—1977.— Vol. 122, N 2.— P. 183—189.
17. Nichols A. V., Blanche P. J., Krauss R. M. et al. // High Density Lipoprotein Methodology Workshop: Report.— Bethesda, 1979.— P. 303—309.
18. Patsch J. R., Karlin J. B., Scott L. et al. // Clin. Res.—1982.— Vol. 29.— P. 871—A.
19. Patsch J. R., Karlin J. B., Scott L. et al. // Proc. nat. Acad. Sci. USA.—1983.— Vol. 80, N 5.— P. 1449—1453.
20. Patsch J. R., Prasad S., Gotto Jr. A. M. et al. // J. clin. Invest.—1984.— Vol. 74.— P. 2017—2023.
21. Perova N. V., Metelskaya V. A., Anufrieva N. V. et al. // Atheroscler. Rev.—1988.— Vol. 17.— P. 29—38.
22. Tall A. R., Blum C. B., Forester G. P. et al. // J. biol. Chem.—1982.— Vol. 257.— P. 198—207.

Поступила 09.01.90

EFFECT OF A SINGLE FATTY LOADING ON PATTERNS OF THE LIPOPROTEIN SYSTEM IN BLOOD PLASMA OF PATIENTS WITH ISCHEMIC HEART DISEASE AND OF HEALTHY PERSONS

I. A. Scherbakova, N. V. Perova, E. I. Sokolov, G. N. Schukina, V. A. Metelskaya, N. A. Nikitina, V. M. Fomina

All-Union Research Centre of Prophylactic Medicine, Ministry of Public Health of the USSR, N. A. Semasko Medical Stomatological School, Moscow

Effects of fatty loading on patterns of the lipoprotein system were studied in blood plasma of 39 patients with ischemic heart disease and of 21 healthy volunteers and were carried out on fasting individuals within 3 and 6 hrs after the loading. Alterations were detected in the lipoprotein system of the patients as compared with healthy persons. In the patients with ischemic heart disease content of apol

was not increased while subfraction of high density lipoproteins HDL_{3B} was elevated within 3 hrs and cholesterol content was decreased within 6 hrs after the fatty loading. These alterations appear to be applicable as tests for detection of latent atherogenous defects in the HDL system.

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 1991

УДК 616.12-008.331.1-07:616.153.915-39

A. A. Сюрин, Г. В. Кобозев, Ю. И. Кулагин, Л. Г. Сафронова, Е. И. Аникин, С. Б. Кабелюженко, В. С. Скоробацкий

ПЕРЕКИСНОЕ ОКИСЛЕНИЕ ЛИПИДОВ И ИЗМЕНЕНИЕ ЛИПИДНЫХ ФРАКЦИЙ ПЛАЗМЫ КРОВИ У БОЛЬНЫХ ГИПЕРТОНИЧЕСКОЙ БОЛЕЗНЬЮ

Крымский медицинский институт, Симферополь

Имеются сведения, что в плазме крови больных гипертонической болезнью (ГБ) и спонтанно-гипертензивных крыс повышено содержание продуктов перекисного окисления липидов (ПОЛ) [12, 19]. По мнению отдельных исследователей [12, 13], это явление объясняется повышением в крови уровня субстратов-липидов, инициацией проокислительной активности плазмы крови и связано с гиперлипидемией. Однако повышение ПОЛ плазмы, выявленное и при других заболеваниях [3, 5, 15, 17], может быть также связано и с выходом продуктов ПОЛ в кровь [17], так как липо-перекиси, образующиеся при инициации ПОЛ в тканях и, в частности, в клеточных мембранах, становясь уже более полярными, легко из них выходят [1]. Не исключен подобный механизм повышения ПОЛ плазмы и при ГБ. В связи с этим целью работы явилось исследование влияния перекисно-липидных процессов на состав липидов плазмы крови у больных ГБ.

Методика. У 20 больных ГБ II стадии (12 женщин и 8 мужчин), средний возраст которых составлял 39 ± 4 года, и 60 здоровых доноров (средний возраст 37 ± 2 года) изучены уровень ПОЛ плазмы и мембран эритроцитов, количество общих липидов плазмы, процентное содержание и количество отдельных фракций липидов плазмы крови. Больные исследованы в динамике: в 1-ю, 2-ю и 3—4-ю декады от начала обострения заболевания (гипертонического криза). Здоровые исследовались однократно. Эритроцитарные мембраны (ЭМ) получали по методу [14]. Содержание продуктов ПОЛ (диеновые конъюгаты и диенкетоны) определяли по модифицированной методике З. Плацер [6] и выражали в усл. ед. на 1 мг общих липидов; общие липиды — по модифицированному методу Nu. Zollner, K. Kirsch [10]; фракции липидов плазмы — нейтральные липиды (НЛ), холестерин (ХЛ), фосфатидилэтанолламин (ФЭЛ), фосфатидилхолин (ФХ), сфингомиелин (СМ), неидентифицированные минорные компоненты фосфолипидов (МКФ) — методом тонкослойной хроматографии [7] в нашей модификации [8].

Результаты и обсуждение. Из таблицы видно, что содержание продуктов ПОЛ в ЭМ и плазме крови больных ГБ изменялось в зависимости от периода исследования. Так, в 1-ю декаду после начала обострения заболевания интенсивность ПОЛ в ЭМ достигала своего максимума и значительно снижалась уже во 2-й декаде. Интенсивность ПОЛ плазмы повышалась гораздо медленней и достигала максимальной выраженности лишь во 2-й декаде, что отмечалось и другими

исследователями [11]. Корреляционная зависимость между уровнем ПОЛ в ЭМ и плазмы крови за весь период наблюдения больных нами не установлена.

Отмечалась своеобразная динамика изменений и общего количества липидов плазмы в различные периоды исследований. В 1-ю декаду их количество по сравнению со здоровыми не изменялось, но затем, по мере снижения интенсивности ПОЛ в ЭМ, все более возрастало, достоверно превышая норму. Взаимосвязь между содержанием общих липидов в плазме и интенсивностью ПОЛ в ЭМ подтверждается наличием между этими показателями высокой обратной корреляции ($r = -0,91$).

Изменения в составе липидных фракций плазмы крови на разных этапах исследования также имели свои особенности. В 1-й декаде по сравнению со здоровыми обнаружено снижение процентного содержания и количества ФЭЛ, повышение процентного содержания и количества ФХ и СМ; во 2-й декаде выявлено достоверное увеличение количества ФЭЛ, ФХ и СМ; в 3—4-й декаде обнаружено увеличение количества НЛ (основной составляющей которых являются триглицериды), ХЛ, ФХ, СМ и достоверное снижение процентного содержания ФЭЛ. Увеличение в плазме крови триглицеридов, холестерина и снижение уровня фосфолипидов у больных ГБ во внекризовом периоде отмечались ранее и другими авторами [9, 18]. Сопоставление в течение всего периода наблюдения интенсивности процессов ПОЛ в ЭМ и содержания НЛ, ХЛ, ФХ, СМ в плазме выявило между ними обратную корреляционную связь (r соответственно $-0,61$; $-0,66$; $-0,72$; $-0,70$); корреляции этих показателей с содержанием продуктов ПОЛ в плазме не обнаружено. Обращает внимание динамика изменения содержания ФЭЛ. Так, в течение 1—2-й декады отмечается взаимосвязь между содержанием ФЭЛ и интенсивностью ПОЛ в ЭМ. Затем по достижении максимального уровня во 2-й декаде и в дальнейшем процентное содержание ФЭЛ в отличие от других фракций снижалось ниже нормы, хотя это изменение не носило достоверный характер. На протяжении всего периода наблюдения изменения в содержании ФЭЛ коррелировали с динамикой ПОЛ плазмы, но, что следует подчеркнуть, взаимосвязь между этими показателями носила прямой характер ($r = 0,79$). Уровень неидентифицированных МКФ за весь период исследования достоверно не изменялся.

В целом полученные данные можно интерпретировать на наш взгляд следующим образом. Различная интенсивность процессов ПОЛ в ЭМ и плазме, обратная корреляция между содержанием общих липидов плазмы и большинства их фракций с интенсивностью ПОЛ в ЭМ и отсутствие таковой с ПОЛ плазмы могут свидетельствовать о том, что накопление в плазме крови больных ГБ продуктов ПОЛ связано в основном с предшествующей вспышкой перекисления липидов в клеточных мембранах, которая меняет структуру липидов плазмы, влияя, по-видимому, на их метаболизм. При этом в начальный период обострения ГБ (по сравнению с 3—4-й декадой) инициация ПОЛ мембран приводила к снижению главным образом синтеза ФЭЛ. Значительное повышение

Содержание продуктов ПОЛ в эритроцитарных мембранах, плазме крови и липидов в плазме крови у больных гипертонической болезнью в различные сроки от начала обострения заболевания

Исследуемые группы	Продукты ПОЛ, усл. ед. на 1 мг. липидов		Общие липиды плазмы, мг/мл	Фракции липидов плазмы, в % к общим липидам				МКФ	
	эритроциты	плазма		НЛ	ХЛ	ФЭЛ	ФХ		СМ
Здоровые лица (n=60)	0,052±0,002	0,036±0,001	7,73±0,19	0,96±0,05 12,18±0,67	0,72±0,04 9,27±0,46	1,90±0,08 24,59±1,10	2,32±0,07 30,04±0,87	1,74±0,06 22,49±0,80	0,10±0,03 1,28±0,40
Больные ГБ:									
1-я декада (n=20)	0,082±0,003*	0,042±0,002*	7,55±0,24	0,88±0,07 11,66±0,93	0,67±0,06 8,81±0,80	1,30±0,11* 17,23±1,46*	2,68±0,11* 35,41±1,51*	1,98±0,09* 26,20±1,16*	0,04±0,04 0,49±0,49
2-я декада (n=20)	0,059±0,002*	0,053±0,003*	9,54±0,39*	1,20±0,30 12,63±1,40	0,79±0,06 8,26±0,66	2,36±0,20* 25,72±2,12	2,93±0,14* 30,81±1,43	2,18±0,16* 22,89±1,68	0,10±0,07 1,00±0,69
3—4-я декада (n=14)	0,048±0,002	0,036±0,002	10,06±0,36*	1,32±0,16* 13,16±1,59	1,03±0,09* 10,20±0,91	1,73±0,09 17,24±0,92*	3,43±0,20* 34,08±1,95	2,41±0,19* 23,93±1,87	0,14±0,09 1,39±0,94

* Достоверные различия ($p < 0,05$) по сравнению со здоровыми лицами.

150М, УАМ-50М «Владипор» [6]. Фракционирование СМП осуществляли на колонне 5,6×50 см с сорбентом G-15. Элюицию проводили дистиллированной водой. Профиль элюции регистрировали по оптической плотности при 206 нм с помощью системы «Lutesta» (ЛКВ, Пенза). Содержание непереносимого компонента в полученных фракциях оценивали по методам [25, 28] и выражали в микрограммах альбуминового эквивалента на 1 мл кров. Аппроксимативную активность (АОА) фракций СМП определяли по методу [21] с модификациями. Суть последних заключалась в увеличении объема тестируемого образца до 0,1 мл и постановке параллельного контроля на генерацию неспецифического окисляющего пероксидазного фермента при ультрафиолетовом облучении фракций СМП в 0,9% растворе NaCl. Эти контрольные значения учитывались при расчете АОА СМП. Вносимые в окислительную пробу в количестве, эквивалентные содержанию в 10 мл крови собачь. Эксперименты по изучению влияния СМП на ПОД обожженных животных проводены на 192 белых бесполых крысах-самках массой 180—250 г. Животным, наркотизированным диэтилом эфиром, при помощи катетерно-гальванической лампы нанесли ожог ПИ6—IV степени площадью 10—15% поверхности тела. За 30 мин до травмы крысам внутривенно вводили растворы фракций СМП в 0,9% NaCl в объеме 1 мл в дозе, эквивалентной содержанию СМП в 10 мл крови собак. Контрольным животным вводили равный объем 0,9% NaCl. Первые две (гидрокортизон) и вторые две (нарколизин) догексальные продукты ПОД определяли спектрофотометрически в гетаноловой (содержащей нейтральные липиды) и изопропанольной (содержащей фосфолипиды) фазах липидного экстракта [8]. Содержание продуктов ПОД исследовали в клеточных суспензиях тиауса и селезенки, а также в плазме крови. Параллельно в суспензиях лимфоидных органов подсчитывали количество эритроцитов (ИСК) с помощью окраски вали раствором Тюрка (0,01% раствор глицеринового фиолетового в 3% уксусной кислоте) и подсчитывали в 20-кратных увеличениях камеры Горяева. Кроме того, в плазме крови обожженных крыс определяли содержание суммарной фракции СМП [25]. Деятельность мышечной, обожженных при тех же условиях, что и крысы (П16—IV степень, 10—15% поверхности тела), на фоне предварительного введения той же дозы СМП в объеме 0,2 мл регистрировали в течение 30 сут после термической травмы. В работе использована 371 белая бесполородная мышь-самец массой 18—22 г. Влияние СМП на спонтанную миграцию нейтрофилов крови человека оценивали по методу [24] в отсутствие хемотрактантов. СМП разводили в среде 199 и вносили в лунки агарозного геля из расчета: СМП из 1 мл крови собак на 10⁵ нейтрофилов. В эксперименте использована кровь 5 здоровых доноров. Результаты выражали как индекс хемокинеза (ИХК):

$$\text{ИХК} = \frac{\text{Миграция нейтрофилов в присутствии СМП}}{\text{Миграция нейтрофилов в отсутствие СМП}} \times 100\%$$

Результаты обработаны статистически с использованием критерия Стьюдента, Вилкоксона—Манна—Уитни, критерия знаков, точного критерия Фишера, критерия Колмогорова—Смирнова, а также параметрического коэффициента корреляции Спирмена и коэффициента конкордации [12, 20].

Результаты и обсуждение. Из крови как интактных, так и обожженных собак было получено по 5 фракций СМП при полной идентичности эволюционного профиля (рис. 1). Фракции,

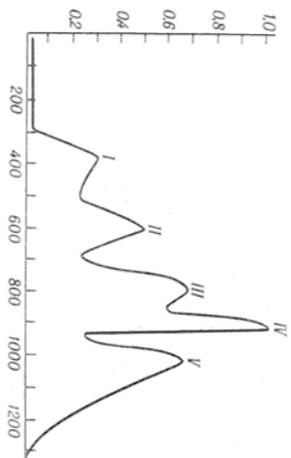


Рис. 1. Эволюционный профиль СМП крови собак.

По оси абсцисс — эволюционный объем, мл; по оси ординат — оптическая плотность элюата при 206 нм; I—V — фракции СМП в порядке выхода с колонны.

Характеристика фракций СМП и их влияние на летальность мышей после ожога и хемокинез нейтрофилов

Показатель	Фракция								
	2 «норма»	2 «ожог 12 ч»	2 «ожог 24 ч»	3 «норма»	3 «ожог 12 ч»	3 «ожог 24 ч»	4 «норма»	4 «ожог 12 ч»	4 «ожог 24 ч»
Содержание ЛПВ	2,0	7,2	3,19	2,38	12,8	3,64	1,81	15,2	8,6
Содержание БПВ	49,96	135,8	144,1	28,0	76,4	50,5	7,58	90,9	31,9
БПВ/ЛПВ	24,98	18,86	45,17	11,76	5,97	13,87	4,19	5,98	3,71
АОА, %	3,95	30,74	—40	32,35	75,56	45,16	19,85	88,03	48,63
Смертность мышей на 7-е сутки после ожога	125,68	209,5***	115,56	125,36	210,01***	195,14**	106,79	166,67	140,42
Смертность мышей на 30-е сутки после ожога	113,05	102,23	113,73	109,01	98,82	166,66**	109,01	90,21	117,24
Средняя продолжительность жизни погибших мышей (СПЖ)	40,41 (29,5—324,5)	19,31** (9,2—265,8)	80,03 (32,7—425)	38,23 (29,5—88,5)	9,5** (9,2—18,3)	46,67* (19,4—447,2)	85,25 (29,5—442,5)	43,84* (9,2—265,8)	46,9 (19,4—427,8)
ИХК нейтрофилов крови человека	105,81 (54,55—175)	63,62 (20—155,56)	86,42 (66,67—118,18)	57,31* (30—77,78)	41,41* (20—86,67)	36,37 (10,91—100)	71,16 (9,09—144,44)	51,18 (4,44—120)	27,06* (7,27—44,44)

Примечание. Данные по ЛПВ, БПВ и АОА получены в результате 5 параллельных определений; содержание ЛПВ и БПВ выражено в микрограммах альбуминового эквивалента на 1 мл крови собак. Данные по летальности мышей и СПЖ представлены в процентах от контроля (в каждой группе использовано 20—30 мышей). Для СПЖ и ИХК в скобках указаны пределы колебаний, для показателей летальности пределы колебаний не указаны, так как это альтернативные признаки. Одна звездочка — $p \leq 0,05$, две — $p < 0,01$, три — $p < 0,001$. Данные по летальности обработаны с использованием точного критерия Фишера, по СПЖ — критерия Колмогорова — Смирнова, по ИХК — критериев знаков.

как и ранее [4—7], нумеровали в порядке выхода с колонки. В работе использовали фракции с наибольшей биологической активностью :2 (элюционный объем $666 \pm 12,52$ мл), 3 (элюционный объем $803,25 \pm 3,79$ мл) и 4 (элюционный объем $934,38 \pm 14,36$ мл) [4—6]. Как видно из таблицы, определение СМП по методу Лоури дает значительно более низкие значения, чем биуретовый метод. Количественным выражением данного несоответствия для различных фракций СМП является коэффициент БПВ/ЛПВ, отражающий отношение содержания биурет-положительных веществ (БПВ) во фракциях к Лоури-положительным веществам (ЛПВ). Аналогичная закономерность описана для белков, при аналитическом определении которых референтными методами являются биуретовые (Б), в то время как метод Лоури (Л) всегда дает заниженные значения [26]. Известно, что основными компонентами, определяющими способность белков взаимодействовать с реактивом Фолина—Чокальтеу, являются тирозин, триптофан и в меньшей степени серосодержащие аминокислоты и гистидин [23], поэтому соотношение Б/Л можно считать мерой удельного содержания данных аминокислот в пептидах отдельных фракций. Очевидна общая для всех исследованных фракций закономерность изменения содержания ЛПВ в динамике после ожога. Так, максимальное значение данного показателя наблюдается через 12 ч после ожога, минимальное в норме, а соответствующие величины через 24 ч после травмы занимали промежуточное положение ($w=1,0$; $p<0,05$). Как видно из таблицы, большинство фракций СМП обладало выраженной АОА, величины которой хорошо соотносятся с количеством ЛПВ в испытанных фракциях ($\rho=0,82$; $p<0,01$). Полученные нами результаты подтверждают данные других авторов [11, 22] об антиокислительных эффектах СМП *in vitro*, а также позволяют объяснить последние наличием в составе СМП Лоури-хромогенных аминокислот, в частности тирозина и цистеина, антиоксидантные свойства которых известны [13, 19]. Вместе с тем несомненна обратная зависимость между содержанием ЛПВ в исследованных фракциях и спонтанной подвижностью нейтрофилов в присутствии СМП ($\rho=-0,667$; $p<0,05$). Зависимость прослеживается также между содержанием ЛПВ во фракциях СМП и способностью последних усиливать летальность обожженных мышей на 7-е сутки после травмы ($\rho=0,75$; $p<0,05$). По-видимому, как антиокислительные свойства СМП, так и их повреждающее действие на биологические объекты различного уровня организации определяются содержанием ЛПВ.

После термической травмы наблюдается некоторая разнонаправленность динамики содержания продуктов ПОЛ в исследованных тканях и суммарной фракции СМП в плазме крови (рис. 2). Однако значимость этих взаимосвязей не получила подтверждения при корреляционном анализе. Полученные данные свидетельствуют об отсутствии одностороннего влияния пептидемии на ПОЛ в лимфоидных органах и плазме крови.

Известно, что введение в организм экзогенных пептидов увеличивает содержание эндогенных биорегуляторов пептидной природы в силу

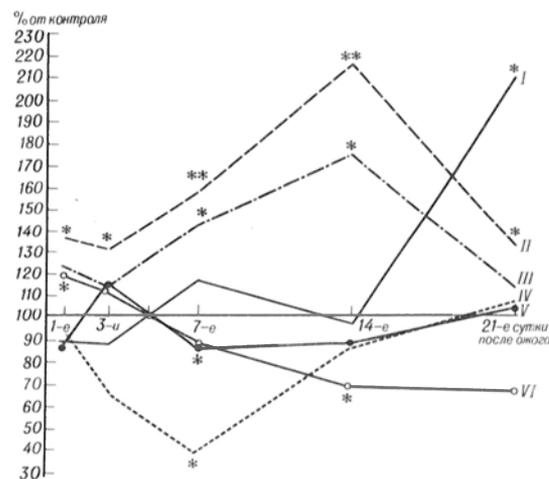


Рис. 2. Динамика изменения содержания суммарной фракции СМП, продуктов ПОЛ и состояния лимфоидных органов после ожога у крыс.

I — содержание вторичных гептаэрастворимых продуктов ПОЛ в тимусе; II — количество ЯСК селезенки на 1 г массы тела; III — содержание суммарной фракции СМП в плазме крови; IV — содержание ЯСК тимуса на 1 г массы тела; V — содержание первичных гептаэрастворимых продуктов ПОЛ в селезенке; VI — содержание вторичных изопронаэрастворимых продуктов ПОЛ в плазме крови. Результаты обработаны при помощи критериев Стьюдента и Вилкоксона — Манна—Уитни; одна звездочка — $p \leq 0,05$, две — $p < 0,01$.

конкурентных отношений с последними за системы энзиматической деградации [27]. Этому теоретическому положению хорошо соответствуют данные, полученные нами в экспериментах с воспроизведением термической травмы на фоне предварительного введения крысам различных фракций СМП. На 7-е сутки после ожога у животных, получавших СМП перед травмой, наблюдалось более или менее выраженное усугубление пептидемии, которое достигало статистически значимого уровня при применении фракций 2 «ожог 24 ч», 3 «ожог 12 ч» и 3 «ожог 24 ч» (рис. 3). Срок 7 дней с момента нанесения травмы был выбран для исследования как соответствующий наибольшей тяжести состояния, о чем судили по максимально выраженной гипоплазии вилочковой железы (см. рис. 2). Важно отметить, что все фракции СМП, вызывавшие значимое потенцирование пептидемии при ожоге у крыс, одновременно снижали содержание продуктов липопероксидации в организме животных. При этом фракция 2 «ожог 24 ч», предварительное введение которой сопровождалось наибольшим увеличением пептидемии (на 60 %; $p < 0,01$), вызывала также самое пространственное снижение содержания продуктов ПОЛ в лимфоидных органах и плазме крови (см. рис. 3). Интересным представляется прооксидантное действие этой фракции в модельной системе, что выражается отрицательным значением соответствующей АОА (см. таблицу). По-видимому, усиление ПОЛ в мембранах эритроцитов при ультрафиолетовом облучении в присутствии СМП фракции 2 «ожог 24 ч» является следствием структурного прооксидантного действия последних, так как примененный нами метод [21] определения АОА предусматривает полное переокисление всех доступных липидов в контроле. Превысить данный уровень пероксидации, вероятно, можно только за счет увеличения доступности мембранных липидов для кислорода, что и лежит в основе действия структурных

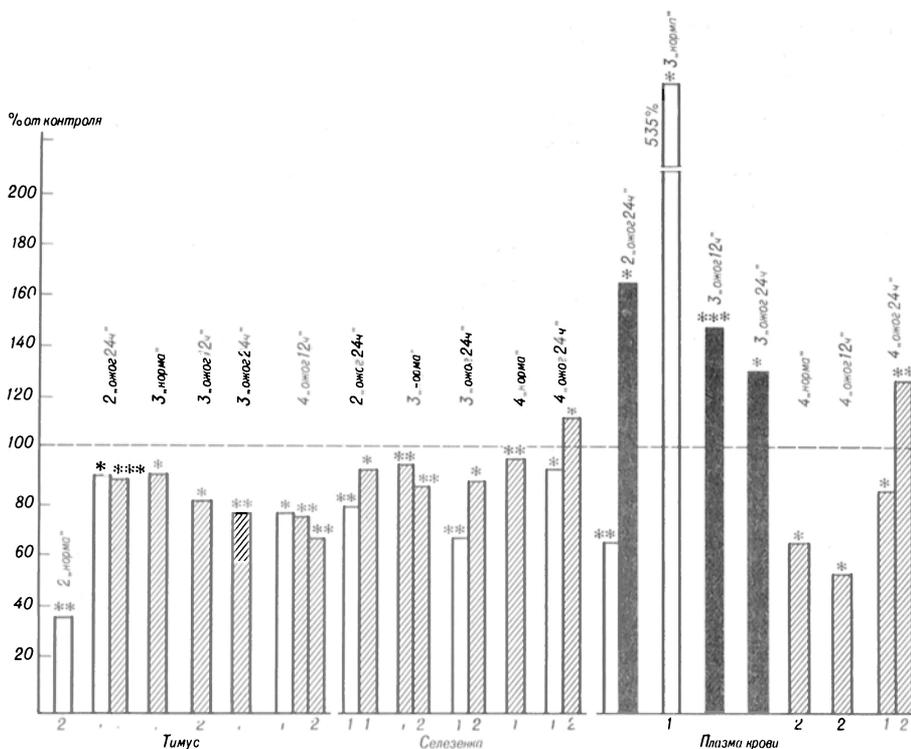


Рис. 3. Влияние предварительного введения СМП на содержание продуктов ПОЛ и суммарной фракции эндогенных СМП у обожженных крыс (7-е сутки после ожога).

Темные столбики — суммарная фракция эндогенных СМП, светлые — гептанрастворимые продукты ПОЛ, штрихованные — изопропанолрастворимые продукты ПОЛ; 1 — первичные продукты ПОЛ; 2 — вторичные продукты ПОЛ. Одна звездочка $p \leq 0,05$; две — $p < 0,01$; три — $p < 0,001$. Данные обработаны при помощи критериев Стьюдента и Вилкоксона — Манна — Уитни.

прооксидантов [14]. Противоположное влияние фракции 2 «ожог 24 ч» на липопероксидацию *in vitro* и *in vivo* позволяет предположить непричастность собственно АОА пептидов данной фракции к регуляции ПОЛ в условиях цельного организма. В пользу этого предположения свидетельствуют также данные литературы о высокой скорости биodeградации экзогенных пептидов *in vivo* [2]. В то же время мы исследовали содержание продуктов ПОЛ у крыс лишь на 7-е сутки после термической травмы на фоне введения СМП. Возможно, инъекция СМП вызывает каскадную, длительно персистирующую реакцию, связанную с угнетением биodeградации веществ пептидной природы эндогенного происхождения. Последние в силу присущих им в большинстве случаев антиоксидантных свойств, вероятно, могут осуществлять непосредственную регуляцию ПОЛ. Нельзя исключить также существование других, альтернативных путей регуляции ПОЛ при введении экзогенных СМП. Об этом свидетельствует, в частности, снижение содержания продуктов липопероксидации после ожога на фоне введения всех фракций СМП из крови интактных собак, а также фракций 4 «ожог 12 ч» и 4 «ожог 24 ч». Все перечисленные фракции не обладали способностью вызывать статистически значимый прирост содержания СМП в крови обожженных животных. Следует обратить внимание на способность фракции 3 «норма» увеличивать содержание первичных гептанрастворимых продуктов ПОЛ (гидроперекисей нейтральных липидов) в плазме крови на 435 % ($p < 0,05$) при наличии выраженной антиоксидантной активности данной фракции *in vitro* (см. таблицу). Последнее противоречие свойственно также фракции 4 «ожог 24 ч», которая, проявляя антиоксидантные свойства *in vitro*, повышала содержание карбонильных продуктов peroxyсления фосфолипидов в селезенке

и плазме крови (см. рис. 3). По-видимому, регуляторные эффекты СМП в отношении ПОЛ нельзя свести полностью лишь к подавлению липопероксидации. В пользу последнего положения свидетельствует описанная нами ранее способность СМП фракции 4 «норма» при внутривенном введении интактным мышам вызывать накопление продуктов ПОЛ в ткани головного мозга [7]. Сложность и неоднозначность регуляторных эффектов СМП на ПОЛ иллюстрируются также тем, что различные фракции СМП вызывают изменения различных категорий продуктов липопероксидации практически в каждом из исследованных органов и плазме крови. В отдельных случаях фракции СМП оказывают изолированное влияние на peroxyсидацию либо нейтральных липидов (гептанрастворимых), либо фосфолипидов (изопропанолрастворимых). Неоднозначно также влияние СМП на содержание первичных (гидроперекисей) и вторичных (карбонильных) молекулярных продуктов ПОЛ. Тем не менее в большинстве случаев СМП угнетали ПОЛ как *in vitro*, так и *in vivo*. Последнее хорошо согласуется с данными авторов, впервые описавших антиокислительные эффекты СМП [18, 22].

Принятым является рассмотрение ПОЛ как деструктивного процесса у обожженных [1, 18]. Отчасти данная точка зрения подтверждается нашими данными. Так, обнаружена сильная обратная коррелятивная связь ($r_s = -0,733$, $p < 0,05$) между содержанием первичных изопропанолрастворимых продуктов ПОЛ в плазме крови крыс, обожженных на фоне введения различных фракций СМП, и средней продолжительностью жизни мышей, погибших после ожога на фоне введения этих же фракций. На фоне введения СМП выявлена также прямая зависимость между содержанием первичных изопропанолрастворимых продуктов ПОЛ в селезенке крыс и летальностью мышей

на 7-е сутки после ожога ($\rho=0,6$; $p=0,05$). Вторичные гептанрастворимые продукты липопероксидации плазмы крови потенцируют спленомегалию у крыс, обожженных с предварительным введением СМП ($\rho=0,762$; $p<0,05$). При этом интересно отметить, что накопление СМП в динамике после ожога (см. рис. 2) развивается параллельно спленомегалии ($\rho=1,0$; $p=0,01$). Вместе с тем нами установлена прямая корреляция ($\rho=0,688$; $p<0,05$) между содержанием первичных гептанрастворимых продуктов ПОЛ в селезенке крыс и плотностью расположения ЯСК в этом органе при ожоге на фоне введения различных фракций СМП. В свою очередь последний показатель (данные не представлены) обратно коррелирует с летальностью мышей к 30-м суткам после ожога с предварительным введением СМП разных фракций ($\rho=-0,75$; $p<0,05$), что можно объяснить известной ролью селезенки в противомикробном иммунитете [16], снижение которого является важной причиной гибели обожженных в поздние сроки после травмы [29]. Взаимосвязь между объемом паренхимы селезенки и ПОЛ в этом органе была продемонстрирована и в других исследованиях, где на фоне облучения, приводящего к потере клеток селезенки [10], наблюдалось снижение радикальных продуктов ПОЛ в этом органе, выраженность которого возрастала с увеличением дозы облучения [15]. Исходя из изложенного, а также данных литературы о физиологическом значении ПОЛ [13—15], не представляется возможным однозначно трактовать антиокислительные свойства СМП как благоприятные при термических ожогах. В связи с этим следует отметить единство АОА и патогенных эффектов СМП как явлений, имеющих единую основу — наличие Лоури-хромогенных компонентов в структуре СМП. Угнетение ПОЛ под действием СМП *in vivo* в ряде случаев (по крайней мере снижение содержания гидроперекисей нейтральных липидов в селезенке) может быть отражением неблагоприятного воздействия СМП на организм.

Нерационален также и полный отказ от предположения об АОА СМП как благоприятном в условиях патологии феномене. Известно, что собственно токсическое действие присуще вторичным, в том числе карбонильным, продуктам ПОЛ [3, 13]. В этой связи следует отметить, что фракции 2 «норма», 3 «норма», 3 «ожог 12 ч», 3 «ожог 24 ч», 4 «норма» и 4 «ожог 12 ч» снижали содержание именно этой категории продуктов липопероксидации при ожоге (см. рис. 3). Вместе с тем антиокислительные свойства СМП не являются их оригинальной характеристикой среди других субстратов эндогенной интоксикации. Так, билирубин, роль которого в аутоинтоксикации при желтухе известна, тоже является антиоксидантом, что позволило предположить определенную адаптивно-протекторную роль гипербилирубинемии при заболеваниях печени [11].

ЛИТЕРАТУРА

1. Агаджанов М. И. Липидная пероксидация в патогенезе ожоговой болезни и влияние антиоксидантов на ее течение: Автореф. дис. ... д-ра биол. наук.— Ереван, 1979.
2. Ашмарин И. П. // Вопр. мед. химии.— 1984.— № 3.— С. 2—7.
3. Биденко М. В. // Биоантиокислители в регуляции

метаболизма в норме и патологии.— М., 1982.— С. 195—213.

4. Вальдман Б. М., Волчегорский И. А., Лифшиц Р. И. // Пат. физиол.— 1985.— № 2.— С. 36—40.
5. Вальдман Б. М., Волчегорский И. А., Лифшиц Р. И. // Там же.— № 6.— С. 39—42.
6. Волчегорский И. А. Нейротропное действие среднемолекулярных пептидов, выделенных из крови здоровых и обожженных собак: Дис. ... канд. мед. наук.— Челябинск, 1985.
7. Волчегорский И. А., Вальдман Б. М., Пузевский А. С., Лифшиц Р. И. // Пат. физиол.— 1989.— № 1.— С. 45—49.
8. Волчегорский И. А., Палимов А. Г., Яровинский Б. Г., Лифшиц Р. И. // Вопр. мед. химии.— 1989.— № 1.— С. 127—131.
9. Галактионов С. Г., Цейтлин В. М., Леонова В. И. и др. // Биоорг. химия.— 1984.— № 1.— С. 5—17.
10. Горизонтов П. Д., Белоусова О. И., Федотова М. И. Стресс и система крови.— М., 1983.
11. Дудник Л. Б., Майоре А. Я. // Биологические мембраны и патология клетки.— Рига, 1986.— С. 32—38.
12. Епанечников В. А., Цветков А. А. Справочник по прикладным программам для микрокалькуляторов.— М., 1988.
13. Журавлев А. И. // Биоантиокислители в регуляции метаболизма в норме и патологии.— М., 1982.— С. 3—36.
14. Каган В. Е., Орлов О. Н., Прилипка Л. Л. Проблема анализа эндогенных продуктов перекисного окисления липидов: Науч. обзор.— М., 1986.
15. Козлов Ю. П. Свободные радикалы и их роль в нормальных и патологических процессах.— М., 1973.
16. Макаров А. А., Гринев М. В., Сафаров С. Ю. и др. Биогемосорбция путем экстракорпорального подключения донорской селезенки: Науч. обзор.— М., 1987.
17. Маркелов И. М., Вихриев Б. С., Тушикова З. А., Кузнецова Л. А. // Вопр. мед. химии.— 1983.— № 3.— С. 105—108.
18. Осипович В. К., Тушикова З. А., Матвиенко А. В., Крайник И. В. // Там же.— 1988.— № 5.— С. 62—66.
19. Петрусевич Ю. М. // Биоантиокислители.— М., 1975.— С. 247—251.
20. Поляков И. В., Соколова Н. С. Практическое пособие по медицинской статистике.— Л., 1975.
21. Спектор Е. Б., Ананенко А. А., Политова Л. П. // Лаб. дело.— 1984.— № 1.— С. 26—28.
22. Тушикова З. А. // Вопр. мед. химии.— 1983.— № 3.— С. 108—111.
23. Шишкин С. С. // Там же.— 1982.— № 5.— С. 134—141.
24. Эберт Л. Я., Зурочка А. В., Чукичев А. В. // Лаб. дело.— 1989.— № 3.— С. 18—20.
25. Goa J. // Scand. J. clin. Lab. Invest.— 1953.— Vol. 5.— P. 218—222.
26. Jenzono J. W., Hogan S. L., Noyes C. M. et al. // Analyt. Biochem.— 1986.— Vol. 159.— P. 370—376.
27. LaBella F. S., Geiger J. D., Glavin G. B. // Peptides.— 1985.— Vol. 6.— P. 645—660.
28. Lowry O. H., Rosebrough N. J., Farr A. L., Randall R. J. // J. biol. Chem.— 1951.— Vol. 193.— P. 265—275.
29. Ninnemann J. L., Ozkan A. N. // Ann. plast. Surg.— 1985.— Vol. 14, N 2.— P. 155—157.

Поступила 20.11.89

IMPORTANCE OF ANTIOXIDANT PROPERTIES OF MIDDLE MASS PEPTIDES IN PATHOGENESIS OF THERMIC BURNS

I. A. Volchegorsky, [B. M. Valdman], N. A. Skobeleva, B. G. Yarovinsky, R. I. Tifshitz, A. V. Zurochka

Medical School, Chelyabinsk

Antioxidative activity of middle mass peptides (MMP), obtained from blood of dogs with burns and of intact animals, was studied. "Lowry-chromogenic" amino acids containing in the MMP structure were responsible for the antioxidative activity. At the same time, this property of MMP was related also to their pathogenicity. The peptides were able to regulate lipid peroxidation in rats with thermic burns. Regulating effects of MMP on lipid peroxidation in pathogenesis of burns are discussed.

Т. К. Люкова

ВЛИЯНИЕ ГЕМОСОРБЦИИ НА ФУНКЦИОНАЛЬНУЮ АКТИВНОСТЬ ЛЕЙКОЦИТОВ У БОЛЬНЫХ ПСОРИАЗОМ

НИИ физико-химической медицины Минздрава РСФСР, Москва

Метод экстракорпоральной гемосорбции находит широкое применение в современной клинике как один из подходов к лечению экзогенных отравлений, почечной и печеночной недостаточности, заболеваний с аутоиммунным компонентом (псориаз, бронхиальная астма) [2]. Клинический эффект гемосорбции пытаются связывать в основном с сорбцией из крови каких-то веществ, в той или иной мере имеющих отношение к патогенезу заболевания [1, 6].

Влияние же гемосорбции на показатели клеточного иммунитета и элиминационную функцию иммунной системы изучено недостаточно, хотя ее положительный эффект у больных с хроническими заболеваниями получен в основном при иммунозависимой патологии.

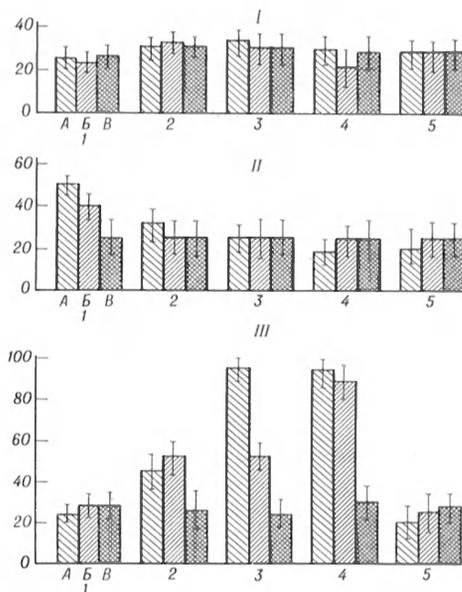
Целью настоящей работы явилось изучение влияния экстракорпоральной гемосорбции на функциональную активность лейкоцитов у больных псориазом с помощью оценки уровня секреции нейтрофилами катионных белков гранул: лактоферрина, лизоцима и ЛТАГ (лейкоцитарного термостабильного альфагликопротеида). Все эти факторы освобождаются из клеток при стимуляции, а также при их смерти [10], и измерение этих белков в плазме или сыворотке может быть показателем оборота нейтрофилов в организме или их активности.

Методика. Под наблюдением находилось 47 больных распространенным хроническим рецидивирующим псориазом в возрасте от 20 до 60 лет (37 мужчин и 10 женщин). По степени поражения кожного покрова и по клиническим особенностям псориазического процесса больные представляли неоднородную группу. У 12 больных была доброкачественная форма в виде распространенного псориаза прогрессирующей стадии, у 35 больных — тяжелое течение, из них у двоих диагностирована псориазическая эритродермия, у троих — псориазический полиартрит.

Гемосорбцию проводили по описанной ранее методике [3]. Кровь у больных брали до гемоперфузии, сразу после и в постсорбционном периоде через 3 и 24 ч, а также через 7 сут. Гепаринизированную кровь инкубировали в стеклянных флаконах при 37 °С, периодически осторожно перемешивая. Образцы плазмы и гемолизата анализировали на содержание лактоферрина, лизоцима и ЛТАГ до инкубации и через 24 ч после инкубации. Клетки отделяли центрифугированием при 150 g 15 мин. Гемолизат получали однократным замораживанием — оттаиванием форменных элементов крови. Определение индивидуальных белков осуществляли методом двойной иммунодиффузии со стандартными моноспецифическими тест-системами с чувствительностью 1 мг/л [9]. Получение моноспецифических антисывороток к ЛТАГ и лактоферрину описано ранее [7]. Для определения лизоцима использовали стандартную антисыворотку фирмы «Berhingwerke» (Австрия). Долю мертвых клеток определяли путем окрашивания их 0,2 % раствором трипанового синего.

Количество секретируемого белка, рассчитанное следующим образом: количество протеина в плазме · 100 % / (количество протеина в гемолизате + количество протеина в плазме) выражали в %.

Результаты и обсуждение. По влиянию гемоперфузии через угольные сорбенты СКН и



Экстрацеллюлярное выделение ЛТАГ (А), лактоферрина (Б) и лизоцима (В) после 24 ч инкубации крови больных псориазом до и после гемосорбции.

По оси ординат — количество секретируемого белка, в % от общего содержания. 1 — до гемосорбции, 2 — после гемосорбции, 3 — через 3 ч, 4 — через 24 ч, 5 — через 7 сут после гемосорбции.

ИГИ на способность к секреции катионных белков лейкоцитами больных можно разделить на 3 группы. На секреторную активность лейкоцитов 1-й группы больных (19 человек) гемосорбция не оказывала влияния (см. рисунок, I).

При инкубации проб крови до и после гемосорбции в течение 24 ч уровень секреции ЛТАГ, лактоферрина и лизоцима мало изменяется. Через 3 ч после гемосорбции происходит лишь небольшое достоверное увеличение уровня секреции ЛТАГ, который через 24 ч после гемосорбции снижается до исходного. У 2-й группы больных (9 человек) секреторная активность лейкоцитов снижается сразу после гемосорбции: на 20 % ЛТАГ, на 15 % лактоферрин. Уровень секреции лизоцима не меняется (см. рисунок, II). И у 3-й группы больных (19 человек) уровень секреции лейкоцитами ЛТАГ и лактоферрина увеличивается: сразу после гемосорбции — на 22 и 25 %, через 3 ч — на 68 и 25 %, через 24 ч — на 68 и 75 % соответственно (см. рисунок, III).

В течение всего времени инкубации (24 ч) количество окрашиваемых трипановым синим лейкоцитов не возрастало и составляло 2—4 %. Таким образом, вклад погибших клеток в уровень секретируемых белков во время инкубации минимальный.

При сопоставлении влияния гемоперфузии на функциональную активность лейкоцитов с ближайшими клиническими результатами после проведения гемосорбционной терапии выяснилось, что в 3-й группе больных уже на 1—2-е сутки отмечалось стойкое побледнение и уплощение псориазических эфлоресценций, прекращалось появление свежих папулезных высыпаний, наступало заметное рассасывание инфильтрата с исчезновением эритемы. У больных 1-й группы лишь у 10 % наблюдались подобные изменения, у остальных же не отмечалось ни положительного, ни отрицательного воздействия.

Ухудшение состояния с усилением припухлости бляшек наблюдалось у 80 % больных 2-й группы.

В результате проведенного исследования способности лейкоцитов периферической крови больных псориазом к секреторной активности при инкубации до и после гемоперфузии обнаружилось изменение функциональной активности лейкоцитов. Причем в группе больных, у которых после гемосорбции наблюдается усиление способности лейкоцитов к секреции, происходит побледнение и уплощение всех псориазических проявлений с последующим рассасыванием инфильтратов. Это увеличение уровня секреции можно было бы связать с увеличением числа лейкоцитов сразу после гемосорбции с 4000—6000 до 6000—8000, через 3 ч — максимум до 9000 и через 24 ч — максимум до 10 000 лейкоцитов. Очевидно, это играет какую-то роль, но уровень секреции ЛТАГ и лактоферрина при инкубации выше исходного в 4 раза, а число лейкоцитов увеличивается максимально всего лишь в 2 раза. Эти данные указывают, что в этом случае имеет место изменение функциональной активности нейтрофильных гранулоцитов после проведенной гемосорбционной терапии либо в связи с изменением состава плазмы, либо после контакта клеток с сорбентом, что, возможно, вызывает значительные структурные изменения поверхности. Если принять во внимание, что дегрануляцию нейтрофилов принято считать мембранозависимым процессом [8] и что избыточное накопление в мембране тех или иных веществ, экранирующих гликокаликс, может и не зависеть от концентрации этих веществ в крови, а возникать из-за патологического состояния самой клетки [4] (такая возможность описана для клеток у больных псориазом [5]), то обнаруженный нами феномен усиления секреторной активности нейтрофилов у больных псориазом после гемосорбции можно объяснить активацией поверхностных структур нейтрофильных гранулоцитов и их повышенной чувствительностью к среде инкубации.

В заключение следует сказать, что из трех белков, которые определяли в этой работе, только у лизоцима не было обнаружено достоверных различий в уровне секреции до и после гемоперфузии. Это можно объяснить, по-видимому, тем, что в плазму он поступает в основном из моноцитов и макрофагов [11], функциональная активность которых, очевидно, мало меняется при контакте с гемосорбентом.

ЛИТЕРАТУРА

1. Короткий Н. Г., Петрунин Д. Д. // Вестн. дерматол.— 1983.— № 6.— С. 11—13.
2. Лопаткин Н. А., Лопухин Ю. М. Эфферентные методы в медицине.— М., 1989.
3. Лопухин Ю. М., Молоденков М. Н., Евсеев Н. Г. // Вестн. дерматол.— 1980.— № 1.— С. 8—12.
4. Лопухин Ю. М., Арчаков А. И., Владимиров Ю. А., Коган Э. М. Холестериноз.— М., 1983.
5. Олисова М. О., Лашманова А. П., Акимов В. Г. // Вестн. дерматол.— 1985.— № 10.— С. 17—21.
6. Петрунин Д. Д., Молоденков М. Н., Олефиренко Г. А. // Вопр. мед. химии.— 1982.— № 6.— С. 33—37.
7. Петрунин Д. Д., Лопухин Ю. М., Молоденков М. Н. и др. // Иммунология.— 1983.— № 4.— С. 68—71.
8. Пигаревский В. Е. // Арх. пат.— 1982.— № 5.— С. 3—12.
9. Храмова Н. И., Абедев Г. И. // Бюл. экспер. биол.— 1961.— № 12.— С. 107—111.
10. Шевченко О. П., Меркулов А. Г., Белецкая Л. В., Корн М. Я. // Лаб. дело.— 1989.— № 9.— С. 10—13.
11. Kokoshis P. L., Di Lizio N. R. // J. Reticuloendoth. Soc.— 1979.— Vol. 25.— P. 85—99.

Поступила 05.02.90

EFFECT OF HEMOSORPTION ON LEUKOCYTES FUNCTIONAL ACTIVITY IN PATIENTS WITH PSORIASIS

T. K. Lyukova

Institute of Physico-Chemical Medicine, Ministry of Public Health of the RSFSR, Moscow.

During treatment of patients with psoriasis using hemosorption procedure functional activity of neutrophilic granulocytes was altered in peripheric blood which affected distinctly the disease development.

© Л. И. НАДОЛЬНИК, В. В. ВИНОГРАДОВ, 1991

УДК 616.453-089.87-07:616.154:577.175.532]-092.9

Л. И. Надольник, В. В. Виноградов

СВЯЗЫВАЮЩАЯ СПОСОБНОСТЬ ТРАНСКОРТИНА КРЫС ПОСЛЕ АДРЕНАЛЭКТОМИИ

Институт биохимии АН БССР, Гродно

В литературе активно обсуждается вопрос об участии кортикостероидов в регуляции связывающей способности транскортина (ССТ) и его биосинтеза [9, 15] наряду с другими гормонами, в частности эстрогенами, андрогенами, тироксином.

Установлено снижение связывающей емкости белка при состояниях, характеризующихся гипокортицизмом, в частности у больных с хронической надпочечниковой недостаточностью [1], у животных после гипофизэктомии [3]. Однако двусторонняя адреналэктомия вызывает повышение ССТ [13, 16]. Вместе с тем введение высоких доз кортизола приводит к снижению связывающей емкости транскортина [11].

В связи с этим нас интересовал вопрос об активности кортикостероидсвязывающего глобулина при состояниях выраженного гипокортицизма. С этой целью мы определили основные параметры комплексообразования белка, а также биосинтез его срезами печени *in vitro* в течение 7 сут после двусторонней адреналэктомии.

Методика. Опыты проведены на белых беспородных крысах (самки) массой 140—160 г. Двустороннюю адреналэктомию осуществляли под гексеналовым наркозом. Животных забивали декапитацией через 6, 12 ч, 1, 2, 3, 4, 5 и 7 сут после операции. Кровь собирали в гепаринизированные пробирки.

В плазме крови определяли содержание кортикостерона методом высокоэффективной жидкостной хроматографии на жидкостном микроколоночном хроматографе «Милихром». Экстракцию глюкокортикоидов проводили общепринятым методом [2]. В качестве подвижной фазы использовали хлороформ — метанол 98,75:1,25. Разделение стероидов осуществляли на колонке 64×2 мм с Silasorb-600 (LC) (ЧСФР). Используемые в работе реактивы были очищены и дважды перегнаны [2].

Параметры связывания транскортина определяли по методу J. Baxter и соавт. [5] до и после удаления эндогенных гормонов в 0,005 М трис-буфере с 10 мМ дитиотрейтолом. Эндогенные стероиды удаляли обработкой плазмы при 37 °С в течение 45 мин 10 % углем Norit А, покрытым декстрином. Плазму инкубировали с ³H-кортизолом в присут-

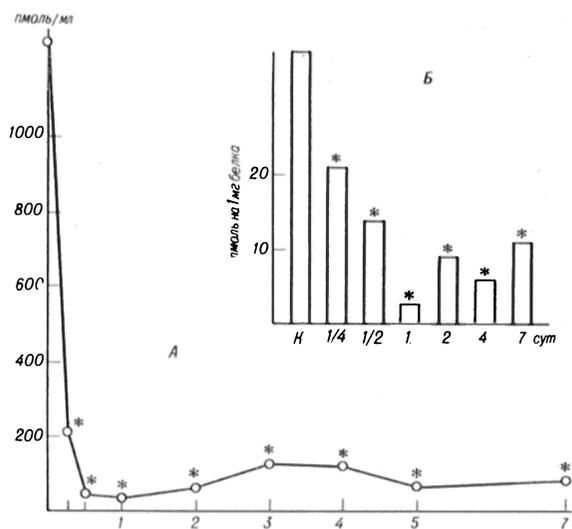


Рис. 1. Концентрация кортикостерона (А) и белково-связанного гормона (Б) в плазме крови крыс после адrenaлэктомии.

Здесь и на рис. 2—4 — звездочка — достоверные различия между показателями контрольных и подопытных животных. По оси абсцисс — срок исследования, сут.

ствии различных количеств холодного гормона (0,5—40 нг). Несвязанный стероид разделяли твердофазной адсорбцией на угле, покрытом дистраном. Аликвоты надосадочной жидкости вносили в сцинтилляционные флаконы. Расчет констант ассоциации (K_d) и количества связывающих мест на белке проводили в координатах Скетчарда [14]. Радиоактивность образцов измеряли в диоксановом сцинтиллаторе на жидкостном сцинтилляционном спектрометре «Mark-11» («Nuclear Chicago», США) с эффективностью счета по тритию 29 %.

Концентрацию белка в плазме крови и цитозоле печени определяли по Лоури [12]. В цитозоле печени крыс оценивали активность тирозинаминотрансферазы (ТАТ) [7]. Исследование биосинтеза транскортина срезами печени *in vitro* осуществляли в лаборатории биологически активных веществ (зав. — канд. биол. наук К. И. Крауляис) Института биохимии Латвийской ССР.

Результаты и обсуждение. К 6-му часу после двусторонней адrenaлэктомии концентрация кортикостерона в плазме крови резко снижается (в 65 раз), уменьшаясь еще больше в последующие сутки опыта (в 20 раз; рис. 1). С этим согласуются данные по определению активности стероидиндуцируемого фермента ТАТ в печени крыс (рис. 2). Активность ТАТ несколько повышается в течение суток, что является, вероятно, следствием стероидогенной реакции организма на наркоз и оперативное вмешательство. Однако в дальнейшем (к 3-м суткам) активность фермента падает ниже контроля и сохраняется на этом уровне на протяжении всего эксперимента.

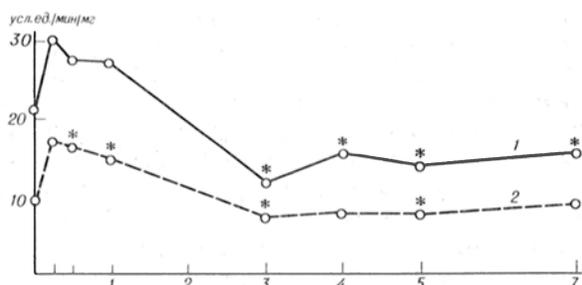


Рис. 2. Активность тирозинаминотрансферазы в печени крыс после адrenaлэктомии.

1 — усл. ед. · мин на 1 мг белка; 2 — усл. ед. · мин на 1 мг ткани.

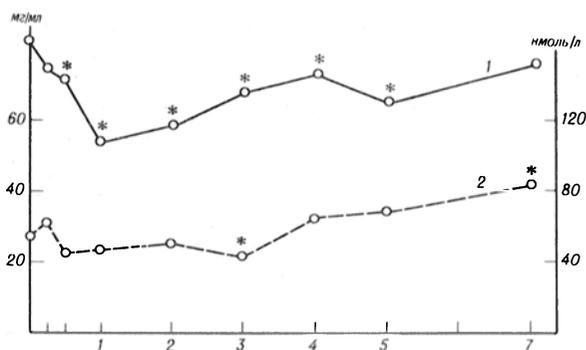


Рис. 3. Концентрация общего белка (1) и тироксина (2) в плазме крови.

На фоне отчетливо выраженного гипокортицизма в течение 12 ч после операции несколько увеличивается способность плазмы крови связывать эндогенный ^3H -кортизол (см. таблицу), что обусловлено значительным уменьшением концентрации белково-связанных гормонов в плазме крови. Однако общая связывающая емкость транскортина, определяемая после обработки плазмы крови углем, не изменяется в первые 12 ч после адrenaлэктомии, значительно снижаясь (2,5 раза) лишь к 1-м суткам опыта. Уменьшение концентрации мест связывания на белке обусловлено снижением уровня кортикостероид-связывающего глобулина в плазме крови [8]. Общее содержание белка в крови также достоверно снижается в течение 1-х суток и сохраняется на этом уровне на протяжении всего эксперимента (рис. 3). Концентрация общего белка в плазме крови уменьшается, вероятно, в результате резкого снижения уровня кортикостерона после адrenaлэктомии. Концентрация мест связывания на белке, рассчитанная в пмолях на 1 мл плазмы, также достоверно ниже к 1-м суткам после операции, что исключает ошибку, связанную со снижением общего уровня белка в плазме крови.

Однако уже ко 2-м суткам опыта ССТ возвращается к уровню контроля. Концентрация мест связывания на белке составляет $42,52 \pm 7,98$ и $50,64 \pm 11,02$ пмоль на 1 мг белка соответственно до и после обработки плазмы крови углем. K_d транскортина к глюкокортикоидам сохраняет постоянное значение ($0,5 \cdot 10^8 \text{ M}^{-1}$) на протяжении всего эксперимента, что предполагает активное связывание стероидов белком. В дальнейшем наблюдается постепенное повышение концентрации связывающих мест на белке на протяжении 7 сут опыта в 2,1—3,8 раза. Обработка плазмы крови углем несколько увеличивает число связывающих мест на белке, однако это увеличение недостоверно, что обусловлено низким уровнем связанных с белком кортикостероидов. Поскольку концентрация связывающих мест на белке определяется в первую очередь содержанием специфического белка в плазме крови, увеличение связывающей емкости белка может быть обусловлено изменением концентрации транскортина. В этих же условиях концентрация общего белка в крови снижена. Эти результаты согласуются с данными некоторых авторов [9] об ингибирующем действии кортикостероидов на

Параметры связывания кортизола плазмой крови крыс после адrenaлэктомии

Срок после адrenaлэктомии	Без обработки углем		После обработки углем	
	$K_d \cdot 10^8 \text{ M}^{-1}$	концентрация связывающих мест, пмоль на 1 мг белка	$K_d \cdot 10^8 \text{ M}^{-1}$	концентрация связывающих мест, пмоль на 1 мг белка
Контроль (n=10)	$0,51 \pm 0,05$	$25,04 \pm 2,60$	$0,45 \pm 0,05$ $p_1 > 0,2$	$52,81 \pm 4,61$ $p_1 < 0,001$
6 ч (n=6)	$0,66 \pm 0,13$ $p > 0,2$	$52,50 \pm 10,23$ $p < 0,02$	$0,61 \pm 0,16$ $p > 0,5$ $p_1 > 0,5$	$66,95 \pm 6,99$ $p > 0,1$ $p_1 > 0,2$
12 ч (n=6)	$0,57 \pm 0,07$ $p > 0,5$	$40,91 \pm 4,74$ $p = 0,01$	$0,56 \pm 0,07$ $p > 0,2$ $p_1 > 0,5$	$45,40 \pm 8,06$ $p > 0,2$ $p_1 > 0,5$
1 сут (n=6)	$0,65 \pm 0,05$ $p > 0,5$	$19,11 \pm 3,82$ $p > 0,2$	$0,64 \pm 0,05$ $p < 0,05$ $p_1 > 0,5$	$20,45 \pm 2,76$ $p < 0,001$ $p_1 > 0,5$
2 сут (n=6)	$0,54 \pm 0,33$ $p > 0,5$	$42,52 \pm 7,98$ $p > 0,05$	$0,57 \pm 0,08$ $p > 0,2$ $p_1 > 0,5$	$50,64 \pm 11,02$ $p > 0,5$ $p_1 > 0,5$
3 сут (n=6)	$0,50 \pm 0,04$ $p > 0,5$	$56,30 \pm 6,74$ $p < 0,001$	$0,42 \pm 0,05$ $p > 0,5$ $p_1 > 0,2$	$79,69 \pm 11,57$ $p = 0,05$ $p_1 = 0,1$
4 сут (n=6)	$0,44 \pm 0,05$ $p > 0,2$	$67,25 \pm 9,22$ $p < 0,001$	$0,50 \pm 0,07$ $p > 0,5$ $p_1 > 0,2$	$70,57 \pm 11,12$ $p > 0,1$ $p_1 > 0,5$
5 сут (n=6)	$0,60 \pm 0,05$ $p > 0,2$	$82,38 \pm 12,92$ $p < 0,001$	$0,57 \pm 0,06$ $p > 0,5$ $p_1 > 0,5$	$97,30 \pm 14,46$ $p < 0,001$ $p_1 > 0,2$
7 сут (n=6)	$0,62 \pm 0,12$ $p > 0,2$	$94,94 \pm 14,87$ $p < 0,001$	$0,62 \pm 0,16$ $p > 0,2$ $p_1 > 0,5$	$113,77 \pm 13,71$ $p < 0,001$ $p_1 > 0,2$

Примечание. p — различия достоверны между показателями плазмы крови контрольных и подопытных животных; p_1 — до и после экстракции эндогенных стероидов.

биосинтез транскортина в печени. Естественно, что в условиях гипокортицизма, после адrenaлэктомии, глюкокортикоиды не подавляют биосинтез транскортина, что приводит к значительному увеличению ССТ плазмы крови.

Однако при исследовании биосинтеза транскортина срезами печени *in vitro* (рис. 4) увеличение концентрации ^{14}C -иммунореактивного белка

в цитозоле печени адrenaлэктомированных крыс по сравнению с таковой у интактных животных не обнаружено, а общее включение ^{14}C -метки в белки печени было даже несколько снижено у подопытных животных.

Следовательно, столь значительное увеличение ССТ в плазме крови крыс после двусторонней адrenaлэктомии не является, вероятно, следствием активации биосинтеза специфического белка в печени, а возможно, связано с изменением катаболизма белка в организме в условиях гипокортицизма или активацией синтеза транскортина в других органах или тканях.

Вполне возможно, что кортикостероидное воздействие на биосинтез белка является опосредованным [11], и при удалении надпочечников это влияние вообще снимается, а повышение ССТ плазмы крови обусловлено другими факторами, в частности повышением концентрации тироксина. Имеются данные, согласно которым введение тироксина вызывает повышение ССТ [10] и концентрации белка [4] в плазме крови крыс. Аналогичное воздействие оказывают повышенные уровни эстрогенов [17], андрогенов. Необходимо отметить также способность кортикостероидсвязывающего глобулина к полимеризации [6], что может, вероятно, сопровождаться инактивацией ряда связывающих мест на молекуле белка. Деполимеризация транскортина в определенных условиях приведет, естественно, к увеличению концентрации связывающих мест на белке при неизменном уровне биосинтеза белка. По-видимому, возрастающая способность сыворотки крови при адrenaлэктомии связывать кортикостерон

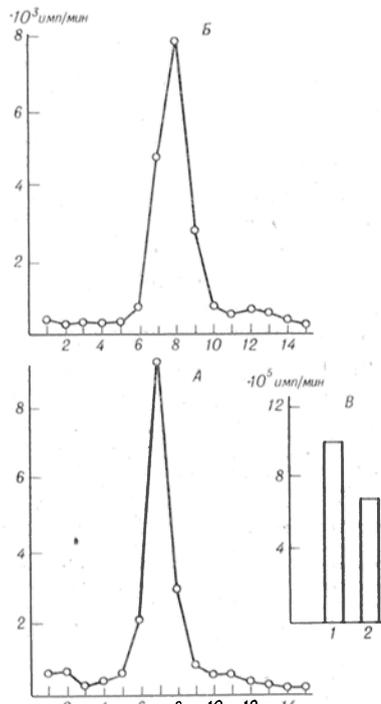


Рис. 4. Концентрация ^{14}C -иммунореактивного транскортина в цитозоле печени крыс.

А — контроль; Б — адrenaлэктомированные животные (5-е сутки); В — общее включение ^{14}C -метки в белки цитозоля печени *in vitro* (1 — контроль; 2 — адrenaлэктомия). По оси абсцисс — сегменты геля.

обеспечивает сохранение гормона в организме [16].

Авторы выражают благодарность сотрудникам лаборатории биологически активных веществ Института биохимии АН Латвийской ССР А. П. Дзянриусу и А. П. Улинскайте за помощь в исследовании биосинтеза транскортина срезами печени.

ЛИТЕРАТУРА

1. Бунятян А. Ф., Меньшиков В. В., Ляшко К. Я. // Пробл. эндокринологии. — 1971. — № 2. — С. 7—11.
2. Резников А. Г. Методы определения гормонов. — Киев, 1980.
3. Розен В. Б., Волчек А. Г., Строкова И. Г., Беленев Ю. П. // Пробл. эндокринологии. — 1973. — № 2. — С. 58—63.
4. D'Agostino J., Henning S. J. // Amer. J. Physiol. — 1982. — Vol. 242, N 1. — P. E33—E39.
5. Baxter J. D., Tomkins G. M. // Proc. nat. Acad. Sci. USA. — 1971. — Vol. 68. — P. 932—937.
6. Chader G. J., Westpahl U. // Biochemistry (Wash.). — 1968. — Vol. 7. — P. 4272—4282.
7. Diamondstone T. J. // Analyt. Biochem. — 1966. — Vol. 16. — P. 395—401.
8. Faict D. // AWZ⁸K, Klasseder Wetenschoppen, Jaargang. — 1986. — Bd 48, N 3. — S. 81—98.
9. Kawai Atsuo, Kuzuya Nobasada // Endocr. jap. — 1972. — Vol. 19, N 1. — P. 19—26.
10. Koch B., Lutz B., Schmitt G., Mialhe C. // Hormon. Metab. Res. — 1970. — Vol. 2, N 5. — P. 292—297.
11. Levin N., Akana S. F., Jacobson L. et al. // Endocrinology. — 1987. — Vol. 121, N 3. — P. 1104—1110.
12. Lowry O. H., Rosebrough N. J., Farr A. L., Randall R. J. // J. biol. Chem. — 1951. — Vol. 193. — P. 265—275.
13. Perrin F. M., Forest M. G. // Endocrinology. — 1975. — Vol. 96, N 4. — P. 869—878.
14. Scatchard G. // Ann. N. Y. Acad. Sci. — 1949. — Vol. 51. — P. 660—672.
15. Schlechte J. A., Hamilton D. // Clin. Endocr. — 1987. — Vol. 27, N 2. — P. 197—203.
16. Westphal U., Williams W., Carter Jr., Ashley B. D. // Proc. Soc. exp. Biol. (N. Y.). — 1962. — Vol. 108, N 4. — P. 926—929.
17. Wilson E. A., Finn A. E., Rayburn W., Jawad M. // Amer. J. Obstet. Gynec. — 1979. — Vol. 135, N 12. — P. 215—218.

Поступила 13.04.89

TRANSCORTIN BINDING CAPACITY IN RATS AFTER ADRENALECTOMY

L. I. Nadolnik, V. V. Vinogradov

Institute of Biochemistry, Academy of Sciences of the Byelorussian SSR, Grodno

High performance liquid chromatography was used to determine corticosterone concentration and transcortin binding capacity (TBC) in blood plasma of rats with bilateral adrenalectomy, before and after removal of endogenous hormones within 7 days (0,4, 0,2, 1, 2, 3, 4, 5, 7 days). During the first day TBC significantly decreased. However, concentration of protein binding sites subsequently elevated exceeding 2-fold the level of control values within the 7th day of the experiment. Concentration of ¹⁴C-immunoreactive transcortin in rat liver cytosol did not differ from control levels on the 5th day after the adrenalectomy. The adrenalectomy did not affect the transcortin affinity constant for corticosterone. These data suggest that the increased rate of blood plasma TBC was not related to activation of liver specific protein biosynthesis.

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 1991

УДК 615.31:546.41].015.23.03:616.127-005.4].015.4:616.154:577.175.859

В. М. Бровкович, И. И. Топчий, А. А. Абидов

ВЛИЯНИЕ АНТАГОНИСТА КАЛЬЦИЯ ДИЛТИАЗЕМА НА ПРОСТАЦИКЛИН-ТРОМБОКСАНОВОЕ СООТНОШЕНИЕ В ПЛАЗМЕ КРОВИ БОЛЬНЫХ ИБС

НИИ терапии Минздрава УССР, Харьков

Одним из важных факторов, оказывающих влияние на развитие и характер клинического течения ишемической болезни сердца (ИБС), является дисбаланс в системе простаглицлиин — тромбосан, определяющий агрегационную способность тромбоцитов и тонус коронарных артерий [9, 10]. Биосинтез тромбосана в тромбоцитах и простаглицлиидов в эндотелиальных клетках сосудов представляет собой Ca²⁺-зависимый процесс [1]. Известными модификаторами Ca-гомеостаза в клетках являются блокаторы Ca²⁺-каналов. Показано, что применение Ca²⁺-блокаторов при ишемии изменяет трансмембранные ионные токи миоцитов [3], уменьшает выход маркера ишемии креатинфосфокиназы в перфузат [6], улучшает коронарный и коллатеральный кровоток [11]. Однако изучению возможного влияния блокаторов кальциевых каналов на простаглицлиин-тромбосановое соотношение в крови при ишемии миокарда до настоящего времени посвящены лишь единичные исследования.

Целью данного исследования явилось изучение влияния плазменной концентрации антагониста кальция дилтиазема при однократном применении его таблетированной формы на динамику содержания простаглицлиина и тромбосана в плазме венозной крови больных ИБС.

Методика. Для исследования были отобраны 7 мужчин, больных ИБС со стенокардией напряжения и не имевших сопутствующих заболеваний печени и желудочно-кишечного тракта, могущих повлиять на процесс всасывания и фармакокинетику препарата (средний возраст больных 52±4 года). Дилтиазема гидрохлорид (препарат «Алдизем» фирмы «Алкалоид», Скопле, СФРЮ) назначали однократно внутрь в таблетках по 90 мг (1,5 таблетки). Кровь для исследования брали из локтевой вены натощак до приема препарата и через 1, 2, 3, 4 ч после приема дилтиазема. Плазму после выделения замораживали и при необходимости хранили при —20 °С.

Экстракцию дилтиазема осуществляли по методу, приведенному в работе [4]. Высокоэффективную жидкостную хроматографию (ВЭЖХ) проводили на хроматографе «Waters» (США) с УФ-детектором (254 нм), снабженным интегрирующим устройством CR-3A. Использовали колонки с нормальной фазой μ Bondapak CN (30×3,7 мм). Мобильная фаза была следующего состава: 0,01 М натрий-фосфатный буфер pH 5,0 — метанол — диэтиламин (55:45:0,5; v/v). Скорость элюции 1 мл/мин.

Содержание стабильного метаболита простаглицлиина — 6-кето-ПГЕ_{1α} и тромбосана A₂ — TxB₂ определяли радиоиммунологическим методом с помощью стандартных наборов Института изотопов Академии наук Венгрии.

Результаты и обсуждение. По данным литературы, ишемия миокарда приводит к иницированию цепи процессов: увеличению содержания внутриклеточного кальция [11], активации Ca-зависимых фосфолипаз [2], накоплению арахидоновой кислоты [11], активации синтеза и выхода

Динамика изменений уровня эндогенных простаноидов в плазме крови под влиянием дилтиазема

Время после приема дилтиазема	6-Кето-ПГЕ _{1α}	ТхВ ₂	6-Кето-ПГЕ _{1α} /ТхВ ₂
	нг/мл		
До приема	39,3±3,3	288,1±74,4	0,17±0,05
Через 1 ч	90,0±34,4*	181,1±40,1	0,57±0,13*
Через 2 ч	99,0±38,0*	93,0±14,4*	0,94±0,26*
Через 3 ч	51,8±16,2	106,4±31,0*	0,75±0,40*

* $p < 0,05$.

из клеток простагландинов и тромбоксана [10].

В результате проведенного исследования установлено, что у всех больных до лечения отмечалось значительное снижение уровней плазменного 6-кето-ПГЕ_{1α} (39,3±3,3 нг/мл) и увеличение содержания ТхВ₂ (288,1±74,4 нг/мл). Это привело к выраженному дисбалансу системы эндогенных простаноидов, проявляющемуся в низкой величине соотношения 6-кето-ПГЕ_{1α}/ТхВ₂ (0,17±0,5).

Однократный прием больными ИБС блокатора входящего тока кальция дилтиазема сопровождался быстрым увеличением содержания 6-кето-ПГЕ_{1α} в 2–3 раза, уменьшением уровня ТхВ₂ и вследствие этого — выраженным увеличением соотношения 6-кето-ПГЕ_{1α}/ТхВ₂ в плазме крови больных ИБС (см. таблицу). Увеличение концентрации простациклина имеет особо важное значение, так как, помимо антиагрегационных и вазодилататорных свойств, он, возможно, обладает антифибрилляторным [5] и прямым цитозащитным [12] свойствами. Общеизвестно, что увеличение соотношения простациклин/тромбоксан является благоприятным признаком для прогноза развития ИБС в процессе терапевтического вмешательства и означает стимуляцию дезагрегационных и вазодилатирующих эффектов, способствует увеличению коронарного кровотока [9].

Как следует из полученных данных, максимальное увеличение соотношения простациклин/тромбоксан наблюдается в плазме крови через 2 ч после приема пациентами дилтиазема. Для оценки временной связи между изменением соотношения простациклин/тромбоксан и содержанием дилтиазема в плазме крови мы определяли концентрацию данного антагониста кальция методом ВЭЖХ. Уже через 1 ч после приема внутрь препарат обнаруживался в плазме (см. рисунок). Через 2 ч его концентрация была максимальной и составляла около 4,5 мкг/мл, а через 3 ч несколько снижалась. Быстрое появление препарата в плазме свидетельствует, очевидно, о высокой степени всасывания его в желудочно-кишечном тракте. Пик концентрации препарата в плазме (через 2 ч после приема) совпадает с максимальным увеличением соотношения простациклин/тромбоксан, что позволяет предположить жесткую временную взаимосвязь.

Точный механизм, посредством которого антагонист кальция дилтиазем может влиять на со-

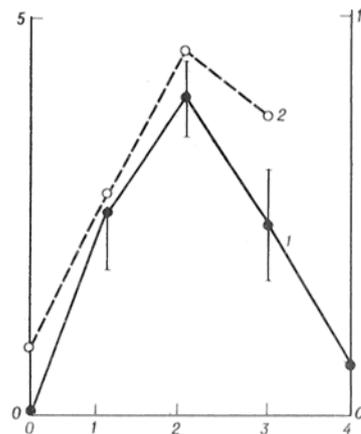


Рис. Концентрация дилтиазема (1) и соотношение 6-кето-ПГЕ_{1α}/ТхВ₂ (2) в плазме крови больных ИБС после однократного приема внутрь 90 мг дилтиазема.

По оси абсцисс — время после приема дилтиазема (в ч); по осям ординат: слева — концентрация дилтиазема (в мкг на 1 мл плазмы); справа — соотношение 6-кето-ПГЕ_{1α}/ТхВ₂.

держание тромбоксана в плазме крови, неизвестен. Имеющиеся данные свидетельствуют о большей чувствительности циклооксигеназы тромбоцитов, участвующей в синтезе преимущественно тромбоксана к лекарственным препаратам по сравнению с циклооксигеназой эндотелиальных клеток, синтезирующей в основном простаглицлин [8]. Возможно, что такую же различную чувствительность ключевые ферменты путей утилизации арахидоновой кислоты в тромбоцитах и эндотелиоцитах проявляют и к ионам кальция, вход которых в клетки блокируется дилтиаземом.

Ранее показано, что синтетический ингибитор тромбоксансинтетазы стимулирует выход простаглицлина из клеток стенок сосудов [7]. Эти факты, а также наши данные позволяют высказать предположение о том, что антагонист кальция дилтиазем разнонаправленно влияет на метаболизм арахидоновой кислоты в тромбоцитах и эндотелиальных клетках и увеличивает соотношение простаглицлин/тромбоксан.

ЛИТЕРАТУРА

- Ballou L. R., Cheung W. Y. // Calcium and Cell Physiol. — 1985. — P. 285–297.
- Chien K. R., Buja L. M., Willerson J. T. // Myocardial Ischemia and Lipid Metabol. — 1984. — P. 243–250.
- Daly M. J., Elz J. S., Nayler W. G. // J. molec. cell. Cardiol. — 1985. — Vol. 17. — P. 667–674.
- Downing S. J., Edwards D., Hollingsworth M. // Brit. J. Pharmacol. — 1987. — Vol. 91. — P. 735–745.
- Fiedler V. B., Mardin M. // Basic Res. Cardiol. — 1986. — Vol. 81. — P. 40–53.
- Fitzpatrick D. B., Karmazyn M. // J. Pharmacol. exp. Ther. — 1984. — Vol. 228. — P. 761–768.
- Kinney C. D., Kelly J. C. // J. Chromatogr. Biomed. appl. — 1986. — Vol. 382. — P. 377–381.
- Moncada S., Vane J. R. // New Engl. J. Med. — 1979. — Vol. 300. — P. 1142–1147.
- Moncada S., Higgs E. A., Vane J. R. // Advanc. Pharmacol. Ther. — 1982. — Vol. 6. — P. 39–47.
- Otani H., Engelman R. M., Ronson J. A. et al. // J. molec. cell. Cardiol. — 1986. — Vol. 18. — P. 953–961.
- Poole-Wilson P. A., Harding D., Bourdillon P., Fealwood G. F., // Protect. Tissues Against Hypoxia. — 1982. — P. 351–364.
- Schrör K., Darus H., Addick K. et al. // J. cardiovasc. Pharmacol. — 1982. — Vol. 4. — P. 741–748.

EFFECT OF CALCIUM ANTAGONIST DILTIAZEM ON THE PROSTACYCLINE/THROMBOXANE RATIO IN BLOOD PLASMA OF PATIENTS WITH ISCHEMIC HEART DISEASE

V. M. Brovkovich, I. I. Topchiy, A. A. Abidov

Institute of Therapy, Ministry of Public Health of the Ukrainian SSR, Kharkov

Content of prostacycline and thromboxane was studied in blood plasma of patients with ischemic heart disease after single administration of calcium antagonist diltiazem. The drug caused an increase in content of prostacycline and in the ratio prostacycline/thromboxane. Diltiazem appears to affect dissimilarly the arachidonic acid metabolism in platelets and endothelial cells that may be involved in the therapeutic effect of the drug under conditions of ischemic heart disease.

© Л. М. КАЛИНИНА, А. Б. ЧЕЩЕВИК, 1991

УДК 616.12-09.72-07:616.155.1-008.6:576.314

Л. М. Калинина, А. Б. Чещевик

ПРОНИЦАЕМОСТЬ МЕМБРАН ЭРИТРОЦИТОВ ДЛЯ МОНОВАЛЕНТНЫХ ИОНОВ У БОЛЬНЫХ СТАБИЛЬНОЙ СТЕНОКАРДИЕЙ

НИИ кардиологии Минздрава БССР, Минск

Одной из актуальных проблем медико-биологической науки является исследование роли структурно-функциональных нарушений клеточных мембран в патогенезе ишемической болезни сердца (ИБС). Современные исследования по данной проблеме указывают на изменение преимущественно в плазматических мембранах соотношения холестерина/фосфолипиды, вязкости липидного бислоя, активности электрогенных ионных насосов [1, 2, 4, 6, 9].

Учитывая значимость активного и пассивного транспорта ионов через эритроцитарную мембрану в развитии аномальных процессов тромбообразования и функционирования эритроцитов в целом, представлялось целесообразным изучить нарушения проницаемости эритроцитарных мембран для Na^+ и K^+ при ИБС.

Методика. Исследование пассивного транспорта Na^+ и K^+ через эритроцитарную мембрану проводили по методу С. Н. Орлова и И. Ю. Постнова [5] в нашей модификации. Забор крови осуществляли путем пункции локтевой вены. В качестве стабилизатора использовали гепарин в концентрации 50 ЕД/мл крови. Эритроциты осаждали центрифугированием при 1000 g в течение 15 мин и дважды промывали раствором холин-хлорида (160 ммоль/л). Отмытые эритроциты инкубировали в течение 1 ч в среде следующего состава: 159,5 ммоль/л холин-хлорида, 0,5 ммоль/л строфантина-К или оубаина («Serva», ФРГ). Для исследования скорости неингибированного оубаином транспорта Na^+ (в дальнейшем для простоты изложения обозначается как «активный транспорт») эритроциты помещали в среду, содержащую 2 ммоль/л KCl, 11 ммоль/л глюкозы, 1 ммоль/л $MgCl_2$, 5 ммоль/л трис-Cl, pH 7,45, 2 ммоль/л $CaCl_2$, 143,5 ммоль/л холин-хлорида.

После инкубации суспензию эритроцитов центрифугировали при 1000 g в течение 15 мин. В полученном надосадке определяли содержание ионов натрия и калия на пламенном фотометре. Скорость выхода ионов из эритроцитов выражали в ммоль/л эритроцитов в час.

Для изучения скорости транспорта моновалентных ионов через эритроцитарную мембрану в ряде исследований использовали в качестве ингибитора Na^+ , K^+ -АТФазы строфантин-К вместо оубаина. Был проведен сравнительный анализ процента ингибирования активного переноса Na^+ в среде со строфан-

Таблица 1

Скорость транспорта Na^+ и K^+ через мембрану эритроцитов у доноров и больных стабильной стенокардией I—III ФК, ммоль/л эритроцитов в 1 ч ($\bar{X} \pm Sx$)

Обследуемые группы	Na^+		K^+
	активный транспорт	пассивный транспорт	пассивный транспорт
Доноры	2,25±0,07 n=12	1,10±0,05 n=11	2,09±0,07 n=9
Больные I ФК	2,21±0,13 n=6	1,10±0,05 n=6	2,24±0,17 n=7
Больные II—III ФК	2,09±0,08 n=20	0,97±0,05* n=21	1,84±0,08* n=18

* $p < 0,05$.

тином-К и в среде с оубаином. Для этого в эритроцитах здоровых доноров измеряли скорость активного и пассивного транспорта (в последнем случае со строфантин-К или с оубаином). Процент ингибирования составил соответственно 58,1±3,1 (n=10) и 60,2±2,7 (n=18), $p > 0,05$.

Исследование транспорта ионов натрия и калия проводили у больных стабильной стенокардией I—III функциональных классов (ФК). Полученные данные оценивались по отношению к соответствующим показателям практически здоровых лиц. Статистическую обработку данных проводили методом вариационной статистики.

Результаты и обсуждение. В результате проведенных исследований установлено, что при стабильной стенокардии наблюдаются неоднозначные изменения процессов транспорта ионов натрия и калия через эритроцитарную мембрану. Так, достоверных различий скорости неингибированного гликозидами (активного) транспорта Na^+ из эритроцитов у больных стабильной стенокардией не наблюдалось. В то же время скорость пассивного транспорта Na^+ через эритроцитарную мембрану у больных II—III ФК в возрасте от 30 до 70 лет снижалась. Исключение составляли больные I ФК, у которых скорость пассивного транспорта ионов натрия не отличалась от скорости активного транспорта Na^+ в эритроцитах доноров. Аналогичные изменения отмечались и в транспорте K^+ через мембрану эритроцитов больных ИБС (табл. 1).

Следует отметить, что у лиц пожилого возраста (60—70 лет) нарушение скорости пассивного транспорта моновалентных ионов было более выраженным (табл. 2). При этом скорость активного транспорта Na^+ и K^+ не изменялась.

Таблица 2

Скорость транспорта Na^+ и K^+ через мембрану эритроцитов у больных стабильной стенокардией пожилого возраста, ммоль/л эритроцитов в 1 ч ($\bar{X} \pm Sx$)

Обследуемые группы	Возраст	Na^+		K^+
		активный транспорт	пассивный транспорт	пассивный транспорт
Доноры	30,7±1,4 n=12	2,18±0,07	1,12±0,05	2,10±0,06
Больные	43,0±2,9 n=8	2,27±0,17	1,12±0,06	2,29±0,17
Больные	64,9±1,3 n=8	2,12±0,15	0,86±0,03*	1,83±0,13*

* $p < 0,05$.

Выявленное снижение скорости пассивного транспорта Na^+ и K^+ через мембрану эритроцитов у больных стабильной стенокардией II—III ФК, по-видимому, обусловлено увеличением вязкости мембран у больных ИБС [1, 8], связанным с повышением уровня холестерина в составе мембран [2, 9]. Более значительное уменьшение пассивной проницаемости натрия и калия по мере увеличения возраста больных ИБС находится в соответствии с данными о возрастном увеличении содержания холестерина в составе мембран [3].

Показана связь между количеством холестерина в липидном бислое и проницаемостью ионов [7]. При этом проницаемость липосом и бислойных мембран снижалась по мере увеличения вязкости липидного бислоя [10].

Нарушение содержания холестерина в составе мембран эритроцитов является определяющим звеном и в изменении активности натриевого насоса [6].

Все вышеизложенное дает основание считать, что одним из основных механизмов, который приводит к нарушению функционирования мембран эритроцитов при ИБС, является изменение уровня холестерина в липидном бислое и связанное с ним изменение микровязкости [3]. В общем комплексе аномальных нарушений функционирования мембран при ИБС изменение пассивного транспорта моновалентных ионов влечет за собой изменение соотношения уровня экстра- и интрацеллюлярных ионов натрия и калия и, как следствие, изменение активности электрогенных ионных насосов и утилизации макроэргических соединений. Кроме того, возможно нарушение осмотического давления внутри клетки эритроцита, приводящее к снижению электрической стабильности мембран, к сдвигам реологических свойств крови и повреждению эритроцитарными агрегатами эндотелия сосудов.

Таким образом, нарушение пассивного транспорта через эритроцитарную мембрану следует рассматривать как существенное аномальное звено в цепи развития патологических процессов при ишемической болезни сердца.

ЛИТЕРАТУРА

1. Бородин Е. А., Добрецов Г. Е., Карасевич Е. И. и др. // Биохимия. — 1981. — Т. 46. — С. 1109—1118.
2. Горбатенкова Е. А., Азизова О. А., Дубровин П. Ю. и др. // Бюл. экспер. биол. — 1984. — № 2. — С. 149—152.
3. Клебанов Г. И., Шерстеев М. П. Гиперхолестеринемия в патогенезе атеросклероза. — М., 1983.
4. Люсов В. А., Разунов В. Б., Редниц Е. Г. // Кардиология. — 1986. — № 2. — С. 71—74.
5. Орлов С. П., Постнов И. Ю. // Там же. — 1981. — № 7. — С. 33—36.
6. Халимов Э. М., Лу В. С., Азизова О. А. и др. // Вопр. мед. химии. — 1982. — № 1. — С. 81—86.
7. Benz R., Fröhlich O., Langer P. // Biochim. biophys. Acta. — 1977. — Vol. 464. — P. 464—465.
8. Cooper R. A., Leslie M. N., Fischkoff S. et al. // Biochemistry (Wash.). — 1978. — Vol. 17, N 2. — P. 327—331.
9. Lytle M., Shinitzky M. // Chem. Phys. Lipids. — 1979. — Vol. 24, N 1. — P. 45—55.

PERMEABILITY OF ERYTHROCYTE MEMBRANES FOR MONOVALENT IONS IN PATIENTS WITH STABLE STENO-CARDIA

L. M. Kalinina, A. B. Cheschevick

Institute of Cardiology, Ministry of Public Health of the Byelorussian SSR, Minsk

Permeability of erythrocyte membrane for Na^+ and K^+ , insensitive to glycosides, was impaired in patients with stable stenocardia of the II-III degree, especially distinct in 60-70 years old persons. Possible relationship is discussed between impaired transport of monovalent ions and increase in cholesterol content in membranes as well as deterioration of energy-rich substances consumption and alterations in blood rheological properties.

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 1991

УДК 616.379-008.64-092-07:616.153.96-074

В. П. Федотов, А. В. Чернушкина, Л. Н. Щербачева, Л. М. Бартова, Н. Н. Кулагина, А. Я. Кульберг

УРОВЕНЬ R-БЕЛКОВ В КРОВИ ПРИ РАЗВИТИИ САХАРНОГО ДИАБЕТА

Всесоюзный эндокринологический научный центр АМН СССР, Москва, НИИ эпидемиологии и микробиологии им. П. Ф. Гамалеи АМН СССР, Москва

Проблема диабета и других эндокринных нарушений получила в последнее время новый импульс для своего развития в связи с углублением представлений о биохимии клеточных рецепторов.

Сравнительный анализ аминокислотных последовательностей эпимембранных фрагментов различных рецепторов показал, что все эти белки имеют несомненное сходство структурной организации [1, 4, 5].

Под влиянием протеолитических ферментов эпимембранные участки рецепторов, состоящие из более резистентных к гидролизу компактных доменов с мол. массой от 15 до 55 кД, могут поступать в кровоток, создавая в нем пул так называемых R-белков, разнообразных по своей специфичности, но обладающих сходными физико-химическими и иммунологическими свойствами [1, 3].

Важной особенностью R-белков (или солиubilизированных рецепторов) является сохранение у них способности подобно соответствующему рецептору эффективно связывать лиганд и конкурировать таким образом с мембранными рецепторами [2, 6].

Будучи естественными продуктами обмена клеточных рецепторов, R-белки содержатся в норме в биологических жидкостях, включая плазму крови. При различной патологии, связанной с деструкцией клеток (инфекционных заболеваний, острых нарушениях кровообращения и др.), их содержание в крови значительно возрастает [7, 9].

Учитывая существенные метаболические нарушения при сахарном диабете, влияющие, по-видимому, на катаболизм клеточных рецепторов, нами было проведено исследование R-белков у детей при сахарном диабете I типа в условиях дефицита инсулина, у их сибсов, квалифицированных как группа риска.

Методика. Обследованы 109 детей, из них 17 с впервые выявленным сахарным диабетом до лечения инсулином (1-я

Титр R-белков в крови больных сахарным диабетом и в группе риска

Группа обследуемых	Число обследованных детей	Титр R-белков					
		1:6400		1:12 800		1:25 600	
		абс.	%	абс.	%	абс.	%
Больные с впервые выявленным сахарным диабетом (1-я)	17	3	18	4	23	10	59
Больные с длительностью сахарного диабета от 1 года до 4 лет (2-я)	41	12	29	3	7	26	64
Группа риска	51	20	39	13	26	18	35

группа), 41 ребенок с длительностью диабета до 2 лет, находящийся на инсулинотерапии (2-я группа), 51 ребенок группы риска по сахарному диабету, у которого в анамнезе отмечена отягощенная наследственность по сахарному диабету 1 типа, нарушения глюкозотолерантного теста, транзиторная гипергликемия или глюкозурия. Возраст обследованных детей колебался от 3 до 15 лет.

Уровень R-белков в сыворотках больных определяли по степени ингибирования сыворотками реакции гемагглютинации (РГА) между эритроцитами человека и анти-R-сывороткой, полученной при иммунизации R-белками человека.

R-белки и анти-R-сыворотку получали описанным ранее методом.

Сыворотку прогревали при 56 °С в течение 30 мин и адсорбировали с помощью IgG человека, иммобилизованного на бромциансефарозе («Pharacia», Швеция). Обработанная указанным способом анти-R-сыворотка не содержала антител к IgG человека.

Результаты и обсуждение. Суммарные результаты представлены в табл. 1. Обследование здоровых детей различного пола показало, что титр R-белков 1:6400 можно рассматривать как верхнюю границу нормы. Эти результаты согласуются с данными литературы по определению титра R-белков у здоровых детей и доноров крови [8]. Повышенные титры R-белков наиболее часто выявлялись у детей с впервые выявленным диабетом, еще не подвергавшихся инсулинотерапии (1-я группа), а также у больных детей, получавших инъекции инсулина на протяжении 2 лет (2-я группа). В группе риска повышенный уровень этого показателя выявляли в 2 раза реже. Нормальный титр R-белков чаще всего обнаруживали у детей в группе риска и особенно редко при манифестации сахарного диабета 1 типа (1-я группа). Последнее обстоятельство, по-видимому, связано с

существенными метаболическими нарушениями, характерными для периода первых клинических проявлений этого заболевания.

Характерные закономерности были обнаружены при динамических исследованиях титра R-белков у детей с инсулинзависимым сахарным диабетом (табл. 2). Повторные обследования с интервалом 6 мес выявили две тенденции в изменении этого показателя. У 10 больных (см. табл. 2) наблюдалась нормализация или тенденция к нормализации титра R-белков. Интересно, что среди этих больных только двое относятся к группе с длительным течением заболевания (2-я группа). 6 больных 1-й группы при первичном обследовании имели высокий титр R-белков. После назначения адекватной инсулинотерапии исследуемым этот показатель у них снижался. Исключение составляли только 2 больных 1-й группы, титр R-белков у которых был нормальным как при первичном, так и при последующих обследованиях.

Повышение титра R-белков при динамическом обследовании было обнаружено у 6 больных, причем 5 из них относятся ко 2-й группе и лишь один ребенок — к 1-й группе (вновь выявленный диабет).

Таким образом, нормализация или снижение высокого титра R-белков характерны для больных со свежес выявленным диабетом 1 типа, что с большой степенью достоверности можно связать с компенсацией обменных нарушений в связи с назначением больным экзогенного инсулина. Повышенные титры R-белков у больных 2-й группы могут быть следствием длительности заболевания и развития декомпенсации.

Определенная закономерность проявляется при сопоставлении уровня инсулинемии (иммунореактивный инсулин определяли радиоиммунологическим методом) и концентрации R-белков в крови у детей, входящих в группу риска. Из табл. 3 видно, что при нормальном содержании инсулина повышенный титр R-белков был обнаружен лишь у 2 детей из 12, в то время как при наличии гиперинсулинемии отклонения этого показателя от нормы были выявлены у 1/3 обследованных.

Таблица 2

Динамическое исследование титра R-белков у детей, больных сахарным диабетом 1 типа (n=16)

Группа больных	Титр R-белков у детей			
	при первичном обследовании	через 6 мес	через 1 год	через 1,5 года
1-я	1:6 400	1:3 200	1:6 400	1:6 400
1-я	1:6 400	1:6 400	1:6 400	
1-я	1:25 600	1:3 200		
1-я	1:25 600	1:6 400		
1-я	1:102 400	1:6 400		
2-я	1:102 400	1:6 400		
1-я	1:25 600	1:25 600	1:12 800	
2-я	1:51 200	1:12 800		
1-я	1:51 200	1:25 600		
1-я	1:51 200	1:25 600		
2-я	1:6 400	1:3 200	1:51 200	
2-я	1:12 800	1:12 800	1:51 200	
1-я	1:12 800	1:51 200		
2-я	1:12 800	1:51 200		
2-я	1:25 600	1:102 400		
2-я	1:102 400	1:102 400		

Таблица 3

Титры R-белков в группе риска в зависимости от уровня инсулинемии

Уровень инсулинемии	Число обследованных	Титр R-белков			
		1:6 400—1:12 800		1:25 600	
		абс.	%	абс.	%
Нормоинсулинемия	12	10	83	2	17
Гиперинсулинемия	18	12	66	6	33

Резюмируя полученные результаты, можно констатировать, что развитие сахарного диабета I типа сопровождается существенным повышением в крови титра R-белков. В большом проценте случаев этот эффект наблюдается еще до проявления клинических симптомов заболевания, по нашим данным, у $1/3$ детей группы риска. Наиболее часто высокое содержание R-белков в крови имело место у больных с впервые выявленным диабетом, когда отмечаются существенные нарушения углеводного обмена и ряда других биохимических процессов. Нормализацию или снижение титра R-белков, которые мы наблюдали у этих больных, можно, по-видимому, прямо связать с наступившей компенсацией заболевания. В противоположность этому у детей, больных сахарным диабетом в течение длительного периода, несмотря на постоянные инъекции инсулина, чаще наблюдается повышение титра R-белков, что в свою очередь позволяет провести определенную корреляцию между титром R-белков и степенью декомпенсации диабета.

Подтверждением зависимости высокого титра R-белков от нарушения баланса обменных процессов является также более частое выявление отклонения от нормы этого показателя у детей группы риска с гиперинсулинемией, которую можно расценивать как вероятный предвестник манифестации сахарного диабета.

Высокий титр R-белков обнаруживается не у всех больных сахарным диабетом I типа, что может служить подтверждением существующего мнения о патогенетической гетерогенности данного заболевания.

Мы не можем утверждать, что увеличение содержания R-белков в крови обусловлено исключительно фрагментами рецепторов инсулина, хотя в условиях дефицита последнего, в силу так называемой цр-реакции, можно предполагать значительное увеличение числа рецепторов инсулина в периферических тканях и соответствующую интенсификацию их обмена. Кроме того, нарушения различных видов обмена, возникающие как при гипо-, так и при гиперинсулинемии, могут привести к аналогичным изменениям метаболизма рецепторов, реагирующих с другими лигандами.

В заключение следует отметить, что определение титра R-белков наряду с другими маркерами (например, появление аутоантител к различным антигенам В-клеток) может быть использовано для ранней диагностики сахарного диабета I типа и для контроля степени компенсации заболевания.

Авторы выражают благодарность А. М. Лобановой (ВЭНЦ АМН СССР, ст. научн. сотр. лаборатории биохимии патологии обмена веществ) за проведение определений иммунореактивного инсулина.

ЛИТЕРАТУРА

1. Кульберг А. Я. Молекулярная иммунология.— М., 1985.
2. Кульберг А. Я., Елистратова И. А. // Иммунология.— 1985.— № 3.— С. 10—12.
3. Кульберг А. Я. Рецепторы клеточных мембран.— М., 1987.
4. Кульберг А. Я. // Иммунология.— 1987.— № 2.— С. 13—17.

5. Кульберг А. Я. // Там же.— № 6.— С. 21—25.
6. Кульберг А. Я., Ивановска Н. Л., Тарханова И. А. // Там же.— № 1.— С. 25—26.
7. Кульберг А. Я., Бакуц Г. О., Габриелян М. С. и др. // Там же.— 1989.— № 1.— С. 66—69.
8. Михеева И. Г. Клинические и гормонально-метаболические особенности детей старшего года с синдромом увеличения вилочковой железы: Автореф. дис. ... канд. мед. наук.— М., 1989.
9. Яковлева Н. И., Бартова Л. М., Елистратова И. А. и др. // Иммунология.— 1986.— № 5.— С. 39—41.

Поступила 26.07.89

CONTENT OF R-PROTEINS IN BLOOD DURING DIABETES MELLITUS DEVELOPMENT

V. P. Fedotov, A. V. Chernushkina, I. N. Scherbacheva, L. M. Bartova, N. N. Kulagina, A. Ya. Kulberg

All-Union Endocrinological Research Centre, Institute of Epidemiology and Microbiology, Academy of Medical Sciences of the USSR, Moscow

R-proteins were studied in children with diabetes mellitus and in the risk group. The highest titre of the pattern was found in the children group where diabetes was the first to be detected. Normalization of the R-proteins high titre after insulinotherapy was more typical for patients with first detected diabetes as compared with children impaired by the disease within 1-2 years. Content of immunoreactive insulin and titre of R-proteins correlated in the risk group. Estimation of the R-proteins titre simultaneously with other markers may be used for early diagnosis of diabetes mellitus as well as in control of the disease compensation.

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 1991

УДК 616.366-002.1-092.9-07:616.153.1:577.152.1

Ж. III. Жумадилов, Р. II. Короткина, А. А. Карелин

ДИНАМИКА АКТИВНОСТИ ФЕРМЕНТОВ ОБМЕНА ГЛУТАТИОНА ПРИ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОМ ОСТРОМ ХОЛЕЦИСТИТЕ

Институт хирургии им. А. В. Вишневского АМН СССР, Москва

Глутатион выполняет в организме многообразные функции, в частности защитную, детоксицирующую, коферментную, транспортную [3—5, 9], из которых наиболее существенно является участие глутатиона в процессах детоксикации организма [4, 8, 9].

Особую практическую значимость приобретают исследования с целью разработки методов коррекции детоксикационной способности организма и улучшения результатов лечения у больных с хирургической инфекцией.

В настоящей работе была поставлена цель изучить особенности динамики активности ферментов обмена глутатиона при экспериментальном остром холецистите в зависимости от применяемого метода лечения и наличия гнойных осложнений. Такие данные в литературе отсутствуют.

Методика. Работа выполнена на 22 беспородных собаках массой 12—20 кг, у которых хирургическим путем моделировали деструктивный холецистит. С этой целью после введения премедикационного коктейля (дроперидол 0,5 мг/кг, димедрол 1,5 мг/кг, анальгин 50 мг/кг) под тиопенталовым наркозом (10 мг/кг) производили срединную лапаротомию, пунктировали желчный пузырь, отсасывали желчь, в просвет его вводили 7% раствор уксусной кис-

лоты из расчета 0,1 мл на 1 кг массы тела. Через 1—2 мин раствор уксусной кислоты отсасывали и в просвет желчного пузыря вводили 20 % каловую взвесь из расчета 0,7 мл на 1 кг массы животного. Критериями развития острого холецистита служило наличие соответствующих клинических симптомов, таких как вялость, повышение температуры тела, рвота, защитное напряжение мышц живота, отказ от пищи. Окончательное заключение о характере изменений в желчном пузыре делали на основании визуального исследования после реланаротомии. При использовании указанной методики моделирования у всех животных через 48 ч развивался деструктивный холецистит.

В зависимости от метода лечения животных разделили на две группы: контрольную и опытную. В контрольной группе (10 животных) через 48 ч после моделирования холецистита применяли традиционное консервативное лечение, включающее раствор канамицина (внутривенное введение 30 мг/кг в течение 5 дней), 20 % раствор глюкозы, спазмолитики, витамины В₁ и В₆, а также растворы Рингера и 0,9 % раствор хлористого натрия. В опытной группе (9 животных) проводили аналогичное лечение, но антибиотик включали в аутологичные эритроцитарные тени гипосмотическим методом, а затем тени вводили один раз в день внутривенно. Этим обеспечивали направленный транспорт антибиотика непосредственно в печень.

Эритроциты крови подвергали гемолизу и в гемолизате определяли активность глутатионредуктазы (ГР; КФ 1.6.4.2) по методу [6], глутатионпероксидазы (ГПО; КФ 1.11.1.9) по [10], глутатион-S-трансферазы (ГСТ; КФ 2.5.1.18) по [7]. В сыворотке крови собак определяли активность гепатоспецифических ферментов: урোকаниназы (КФ 4.2.1.49) по [2] и гистидазы (КФ 4.3.1.3) по [11]. Активность ГР и ГПО выражали в наномолях НАДФН₂ за 1 мин на 1 мг белка, ГСТ — в наномолях продукта ферментативной реакции (конъюгата глутатиона и хлординитробензола) в 1 мин на 1 мг белка.

Активность гепатоспецифических ферментов выражали в пикомолях образовавшейся (гистидазы) или распавшейся (уроканиназы) урোকаниновой кислоты в 1 с в расчете на 1 мг белка. Белок в гемолизате определяли биуретовым методом. Анализы выполняли до моделирования острого холецистита, после развития патологии, в процессе лечения (на 3-й день) и после завершения курса лечения.

Результаты и обсуждение. У собак с острым холециститом по мере нарастания клинических симптомов интоксикации отмечено выраженное в большей или меньшей степени снижение активности ферментов обмена глутатиона (рис. 1). После лечения показатели активности ферментов постепенно приближались к исходным, что сопровождалось улучшением общего состояния животных, нормализацией температуры тела, исчезновением симптомов интоксикации. Сопоставление эффективности различных методов лечения позволило установить, что при традиционной консервативной терапии у собак происходит достоверное снижение активности ГР и ГСТ, которое наблюдалось в процессе лечения (на 50 %, $p \leq 0,05$ и на 42 %, $p < 0,05$ соответственно). У собак опытной группы достоверного снижения активности ферментов обмена глутатиона в исследуемые сроки не выявлено. Это свидетельствовало о благоприятном влиянии разработанного метода лечения на ферменты обмена глутатиона в отличие от традиционной консервативной терапии.

Следует отметить, что в контрольной группе после завершения курса лечения у 4 собак найдены различные гнойно-воспалительные осложнения. В опытной группе осложнения обнаружены лишь у одной собаки.

У животных с гнойно-воспалительными осложнениями (околопузырный и подпеченочный абсцессы, нагноение послеоперационной раны, околопузырный инфильтрат) установлено более значительное, чем у животных без осложнений,

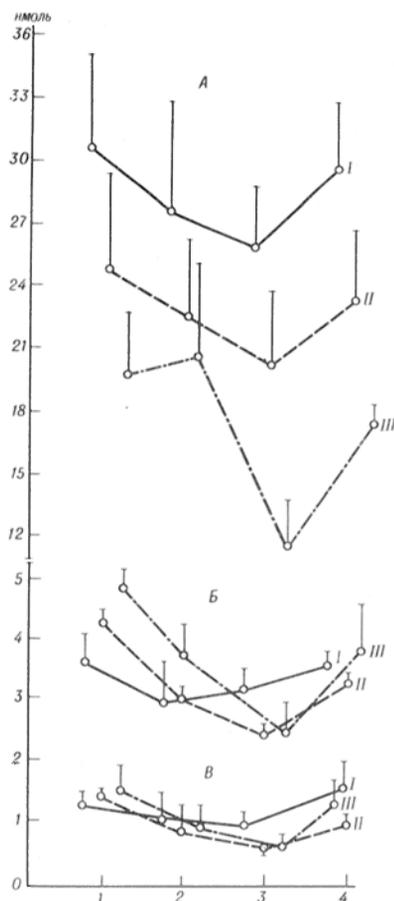


Рис. 1. Динамика активности ферментов обмена глутатиона при остром холецистите в зависимости от метода лечения и осложнений.

По оси абсцисс (здесь и на рис. 2): 1 — исходные показатели; 2 — после моделирования холецистита; 3 — в процессе лечения; 4 — после лечения; по оси ординат — активность ферментов, $\mu\text{моль}/\text{мин}/\text{мг}$. А — ГПО; Б — ГСТ; В — ГР. Здесь и на рис. 2: I — транспорт антибиотика в эритроцитарных телях; II — традиционная терапия; III — животные с осложнениями.

снижение активности ферментов. Так, в процессе лечения активность ГР, ГСТ, ГПО оставалась достоверно сниженной по сравнению с исходными показателями (на 54 %, $p < 0,05$; 47 %, $p < 0,05$ и 42 %, $p < 0,05$ соответственно). При этом после завершения курса лечения активность ферментов не достигала исходных показателей. Наблюдавшееся нами изменение активности ряда ферментов обмена глутатиона при экспериментальном остром холецистите настоятельно диктует необходимость изыскания специальных методов коррекции нарушений активности указанных ферментов у животных с данной патологией.

Активность гепатоспецифических ферментов в сыворотке крови животных возрастала в периоды после моделирования острого холецистита и в процессе лечения, что указывало на вымывание этих ферментов в кровь вследствие нарушения целостности мембран гепатоцитов (рис. 2). Изменение активности ферментов зависело от метода лечения. Так, у животных контрольной группы (традиционное лечение) активность гистидазы и урোকаниназы имела лишь тенденцию к нормализации в конце лечения, причем активность гистидазы после лечения была даже несколько выше исходной ($3,3 \pm 1,4$ и $2,9 \pm 1,1$ $\mu\text{моль}/\text{с}/\text{мг}$ соответственно). У животных опытной группы

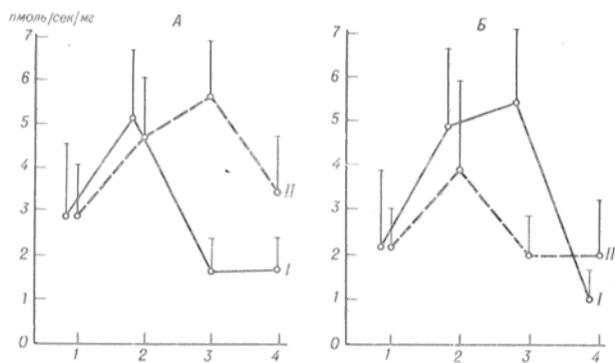


Рис. 2. Динамика активности гистадазы (А) и урокиназы (Б) сыворотки крови животных с острым холециститом в зависимости от метода лечения.

По оси ординат — активность ферментов, пмоль/с/мг.

активность гистадазы и урокиназы после лечения была существенно ниже исходных показателей ($1,7 \pm 0,6$ против $2,9 \pm 1,6$ и $1,0 \pm 0,7$ против $2,2 \pm 1,6$ пмоль/с/мг соответственно).

Результаты исследования гепатоспецифических ферментов у животных с острым холециститом свидетельствовали о стабилизации мембран гепатоцитов при использовании в комплексе лечения направленного транспорта антибиотика в аутологичных эритроцитарных телях.

Таким образом, при остром холецистите у животных по мере нарастания симптомов интоксикации наблюдается снижение активности ферментов обмена глутатиона. Эта закономерность особенно выражена у собак с гнойно-воспалительными осложнениями. Направленный транспорт антибиотика в печень в аутологичных эритроцитарных телях позволяет предупредить снижение активности ферментов обмена глутатиона, а также дестабилизацию мембран гепатоцитов. В этом заключается преимущество предлагаемого метода перед традиционным консервативным лечением. Изложенное позволяет рекомендовать разработанный метод лечения для внедрения в клиническую практику.

Лабораторные тесты с определением активности гепатоспецифических ферментов обмена глутатиона могут применяться для оценки эффективности лечения.

Авторы выражают благодарность профессору кафедры биохимии Университета дружбы народов им. Патриса Лумумбы Н. Н. Чернову за предоставление препарата глутатионредуктазы и научно-консультативную помощь.

ЛИТЕРАТУРА

1. Буробин В. А., Короткина Р. Н. // Некоторые новые методы диагностической энзимологии и клеточной регуляции в клинике. — М., 1982. — С. 21—25.
2. Буробин В. А., Короткина Р. Н. // Там же. — С. 26—28.
3. Петрович Ю. А., Гуткин Д. В. // Пат. физиол. — 1986. — № 5. — С. 85—92.
4. Тицнов Л. А., Иванова В. А. // Вестн. АМН СССР. — 1988. — № 1. — С. 62—69.
5. Чернов Н. Н., Березов Т. Т. // Там же. — 1987. — № 7. — С. 4—12.
6. Carlberg J., Mannervik B. // Meth. Enzymol. — 1985. — Vol. 113. — P. 484—490.

7. Jakoby W. B. // Ibid. — P. 499—501.
8. Jarvisato J. O. // Pharmacol. Toxicol. — 1987. — Vol. 60, N 3. — Suppl. — P. 11.
9. Meister A. // Hepatology. — 1984. — Vol. 4, N 4. — P. 739—742.
10. Wendel A. // Meth. Enzymol. — 1981. — Vol. 77. — P. 325—333.

Поступила 03.04.90

DYNAMICS OF THE ENZYMATIC ACTIVITY INVOLVED IN METABOLISM OF GLUTATHIONE IN EXPERIMENTAL ACUTE CHOLECYSTITIS

Zh. Sh. Zhumadilov, R. N. Korotkina, A. A. Karelin

A. V. Vishnevsky Institute of Surgery, Academy of Medical Sciences of the USSR, Moscow

Dynamics of glutathione-related enzymes activity was studied in erythrocytes of 22 dogs with destructive form of cholecystitis. As clinical symptoms of intoxication developed the enzymatic activity was decreased. In the animals with purulent-inflammatory complications distinct decrease was detected in activity of glutathione reductase (by 54.3%), glutathione-S-transferase — by 46.94% and glutathione peroxidase — by 42.1% ($P < 0.05$). These data suggest that specific methods should be chosen for correction of impairments in the enzymatic activity in order to improve the treatment course efficiency as well as for prophylaxis of complications. The procedure developed for cholecystitis treatment, which involved channelled transport of antibiotics by means of autologous erythrocyte ghosts, proved to be more effective as compared with routine methods as shown by evaluation of the animals clinical state as well as by dynamics of hepato-specific enzymes activity and the glutathione-related enzymes activity. This procedure may be used in clinical practice; the laboratory tests described may serve for evaluation of the treatment course efficiency.

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 1991

УДК 615.22.015.4:616.36-008.93:577.175.859

Т. И. Каган, Б. З. Симхович, И. Я. Калвиньш, Э. Я. Лукевиц

ИЗУЧЕНИЕ ВЛИЯНИЯ ИНГИБИТОРА КАРНИТИНЗАВИСИМОГО МЕТАБОЛИЗМА МИЛДРОНАТА НА ОКИСЛЕНИЕ ЖИРНЫХ КИСЛОТ МИТОХОНДРИИ ПЕЧЕНИ ИНТАКТНЫХ КРЫС

Институт органического синтеза АН Латвийской ССР, Рига

Новое антиишемическое средство 3-(2, 2, 2-триметилгидразиний)пропионат — милдронат — вызывает угнетение карнитинзависимого метаболизма жирных кислот [6, 7] вследствие ингибирования биосинтеза карнитина из γ -бутиробетайна [4, 10]. В результате этого эффекта милдронат оказывает кардиопротекторное и антиишемическое действие, предотвращая накопление детергентных метаболитов жирных кислот длиннопочечного ацил-КоА и ацилкарнитина [4, 6, 9, 10].

Однако влияние милдроната на другие этапы карнитинзависимого метаболизма жирных кислот (транспорт ацильных радикалов через внутреннюю мембрану митохондрий, их внутримитохондриальный метаболизм) исследовано мало. Кроме того, не изучено, каким образом ингибирование карнитинзависимого метаболизма от-

Влияние курсового введения милдроната (200 мг/кг 10 дней) на дыхание митохондрий печени интактных крыс ($M \pm m$)

Субстрат	Условия опыта	Скорость дыхания, паноатом O_2 за 1 мин на 1 мг белка			ДК
		V_2	V_3	V_4	
Октаноат натрия	Контроль	13,92±1,15	21,47±1,19	9,17±1,04	1,55±0,06
	Милдронат	10,9±0,88	30,71±2,35*	16,38±6,08	2,82±0,16*
L-пальмитоилкарнитин	Контроль	7,43±0,52	15,13±0,3	8,29±0,86	2,09±0,17
	Милдронат	5,16±0,56	13,98±1,46	8,31±0,41	2,8±0,86

Примечание. Звездочка — $p < 0,05$.

ражается на карнитиннезависимом окислении жирных кислот.

В настоящей работе с использованием полярографического метода было проведено сравнительное изучение влияния милдроната на окисление октаноата натрия и L-пальмитоилкарнитина митохондриями печени интактных крыс.

Методика. Опыты проводили на 40 белых крысах-самцах массой 180–200 г, полученных из питомника института. Животные содержались на стандартном рационе вивария.

Водный раствор милдроната вводили перорально однократно или в виде курса. Через 2 ч после последнего введения милдроната крыс декапитировали, извлекали печень, промывали холодной средой выделения, состоящей из 0,3 М сахарозы, 1 мМ ЭДТА и 10 мМ трис-НСI pH 7,4. Митохондрии выделяли по общепринятой методике [1].

Дыхание митохондрий изучали с помощью полярографического метода при 30 °С с применением электрода Кларка. При использовании в качестве субстрата окисления октаноата натрия (0,3 мМ) среда инкубации содержала 0,2 М сахарозы, 10 мМ KH_2PO_4 , 10 мМ $MgCl_2$ 15 мМ KCl pH 7,4. Окисление L-пальмитоилкарнитина (0,7 мМ) изучали в среде следующего состава: 0,25 М сахарозы, 10 мМ трис-НСI, 1 мМ ЭДТА pH 7,4. Акцентором фосфата служил АДФ (300 мМ) [3]. Скорости дыхания в активном метаболическом состоянии при фосфорилировании АДФ (V_3), в состоянии «покоя» (V_2) и по окончании фосфорилирования (V_4) рассчитывали в паноатомах O_2 за 1 мин на 1 мг белка.

Вычисляли дыхательный контроль (ДК) по Ларди-Велману (отношение V_3/V_2). Концентрацию митохондриального белка определяли при помощи микробиуретового метода [2]. Результаты обрабатывали статистически с использованием t -критерия Стьюдента.

Результаты и обсуждение. Курсовое введение милдроната (200 мг/кг 10 дней) вызывает усиление окисления октаноата натрия в митохондриях печени крыс. Об этом свидетельствует статистически значимое увеличение скорости дыхания в активном состоянии на 43 % и ДК на 82 %. Окисление L-пальмитоилкарнитина митохондриями печени крыс при введении милдроната не меняется (табл. 1).

Известно, что среднецепочечные жирные кислоты, в том числе октановая, способны проникать через внутреннюю мембрану митохондрий

без участия карнитина [7] и активироваться с образованием среднецепочечного ацил-КоА непосредственно в митохондриальном матриксе [8].

Усиление дыхательной активности митохондрий печени крыс под влиянием милдроната при использовании в качестве субстрата окисления октаноата может свидетельствовать об активации карнитиннезависимого окисления жирных кислот.

Следует подчеркнуть, что для развития отмеченного эффекта необходимо курсовое введение препарата, так как после его однократного введения (200 мг/кг за 2 ч до забоя) дыхательная активность митохондрий не меняется (табл. 2).

Было показано, что для развития ингибирующего действия милдроната на биосинтез карнитина и ингибирования карнитиннезависимого окисления жирных кислот необходимо его курсовое введение [5–7, 10]. Наши эксперименты свидетельствуют о том, что угнетению карнитиннезависимого окисления жирных кислот под влиянием милдроната сопутствует стимуляция их карнитиннезависимого метаболизма.

Усиление карнитиннезависимого окисления жирных кислот в печени крыс можно рассматривать как адаптационно-компенсаторный путь сохранения энергетического метаболизма органа в условиях, когда карнитиннезависимый путь окисления жирных кислот блокирован.

Милдронат не влияет на окисление L-пальмитоилкарнитина. Это позволяет сделать вывод об отсутствии влияния препарата на транспорт длинноцепочечного ацилкарнитина через внутреннюю мембрану митохондрий. Эти же данные дают возможность предположить, что милдронат не влияет на процессы внутримитохондриального метаболизма ацилкарнитина.

Полученные результаты свидетельствуют о стимуляции под влиянием милдроната карнитиннезависимого окисления жирных кислот. Этот эффект в сочетании с ингибированием карнитиннезависимого метаболизма может служить основой для разработки патогенетически оправдан-

Таблица 2

Влияние однократного введения милдроната (200 мг/кг за 2 ч до забоя) на дыхание митохондрий печени интактных крыс ($M \pm m$)

Субстрат	Условия опыта	Скорость дыхания, паноатом O_2 за 1 мин на 1 мг белка			ДК
		V_2	V_3	V_4	
Октаноат натрия	Контроль	7,41±0,93	17,74±1,15	9,85±0,11	2,44±0,22
	Милдронат	8,64±0,23	15,97±1,61	9,61±1,39	2,16±0,08
L-пальмитоилкарнитин	Контроль	11,19±3,48	23,12±4,44	10,31±2,95	2,5±0,76
	Милдронат	7,02±1,4	15,32±2,62	10,15±3,15	2,16±0,08

ных способов селективной коррекции обмена липидов в условиях патологии.

ЛИТЕРАТУРА

1. Кондрашова М. П., Григоренко Е. В., Гузар И. Б. и др. // Биофизика.— 1981.— Т. 26, № 4.— С. 687.
2. Кочетов Г. А. Практическое руководство по энзимологии.— М., 1971.— С. 309.
3. Ротенберг Ю. С. // Бюл. exper. биол.— 1974.— № 7.— С. 65.
4. Симхович Б. З., Витольня Р. О., Стивария М. И. и др. // Кардиология.— 1987.— № 7.— С. 85.
5. Симхович Б. З., Мейрена Д. В., Шутенко Ж. В. // Вопр. мед. химии.— 1988.— № 5.— С. 30.
6. Шутенко Ж. В., Симхович Б. З., Мейрена Д. В. и др. // Изв. АН ЛатвССР.— 1987.— № 6.— С. 102.
7. Шутенко Ж. В. Автореф. дис. канд. биол. наук.— Тарту, 1988.— С. 5.
8. Bremer J. // Physiol. Rev.— 1983.— Vol. 63, N 9.— P. 1420.
9. Clarke P. R. H., Bieber L. L. // J. Biol. Chem.— 1981.— Vol. 256, N 19.— P. 9861.
10. Simkovich B. Z., Shutenko Zh. V., Meirena D. C. et al. // Biochem. Pharmacol.— 1988.— Vol. 37, N 2.— P. 195.

Поступила 25.10.89

EFFECT OF THE INHIBITOR OF CARNITINE-DEPENDENT METABOLISM OF MILDRONATE ON FATTY ACID OXIDATION IN LIVER MITOCHONDRIA OF INTACT RATS

T. I. Kagan, B. Z. Simkovich, I. J. Kalvins, E. J. Lukevics

Institute of Organic Synthesis, Academy of Sciences of the Latvian SSR, Riga

Effect of antiischemic drug mildronate 3-(2,2,2-trimethylhydrazinium) propionate on oxidation of sodium octanoate and L-palmitoyl carnitine was studied in liver mitochondria of intact rats using polarographic procedure. After 10 days of administration of mildronate at a dose of 200 mg/kg per os oxidation of sodium octanoate was stimulated in liver mitochondria while the rate of L-palmitoyl carnitine oxidation was unaltered. The data obtained suggest that mildronate stimulated the carnitine-independent fatty acid oxidation which appears to occur as a compensation for inhibition of the carnitine-dependent oxidation by the drug.

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 1991

УДК 616.853-092:612.858.761-092.9-07:616-018.1:576.311.347]-008.931:577.152.143

Д. И. Райгородская, А. Е. Медведев, В. З. Горкин, И. Б. Федотова, А. Ф. Семиохина

ИЗМЕНЕНИЕ КАТАЛИТИЧЕСКИХ СВОЙСТВ МИТОХОНДРИАЛЬНЫХ МОНООКСИДАЗ ПРИ АУДИОГЕННОЙ ЭПИЛЕПСИИ В ЭКСПЕРИМЕНТЕ

Институт биологической и медицинской химии АМН СССР, биологический факультет МГУ им. М. В. Ломоносова, Москва

Ранее в опытах с высокоочищенными препаратами флавиновых митохондриальных моноаминоксидаз (МАО; КФ 1.4.3.4) было установлено, что при частичном окислении тиоловых групп в молекулах этих ферментов происходит наряду с некоторым снижением каталитической активности качественное изменение (трансформация) их ферментативных свойств [1]. При этом изменяется субстратная специфичность МАО и чувствительность к действию ингибиторов: индуцируются свойства катализировать дезаминирование

субстратов медьсодержащих аминоксидаз (гистамин, путресцин, кадаверин) и даже азотистых соединений, вообще не принадлежащих к числу субстратов аминоксидаз [глюкозамин, гамма-аминомасляная кислота (ГАМК), лизин и др.], появляется чувствительность к ингибирующему действию не являющихся ингибиторами МАО реагентов на карбонильные группы и других соединений (изоиазид, гидросиламин, бета-аминопропионитрил). Процесс качественного изменения, или модифицирования, каталитических свойств МАО обычно обратим; его последствия могут быть устранены путем обработки ферментных препаратов восстановителями. Охарактеризованы важные особенности процесса модифицирования МАО: 1) необходимость наличия неалкилированных тиоловых групп вне каталитического центра; 2) функциональная полноценность активного центра (его блокирование необратимо действующими ингибиторами МАО полностью предотвращает возможность модифицирования); 3) неспецифический характер воздействия окислителей, инициирующих процесс модифицирования свойств МАО.

В сложных биологических системах (фрагменты митохондриальных мембран, тканевые гомогенаты, ткани целого организма) процесс модифицирования каталитических свойств МАО обычно сопровождается стимуляцией перекисного окисления липидов (ПОЛ) и, по-видимому, имеет важное патогенетическое значение [2, 8] при многих патологических состояниях. В таких ситуациях применение антиоксидантов предотвращало или даже устраняло модифицирование ферментативных свойств МАО и оказывало определенный терапевтический эффект [6].

В настоящее время убедительно доказано значительное усиление и важное патогенетическое значение процессов ПОЛ в центральной нервной системе при эпилепсии [4, 5], обоснована целесообразность использования при комплексной патогенетической терапии антиоксидантов, нормализующих ПОЛ [10].

По аналогии с другими патологическими состояниями [1] можно было предположить, что в очаге эпилептической активности в тканях головного мозга митохондриальные мембранно-связанные МАО будут претерпевать не только количественные, но и качественные изменения каталитических свойств. В настоящей работе была предпринята попытка проверить это предположение экспериментально. Такое исследование представляется важным, учитывая обратимость процесса качественного модифицирования каталитических свойств МАО, а также особенности субстратной и ингибиторной специфичности модифицированных МАО (свойства катализировать дезаминирование ГАМК, чувствительность к ингибирующему действию реагентов на карбонильные группы).

Методика. Опыты проводили на крысах-самцах линии Крушинского — Молодкиной (КМ) с наследственной аудиогенной эпилепсией, реагирующих на действие звукового раздражителя (110—120 дБ) одной или двумя волнами возбуждения [3]. Всего было использовано 102 крысы (масса тела 200—250 г, возраст 4—6 мес). Животных забивали: (1) в состоянии покоя (группа «П», 20 крысы); (2) на высоте судорожного припадка (группа «+4», 40 крысы)

интенсивностью в 4 усл. балла, для которого характерно каталитическое состояние животного с элементами асфиксии; (3) в момент припадка интенсивностью 2—2,5 балла (группа «+2», 6 крыс) после второй волны возбуждения. Контролем служили крысы линии Вистар (20 животных) и белоспальные белые крысы (16 животных). Контрольных и опытных животных декапитировали, как описано в методических рекомендациях Минздрава СССР (приложение к приказу № 755).

После декапитации у животных быстро извлекали головной мозг, сердце, печень и почки. Гомогенизацию, выделение митохондриальных фракций путем дифференциального центрифугирования 10 % гомогената, определение содержания белка проводили, как указано в предшествующих сообщениях [8].

Для определения скорости дезаминирования азотистых соединений использовали 2 независимых метода, позволяющих измерять как образование альдегидов (путем радиометрической процедуры), так и освобождение аммиака (путем микродиффузии с последующей пессеризацией). При радиометрических исследованиях [9] субстратами служили ^{14}C -серотонин креатининсульфат (субстрат МАО типа А), бензиламин-НСI (субстрат МАО типа Б), глюкозамин-НСI (субстрат модифицированных МАО). Все 3 субстрата были производства «Amersham» (Англия). Их удельная радиоактивность в пробах составляла соответственно 2,6, 5,5 и 5,0 Ки/моль. Инкубационные пробы (конечный объем 0,1 мл) содержали в 0,05 М фосфатном буфере pH 7,4 один из субстратов и 10—80 мкг белка митохондриальных фракций. При измерении кинетических констант K_m и V_{max} (при помощи графического метода Лайнуивера — Берка) величины концентраций серотонина или бензиламина в пробах варьировали от 0,015 до 0,12 мМ. Концентрация глюкозамина была 0,1 мМ. Пробы инкубировали в течение 30 мин при 37 °С в атмосфере воздуха. Для фиксации проб после окончания инкубации в них добавляли по 20 мкл 2 М лимонной (в опытах с серотонином), 0,5 М соляной (в опытах с бензиламином) или 0,4 М серной (в опытах с глюкозаминном) кислоты. За время инкубации отмечали линейность в процессе накопления продуктов дезаминирования, которые экстрагировали после завершения реакции 2 мл сцинтилляционной жидкости в течение 3 мин. В опытах с бензиламином или глюкозаминном в качестве субстратов использовали сцинтилляционную жидкость ЖС-106; в опытах с серотонином — смесь этилацетат: ЖС-106 (1:1). Полученные результаты выражали в усл. ед. на 1 мг белка за 1 мин. Единица активности соответствовала тому количеству фермента, которое катализировало образование продуктов дезаминирования, обеспечивающих превышение радиоактивности над фоном на 1000 имп за 1 мин. Число импульсов за 1 мин регистрировали при помощи автоматического счетчика «Mark-11» (США).

При измерении скорости дезаминирования глюкозамина («Sigma», США) или ГАМК («Calbiochem», США) конечная концентрация одного из субстратов в пробах (объем 1 мл, содержание белка 1,9—4,4 мг) составляла 10 мМ в 0,02 М фосфатном буфере pH 7,4. Условия инкубации, фиксации проб, определения содержания освобождаемого аммиака указаны ранее [8].

Результаты и обсуждение. Сравнитель-

ное исследование кинетики окислительного дезаминирования ^{14}C -серотонина и ^{14}C -бензиламина при их инкубации с митохондриальными фракциями различных органов крыс линии Вистар (контроль) и крыс линии КМ, находившихся в состоянии покоя (группа «П») или на высоте аудиогенного эпилептиформного припадка (группа «+4»), позволило обнаружить статистически достоверные ($p < 0,05$) отклонения от контроля у крыс линии КМ лишь в следующих объектах: головной мозг крыс группы «П» (снижение максимальной скорости дезаминирования серотонина на 64 %); головной мозг крыс группы «+4» (снижение максимальных скоростей дезаминирования серотонина и бензиламина на 65 и 52 % соответственно); печень крыс группы «+4» (снижение максимальной скорости дезаминирования серотонина на 80 %) (табл. 1). Поскольку в этих экспериментах были использованы весьма низкие концентрации аминов, полученные при измерениях скоростей дезаминирования серотонина и бензиламина, результаты позволяют судить о величинах активности МАО соответственно типов А и Б [1, 2].

Ранее было установлено [7], что активность МАО в митохондриальной фракции головного мозга крыс линии КМ на 67 % ниже, чем у беспородных крыс. Субстратом в этих экспериментах служил тирамин, который обычно подвергается дезаминированию при участии МАО типов А и Б [1]. Таким образом, наши данные о том, что активность МАО типа А в тканях головного мозга крыс линии КМ ниже, чем у крыс линии Вистар (на основе которой проводили селекцию на чувствительность к аудиогенным эпилептиформным припадкам), находятся в согласии с результатами исследований, проведенных в сопоставимых условиях другими авторами [7].

Факт резкого снижения активности МАО типов А и Б в тканях головного мозга крыс на высоте аудиогенного эпилептиформного припадка обнаружен нами впервые. Не было также описано резкого снижения (на 80 %) активности МАО типа А в печени крыс в момент аудиогенного эпилептиформного приступа.

Если предположить, что снижение активности митохондриальных МАО при эпилепсии обусловлено модифицированием каталитических свойств

Таблица 1

Кинетические параметры реакций окислительного дезаминирования серотонина (А) и бензиламина (Б) при их инкубации с митохондриальными фракциями органов крыс линий Вистар и КМ

Орган		Линия Вистар (контроль)		Линия КМ (группа «П»)		Линия КМ (группа «+4»)	
		K_m , мкМ	V_{max} , усл. ед.	K_m , мкМ	V_{max} , усл. ед.	K_m , мкМ	V_{max} , усл. ед.
Мозг	А	88,3±7,5	52,6±0,8	57,0±2,4	19,1±7,1*	74,0±12,0	18,0±6,2*
	Б	150±30,1	62,7±10,6	131±19,9	69,4±0,6	181±37,4	30,1±2,3*
Печень	А	122±17,6	276±8,2	126±10,8	278±4,6	118±29,5	56,7±5,2*
	Б	53,3±4,5	166±17,5	87,8±12,7	209±22,1	87,0±13,2	153±11,6
Сердце	А	156±25,0	66,7±13,5	225±18,9	35,9±9,2	158±12,2	52,8±2,9
	Б	25,3±4,4	0,96±0,1	15,9±3,4	1,17±0,1	23,3±4,3	1,05±0,06
Почки	А	125±4,9	6,17±0,20	101±5,0	4,29±0,20	136±7,4	5,18±0,9
	Б	25,0±3,1	5,5±0,65	41,0±9,3	3,4±1,3	42,3±5,7	2,65±0,2

* $p < 0,05$ относительно контроля.

МАО, то можно было ожидать появления или значительного повышения в исследуемых объектах скорости реакций дезаминации субстратов модифицированных МАО. Для проверки этого предположения мы обратились к исследованиям процессов дезаминации 2 важных азотистых соединений: во-первых, глюкозамина, дезаминация которого в системах с модифицированными МАО обычно происходит с особенно высокой скоростью [1], тогда как МАО, не претерпевшие качественного изменения, дезаминация глюкозамина не катализируют; и, во-вторых, ГАМК, свойства которой в регуляции функций центральной нервной системы как химического медиатора процессов торможения и соединения, привлекающего внимание исследователей в связи с проблемами изучения патогенеза и лечения эпилепсии [4, 5], хорошо известны.

По нашим данным (табл. 2), при инкубации с митохондриальной фракцией гомогената головного мозга крыс линии Вистар глюкозамина его дезаминация практически отсутствует (составляет примерно 1,2% от соответствующей величины, характеризующей процесс дезаминации серотонина в этом же объекте). В подобной системе с митохондриальной фракцией мозга крыс линии КМ скорость дезаминации глюкозы более чем в 2 раза превышала скорость этой реакции в пробах с соответствующей фракцией из мозга крыс линии Вистар. Такой же результат был получен в опытах с крысами группы «+2», которые реагировали на воздействие звука 2 волнами возбуждения с тормозной фазой между ними (припадки судорог характеризовались силой в 2 условных балла). У крыс группы «+4» имело место резкое (более чем в 14 раз) повышение скорости дезаминации глюкозамина при его инкубации с митохондриальной фракцией гомогената головного мозга. В этих опытах скорость дезаминации глюкозамина достигала почти 60% от величины, характеризующей скорость дезаминации серотонина в этом же объекте. Таким образом, в тканях головного мозга крыс, реагировавших интенсивным эпилептиформным припадком (силой в 4 условных балла) на звуковой раздражитель, были обнаружены изменения активности МАО, характерные для качественного модифицирования каталитической активности МАО [1]. Эти наблюдения были подтверждены независимым методом (измерением скорости дезаминации глюкозамина по освобождению аммиака), причем было одновременно установлено резкое (примерно в 5 раз) повышение скорости дезаминации ГАМК при инкубации с митохондриальной фракцией головного мозга крыс в момент интенсивного (4 балла) эпилептиформного аудиогенного приступа.

Таблица 2

Дезаминация ^{14}C -аминов (0,1 мМ) при инкубации с митохондриальными фракциями головного мозга крыс, усл. ед.

Группа крыс	Амин		
	серотонин	бензиламин	глюкозамин
Вистар (контроль)	889±23,6	172±30,6	10,5±0,9
КМ (группа «1»)	332±21,3	172±3,3	26,5±2,4
КМ (группа «+2»)	305±23,1	232±8,9	28,3±1,4
КМ (группа «+4»)	284±31,1	105±3,6	146±6,7

Полученные результаты согласуются с предположением о возможности качественного изменения каталитических свойств МАО при эпилепсии. В результате такого изменения свойств МАО индуцируется глюкозаминдезаминазная и, что особенно важно в связи с проблемой патогенеза эпилепсии, ГАМК-дезаминазная активность. В условиях такого патологического состояния, как экспериментальная аудиогенная эпилепсия, изменения свойств МАО характеризуются, следовательно, не просто снижением активности, но возникновением как бы новой, патологической системы [4], функционирование которой носит явно дезадаптивный характер (разрушение жизненно важных метаболитов) и может играть роль патогенного фактора для организма, выходя из-под контроля физиологических регуляторных систем.

ЛИТЕРАТУРА

1. Горкин В. З. Аминоксидазы и их значение в медицине.— М., 1981.
2. Горкин В. З. // Пат. физиол.— 1988.— № 2.— С. 89—92.
3. Крушинский Л. В. Формирование поведения животных в норме и при патологии.— М., 1960.
4. Крыжановский Г. И. // Пат. физиол.— 1987.— № 1.— С. 3—6.
5. Крыжановский Г. И. // Там же.— 1989.— № 5.— С. 75—84.
6. Мамадиев М., Жужамбердиев М., Горкин В. З. // Вопр. мед. химии.— 1983.— № 2.— С. 83—89.
7. Молочкина Е. М., Боровок Н. В. // Нейрохимия.— 1989.— Т. 8, № 2.— С. 311—312.
8. Овчинникова Л. П., Горкин В. З., Анохина И. П. // Вопр. мед. химии.— 1989.— № 2.— С. 124—128.
9. Пекель В. А., Аксенова Л. П., Боймурзаев М. И. // Лаб. дело.— 1987.— № 7.— С. 491—495.
10. Федотова И. Б., Семиохина А. Ф., Архипова Г. В. и др. // Журн. высш. нервн. деят.— 1988.— Т. 38.— № 2.— С. 374—377.

Поступила 09.02.90

ON THE ALTERATION OF CATALYTIC PROPERTIES OF MITOCHONDRIAL MONOAMINE OXIDASES IN EXPERIMENTAL AUDIOGENIC EPILEPSIA

D. I. Raigorodskaya, A. E. Medvedev, V. Z. Gorkin, I. B. Fedotova, A. F. Semiokhina

Institute of Biological and Medical Chemistry, Academy of Medical Sciences of the USSR, Department of Physiology of Higher Nervous Activity, Biological Faculty, M. V. Lomonosov State University, Moscow

Catalytic properties of mitochondrial monoamine oxidases (MAO) were studied in brain, heart, liver and kidney of rats of Krushinskii-Molodkina strain with inherited audiogenic epilepsy. In brain of these rats a 2.5-fold decrease of V_{\max} of serotonin (MAO-A substrate) deamination has been found. During audiogenic epileptiformic attack 2.5-5-fold decrease of V_{\max} of serotonin deamination in brain and liver and also decrease of benzylamine (MAO-B substrate) oxidation in brain were found. Simultaneously oxidation of glucosamine and gamma-aminobutyric acid was markedly increased (up to 5-fold and more) in brain. The data obtained showed that qualitative transformation occurred in catalytic properties of MAO which may be an important pathogenic factor in the development of epileptiformic attack.

Т. А. Москвитина, Е. М. Ганкина, А. В. Вальдман

ОБ ИЗБИРАТЕЛЬНОСТИ ТОРМОЖЕНИЯ МОНОАКСИДАЗЫ МОЗГА БЫКА БЕФОЛОМ И МОКЛОБЕМИДОМ

Институт биологической и медицинской химии АМН СССР, Институт фармакологии АМН СССР, Москва

Моноаминоксидаза (КФ 1.4.3.4) (МАО) — основной фермент катаболизма биогенных аминов. Нарушению обмена одного из субстратов МАО — серотонина — придают важное значение в возникновении депрессивных состояний [17, 20], а ингибиторы МАО применяют в качестве лекарственных средств при этих болезнях, причем ингибиторы, специфически тормозящие тип А МАО, являются более эффективными, чем ингибиторы МАО типа Б [24]. Поэтому поиск новых ингибиторов МАО типа А является актуальной практической задачей.

Тирамиидезаминазная активность МАО, по современным представлениям, присуща обоим типам фермента [21]. Во время лечения малоизбирательными ингибиторами-антидепрессантами происходит подавление этой активности. Вследствие этого прием пици, богатой тирамином, приводит к возникновению гипертензивного криза, так называемого «сырного синдрома». Существование этого явления явилось причиной недавней дискредитации ингибиторов МАО как лечебных средств [12]. Положение казалось бы безнадежным, если бы не данные о большей, чем предполагается бинарная классификация, гетерогенности этого фермента [13, 15, 18, 19]. Эти данные позволяют думать, что возможно нахождение специфических соединений, не затрагивающих дезаминирование тирамина. Такие соединения могли бы привести к выявлению иной, чем типы А и Б, гетерогенности фермента, подобно тому, как хлоргилин позволил обнаружить изоферменты МАО [21].

Сообщается об отсутствии эффекта «сырного синдрома» у одного из производных бензамида — моклобемида [11], поэтому можно было бы полагать, что соединения этого ряда могут не влиять на дезаминирование тирамина. Другое производное — бефол (р-хлор-N-(2-морфолинпропил)бензамид) — в эксперименте *in vivo* обнаружило сильный антидепрессивный эффект [6]. Цель настоящей работы — изучение избирательности действия бефола на активность митохондриальной МАО мозга быка и сравнение его со свойствами моклобемида, который при исследовании на ткани мозга крысы показал большую способность к торможению серотониндезаминазной активности, чем фенилэтиламиндезаминазной [4, 11].

Методика. В качестве источника фермента использовали фрагменты митохондриальных мембран мозга быка [8]. Определение активности проводили, как описано ранее [9]. Обработку ингибитором проводили без предварительной преникубации, так как длительность преникубации не влияла на торможение МАО исследуемыми ингибиторами. Ингибитор-основание растворяли в 96 % этиловом спирте и вносили в пробы после разведения в 100 раз и более 0,1 М

фосфатным буфером pH 7,4, учитывая в контроле концентрацию спирта. Белок определяли по методу [16]. Обратимость торможения изучали путем сравнения активности фермента митохондриальных мембран до обработки ингибитором, а также после такой обработки без отмывания и после 3-кратного отмывания препарата буфером, центрифугируя при 16 000 g.

В работе использовали серотонинкреатининсульфат («Rea-pal», Венгрия), тирамин хлоргидрат («Serpa», ФРГ), фенилэтиламин хлоргидрат был любезно предоставлен проф. М. Сэндлером (Англия), бефол и моклобемид синтезированы в Институте фармакологии АМН СССР.

Результаты и их обсуждение. В качестве субстратов использовали специфические субстраты МАО типов А и Б — серотонин и фенилэтиламин соответственно [14], дофамин — возможный субстрат «дофаминоксидазы» [10, 23] и тирамин — по общепринятой классификации общий субстрат МАО типов А и Б. Зависимость торможения активности фермента от концентрации исследованных ингибиторов представлена в таблице. Наибольшая концентрация бефола обусловлена пределом его растворимости. Из таблицы видно, что в концентрации $1 \cdot 10^{-8}$ М торможение практически отсутствует. Для сравнения можно указать, что мощный ингибитор МАО типа А хлоргилин (хлоргидрат N(2,4-дихлорфенокси)пропил-N-метил-2-пропиламина) в такой же концентрации тормозит дезаминирование серотонина более чем на 50 % [14]. С повышением концентрации производных бензамида особенно отчетливо обнаруживается торможение серотониндезаминазной активности (50 % торможение при концентрации ингибитора $1 \cdot 10^{-5}$ М). В несколько меньшей степени тормозится дезаминирование дофамина. Торможение 2-фенилэтиламина не превышает 10 %. Можно сделать вывод, что исследованные соединения являются специфическими ингибиторами МАО типа А. В тканях мозга быка МАО типа А, более чувствительная к хлоргилину, дезаминирует не только серотонин, но и 2-фенилэтиламин и дофамин [14]. Точно так же МАО типа Б (по определению — форма, более чувствительная к депренилу (N(1-фенилизопропил)N-метил-2-пропиламину), чем к хлоргилину, дезаминирует в этом

Влияние производных бензамида на активность митохондриальной МАО мозга быка ($M \pm m$)

Ингибитор	Концентрация, М	Торможение дезаминирования, %			
		тирамин	дофамин	2-фенилэтиламин	серотонин
Контроль		0	0	0	0
Моклобемид	10^{-5}	0	23 ± 2	8 ± 1	46 ± 5
	10^{-6}	0	11 ± 1	8 ± 1	29 ± 3
	10^{-7}	0	6 ± 1	$4 \pm 0,5$	14 ± 2
	10^{-8}	0	$1 \pm 0,01$	$3 \pm 0,3$	$8 \pm 0,5$
Бефол	10^{-5}	$7 \pm 0,7$	21 ± 2	11 ± 1	45 ± 5
	10^{-6}	0	15 ± 1	10 ± 1	32 ± 3
	10^{-7}	0	$9 \pm 0,5$	10 ± 1	15 ± 2
	10^{-8}	0	0	$1 \pm 0,01$	$4 \pm 0,2$

Примечание. Приведены средние результаты 4 определений со стандартным отклонением при $p < 0,05$ по отношению к контролю. За 100 % приняты удельные активности: $8,5 \pm 0,3$ нмоль/мг за 1 мин по тирамину; $4,6 \pm 0,2$ нмоль/мг за 1 мин по дофамину; $1,9 \pm 0,2$ нмоль/мг за 1 мин по серотонину; $4,0 \pm 0,4$ нмоль/мг за 1 мин по 2-фенилэтиламину.

объекте не только 2-фенилэтиламин, но и серотонин и дофамин [14]. С учетом этого факта дезаминирование общего субстрата обеих форм фермента — тирамина — должно бы принимать заметное и промежуточное значение между величинами, определяемыми для специфических субстратов. Как видно из таблицы, дезаминирование тирамина не подвержено влиянию исследуемых соединений. Подобная картина не характерна для торможения специфическими ингибиторами, используемыми для классификации типов MAO,— хлоргилином и депренилом.

Отсутствие торможения тираминдеаминазной активности, учитывая наличие ингибирования фермента по серотонину, показывает необычность этого класса ингибиторов, действующих скорее не как ингибиторы MAO типа А вообще, а более избирательно.

Ранее было показано, что гидразиновые ингибиторы [1] и производные пирролохинолина [9] в большей степени тормозили тираминдеаминазную активность, чем специфическую активность MAO типов А и Б. При этом найдены существенные различия кинетических констант и предложено существование особой формы фермента или специфического участка активного центра для связывания тирамина. Подобное заключение было сделано и на основании опытов со смешанными субстратами [22]. Первое из этих предположений — существование особой формы фермента — в свете данных о множественности MAO мозга быка и человека [5, 18], среди которых не обнаружено отдельной формы, катализирующей дезаминирование только тирамина, представляется маловероятным. Поэтому отсутствие торможения дезаминирования тирамина бифолом и моклобемидом, выявленное в данной работе, подтверждает предположение о существовании специфического субстратсвязывающего участка активного центра, принимающего участие в дезаминировании тирамина, но не серотонина или 2-фенилэтиламина. Ранее было показано, что производные моклобемиды, не содержащие морфолинового ядра, обладают способностью тормозить дезаминирование тирамина и серотонина в равной мере [4].

Полученные результаты свидетельствуют о несовершенстве бинарной классификации, на основании которой все ингибиторы должны тормозить дезаминирование тирамина. Вместе с тем наши данные указывают на очевидную возможность создания лекарственных средств, не вызывающих «сырный синдром». Это представлялось невозможным, если принимать во внимание только бинарную классификацию MAO.

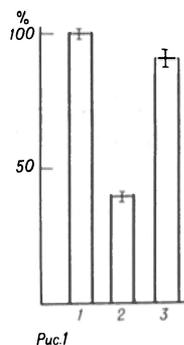


Рис. 1. Обратимость торможения серотониндеаминазной активности MAO мозга быка бифолом.

Исходная удельная серотониндеаминазная активность митохондрий мозга быка составила $3,4 \pm 0,4$ нмоль/мг белка за 1 мин. Представлены средние арифметические величины \pm стандартное отклонение по результатам 4 определений. 1 — исходная активность фермента; 2 — то же + бифол (10^{-5} М); 3 — активность отмытых [митохондрий + бифол (10^{-5} М)].

Серотониндеаминазная активность митохондрий мозга быка под действием производных бензамида тормозится почти в такой же мере, что и серотониндеаминазная активность митохондрий мозга крысы под действием пиразидола [7] и инказана [2]. Изученные нами соединения отличаются от последних более высокой степенью избирательности.

Из опытов, результаты которых представлены на рис. 1, видно, что бифол является обратимым ингибитором MAO. Активность фермента восстанавливается после отмывания ингибитора буфером.

На рис. 2 представлены результаты опытов по определению типа ингибирования MAO изучаемыми соединениями. На графиках видно, что тип торможения бесконкурентный, т. е. ингибиторы взаимодействуют с фермент-субстратным комплексом. Такие результаты не могут подтверждать, но и не противоречат ранее сделанному заключению о наличии специфических субстратсвязывающих участков фермента.

Таким образом, производные бензамида являются обратимыми бесконкурентными ингибиторами MAO. Они высокоизбирательно тормозят серотониндеаминазную активность MAO мозга. В связи с малым влиянием этих соединений на обратный захват моноаминов [3] можно предположить, что одной из причин их антидепрессивного действия является обратимое ингибирование MAO типа А, не затрагивающее дезаминирования тирамина.

ЛИТЕРАТУРА

1. Бауманис Э. А., Калниня И. Э., Москвитина Т. А. и др. // Биохимия.— 1978.— Т. 53.— С. 714—720.
2. Васильевых Л. Г., Глушков Р. Г., Горкин В. З. и др. // Хим.-фарм. журн.— 1979.— Т. 13, № 7.— С. 20—24.
3. Ганкина Е. М., Майсов Н. И. // Бюл. эксп. биол.— 1983.— № 8.— С. 52—54.
4. Гольдина О. А., Загоревский В. А., Лопатина К. И. и др. // Там же.— 1986.— Т. 8.— С. 170—172.
5. Камышанская Н. С., Москвитина Т. А. // Вопр. мед. хим.— 1981.— Т. 227.— С. 261—266.

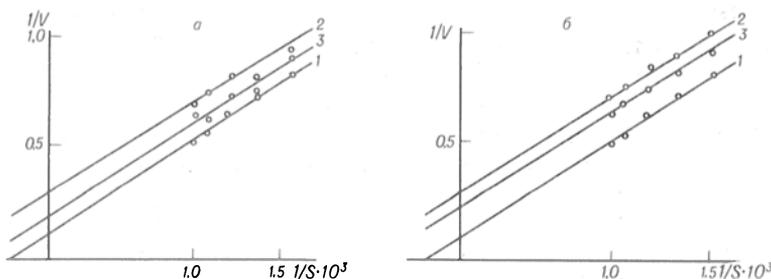


Рис. 2. Торможение серотониндеаминазной активности MAO мозга быка моклобемидом (а) и бифолом (б).

1 — исходная активность MAO (в нмоль⁻¹·мин⁻¹·мг⁻¹); 2 — то же + ингибитор (10^{-6} М); 3 — то же + ингибитор (10^{-7} М).

6. Козловская М. М., Ганкина Е. М., Гольдина О. А. и др. // Всесоюзный съезд фармакологов, 6-й: Тезисы докладов.— Ташкент, 1986.— С. 180—181.
7. Машиковский М. Д., Гокин В. З., Веревкина И. В. и др. // Бюл. exper. биол. мед.— 1981.— Т. 51.— С. 165—191.
8. Москвитина Т. А., Каверина Л. П., Сергиенко Н. С. и др. // Вопр. мед. химии.— 1977.— Т. 23.— С. 352—358.
9. Москвитина Т. А., Шабунова В. П., Ахведиани Р. П. и др. // Биохимия.— 1988.— Т. 53.— С. 714—720.
10. Collins G. G., Sandler M., Williams E. D. et al. // Nature.— 1970.— Vol. 25.— P. 817—820.
11. DaPrada M., Kettler R., Keller H. H. et al. // Basic and clinical frontiers.— Hacone, 1981.— P. 183—196.
12. DaPrada M., Zürcher G., Wüthrich I. et al. // J. Neural. Transmiss.— 1988.— Suppl. 26.— P. 31—56.
13. Fowler C. J., Callingham B. A., Houslay M. D. // J. pharm. Pharmacol.— 1977.— Vol. 29.— P. 411—416.
14. Fowler C. J., Callingham T. J., Mantle K. F. et al. // J. biol. Chem. Pharm.— 1978.— Vol. 27.— P. 97—101.
15. Huang R. H., Eiduson S. // J. biol. Chem.— 1977.— Vol. 252.— P. 284—290.
16. Lowry O. H., Rosebrough N. F., Farr A. L., Randall R. J. // Ibid.— 1951.— Vol. 193.— P. 265—275.
17. Lapin L. P., Oxenkrug C. P. // Lancet.— 1969.— Vol. 1.— P. 132—136.
18. Moskvitina T. A., Kamyshanskaya N. S., Garishvili T. G., Gorkin V. Z. // Prep. Biochem.— 1979.— Vol. 9.— P. 171—196.
19. Naoi M., Yagi K. // Arch. biochem. Biophys.— 1980.— Vol. 205.— P. 18—24.
20. Van Praag // Lancet.— 1981.— Vol. 1.— P. 1259—1264.
21. Waldmeier P. C. // J. neurol. Transmiss.— 1987.— Suppl. 23.— P. 55—72.
22. White H. L., Wu J. S. // J. Neurochem.— 1975.— Vol. 25.— P. 21—24.
23. Youdim M. B. H., Hollman B. // J. neural. Transmiss.— 1975.— Vol. 37.— P. 11—24.
24. Youdim M. B. H., Finberg F. P. M. // Psychopharmacology. Pt 1.— Amsterdam, 1983.— P. 38—70.

Поступила 18.07.89

SELECTIVE INHIBITION OF MONOAMINE OXIDASE FROM BOVINE TRUNCUS CEREBRI BY MEANS OF BEFOL AND MOKLOBEMIDE

T. A. Moskvitina, E. M. Gankina, A. V. Valdman

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

Effects of befol and moklobemide on tyramine-, serotonin- and 2-phenyl ethylamine deaminase activities of mitochondrial monoamine oxidase from bovine *truncus cerebri* were studied. These drugs are reversible noncompetitive inhibitors of the enzyme not requiring preincubation. They inhibited most effectively the serotonin deaminase activity as compared with phenyl ethylamine deaminase activity, however they should not be concerned with typical inhibitors of monoamine oxidases of the A type as inhibition of tyramine deaminase activity was not found.

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 1991

УДК 616.61-002.151-07:616.61-008.93:547.943

В. Д. Слепушкин, Y. Grässler, D. W. Scheuch

ОТРИЦАТЕЛЬНОЕ ДЕЙСТВИЕ ЭНКЕФАЛИНОВ НА ЭНЕРГЕТИКУ ПОЧЕК У КРЫС С ГЕМОРАГИЕЙ

Новокузнецкий институт усовершенствования врачей Минздрава СССР, Институт патологической биохимии медицинской академии, Дрезден

Известно, что энкефалины участвуют в центральной регуляции деятельности сердечно-сосудистой системы [1, 7, 11]. Микроинъекции мю-аго-

ниста ДАГО в ядро или желудочки мозга продуцируют прессорный эффект, тогда как агонист дельта-опиатных рецепторов ДАДЛ в этом отношении в 10 раз менее эффективен [7, 12]. Внутривенное введение ДАГО, по нашим данным, увеличивало выживаемость и среднее артериальное давление при геморрагии у крыс, в то время как введение ДАДЛ повышало летальность при геморрагии и вызывало преходящее снижение артериального давления у крыс [8]. Эти данные доказывают, что энкефалины могут оказывать влияние на сердечно-сосудистую систему как центральным, так и периферическими путями. С другой стороны, хорошо известно, что сохранность функции почек крайне важна для положительного исхода геморрагического шока. Известно, что энкефалины изменяют функцию почек при шоке [2].

С целью выяснения роли почек как объекта периферического воздействия энкефалинов при геморрагическом шоке мы изучили влияние мю- и дельта-опиатных агонистов на энергетику почечной ткани в процессе геморрагии у крыс.

Методика. Взрослые крысы мужского пола линии Вистар массой 320—350 г анестезировали внутривенным введением пентобарбитала натрия из расчета 50 мг/кг. Канюлировалась бедренная вена. Геморрагия составляла 3% от массы тела и проводилась при помощи перистальтического насоса со скоростью 0,8 мл/кг в 1 мин. Синтетические аналоги лей-энкефалина (синтезированы проф. М. И. Титовым), действующие преимущественно на мю- или дельта-рецепторы (табл. 1), вводили после выпуска первоначальной порции крови в объеме 7,5%, внутривенно болюсно в дозе 100 мг/кг, в 0,6 мл физиологического раствора. Одной из групп крыс за 10 мин до геморрагии внутривенно инъезировали налоксон в дозе 1 мг/кг. Контрольные животные получали идентичные объемы физиологического раствора.

Образцы ткани почек забирали через 1 ч после геморрагии охлажденными щипцами и помещали в жидкий азот. Содержание адениннуклеотидов, молочной и пировиноградной кислот, глюкозы определяли при помощи наборов фирмы «Boehringer Mannheim» на спектрографе «Specord M-40». Содержание фруктозо-6-фосфата определяли спектрофотометрически [5]. Рассчитывали энергетический заряд (ЭЗ) системы адениннуклеотидов и суммарное содержание адениннуклеотидов (ΣАДН). Полученные результаты обрабатывали методом вариационной статистики ($\bar{X} \pm m$).

Результаты и обсуждение. Полученные данные суммированы в табл. 2. Обнаруженное у контрольных животных содержание метаболитов в почках соответствовало данным других авторов [9, 11]. Энергетическое состояние почек через 1 ч после геморрагии характеризовалось уменьшением АТФ на 31% и ЭЗ на 27%, в то время как содержание АМФ значительно возрастало. Соотношения АТФ/АДФ и АТФ/АМФ уменьшались на 30 и 80% соответственно. Значительно возрастали уровни лактата и глюкозы. Суммарное содержание адениннуклеотидов, АДФ, фруктозо-6-фосфата и глюкозо-6-фосфата оставалось неизменным.

Таблица 1

Аналоги энкефалинов, использованные в работе

Структурная формула энкефалина	Шифр	Рецепторная специфичность
Д-Ала ² , Д-Лей ⁵ -энкефалин	ДАДЛ	δ (дельта-рецептор)
Д-Ала ² , Д-Арг ⁶ -энкефалин	ДАДА	δ (дельта-рецептор)
Д-Ала ² , N-Мет-Фен ⁴ , Гли ⁵ -энкефалин	ДАГО	μ (мю-рецептор)

Влияние агонистов опиатных рецепторов на содержание метаболитов в ткани почек

Метаболиты	Контроль	Геморрагия	ДАДЛ	ДАДА	ДАГО	Налоксон + ДАГО
АТФ	1,22±0,08(6)	0,84±0,08*(6)	0,79±0,13(7)	0,78±0,11	0,54±0,07*(6)	0,64±0,11(6)
АДФ	1,09±0,03(8)	1,18±0,05(8)	1,21±0,08(6)	1,25±0,08(8)	0,94±0,07**(6)	1,38±0,07(7)
АМФ	0,36±0,05(8)	0,92±0,04*(8)	1,48±0,06**(7)	1,67±0,09**(7)	0,79±0,07(7)	1,42±0,07**(6)
АТФ/АДФ	1,05±0,08(7)	0,74±0,03*(7)	0,59±0,06**(7)	0,62±0,08(8)	0,57±0,06(8)	0,51±0,06(7)
АТФ/АМФ	4,52±0,80(8)	0,87±0,07*(7)	0,54±0,08**(7)	0,51±0,07**(7)	0,63±0,10(7)	0,48±0,07**(7)
АДН	2,67±0,08(8)	2,85±0,08(7)	3,39±0,20**(6)	3,79±0,19**(7)	2,01±0,28**(8)	2,59±0,28(6)
ЭЗ	0,66±0,03(8)	0,48±0,01*(7)	0,39±0,03**(7)	0,39±0,03**(7)	0,44±0,03(8)	0,38±0,02**(6)
Лактат	0,65±0,16(7)	2,52±0,26*(7)	2,68±0,16(6)	3,67±0,28**(8)	2,86±0,39(6)	2,36±0,30(6)
Пируват	0,20±0,03(7)	0,21±0,02(5)	0,04±0,01**(5)	0,12±0,02**(8)	0,56±0,18**(4)	0,26±0,04(6)
Глюкоза	3,22±0,15(7)	6,80±0,70*(8)	7,64±1,14(6)	8,61±0,70(7)	8,37±0,70(7)	8,52±0,12(7)
Фруктозо-6-фосфат	41,4±6,3(7)	30,2±4,3(8)	72,8±18,2**(6)	64,6±7,1**(7)	38,9±4,0(7)	50,0±7,1(7)
Глюкозо-6-фосфат	78,2±11,1(7)	53,3±8,9(8)	78,1±10,2(7)	75,2±12,4(7)	52,4±7,2(6)	79,2±11,2(6)

Примечание. Все величины, кроме фруктозо-6-фосфата и глюкозо-6-фосфата, выражены в мкмоль на 1 г ткани. Содержание фруктозо-6-фосфата и глюкозо-6-фосфата выражено в нмоль на 1 г ткани. Одна звездочка — $p < 0,05$ по отношению к контролю, две — $p < 0,05$ по отношению к группе животных с геморрагией; в скобках — число животных.

Введение ДАГО сопровождалось выраженным падением концентрации АТФ, снижением АДФ, в результате чего САДН уменьшалось. Значительное возрос уровень пирувата в почечной ткани. Указанные изменения отсутствовали в случае назначения блокатора опиатных рецепторов налоксона.

Инъекции ДАДЛ и ДАДА приводили к возрастанию АМФ и фруктозо-6-фосфата. Увеличение в почках АМФ вело к падению ЭЗ, тогда как САДН повышалось. В отличие от ДАДЛ при введении ДАДА регистрировался значительный прирост лактата. Как в случае назначения ДАДЛ, так и ДАДА увеличивалось содержание в ткани почек фруктозо-6-фосфата.

Несмотря на то что центральная опиоидная система отчетливо включается в регуляцию деятельности сердечно-сосудистой системы [7, 13], периферические опиоидные рецепторы также могут играть роль в патогенезе циркуляторного шока. Эта концепция доказывается кардиоваскулярным действием системного введения опиоидных пептидов в периферический кровоток [6, 8, 13]. Было показано, что опиоидные пептиды, действующие на мю-рецепторы, улучшают динамику артериального давления крови и повышают выживаемость животных при геморрагии [8, 13], в то время как противоположный эффект наблюдается при активации дельта-рецепторов [6, 8].

В настоящем исследовании показано, что аналоги энкефалинов, действующие на различные популяции опиатных рецепторов, вызывают в принципе однотипную реакцию, углубляя имеющуюся в результате геморрагии гипоксию почек, о чем свидетельствуют или усиленный распад АТФ (в ответ на ДАГО), или нарастание уровня АМФ (в ответ на введение ДАДЛ, ДАДА). Значительное уменьшение САДН после инъекции ДАГО отражает явное ухудшение почечной микроциркуляции под влиянием возбуждения мю-рецепторов. Конечно, это не исключает того обстоятельства, что ДАГО может оказывать действие и центральным путем, поскольку известно, что некоторые энкефалины могут проникать через гематоэнцефалический барьер при введении в периферический кровоток [4].

Несмотря на то что агонисты мю-опиатных

рецепторов ингибируют выделение вазопрессина [3], при геморрагии происходит угнетение диуреза как за счет ограничения скорости клубочковой фильтрации, так и снижения почечного кровотока в корковом слое почек на фоне введения энкефалинов [10]. В этом случае энкефалины и приводят к отмеченному в данной работе углублению нарушений метаболизма в почечной ткани.

Таким образом, полученные данные показывают, что синтетические аналоги энкефалинов, независимо от их аффинности к тому или иному типу опиатных рецепторов, усиливают постгеморрагическую гипоксию почек, тем самым как бы нейтрализуя положительный эффект ДАГО в отношении реакции артериального давления [8] при геморрагическом шоке.

ЛИТЕРАТУРА

1. Лишманов Ю. Б., Слепушкин В. Д., Титов М. И. // Механизмы патологических реакций. — Томск, 1982. — С. 100—102.
2. Золоев Г. К., Слепушкин В. Д. // Бюл. exper. биол. — 1986. — Т. 99, № 6. — С. 676—678.
3. Пруж Н. А., Лишманов Ю. Б., Слепушкин В. Д. // Там же. — 1984. — Т. 97, № 7. — С. 18—19.
4. Bajus S., Ronal A. S. // FEBS Lett. — 1977. — Vol. 33. — P. 87—90.
5. Bergmayer H. U. Methods of Enzymatic Analysis. Vol. 6—7. — Weinheim, 1984; 1985.
6. Caffrey J. L., Woldride C. B., Gaugl J. F. // Circulat. Shock. — 1985. — Vol. 17. — P. 233—242.
7. Feuerstein G., Siren A. L. // Hypertension. — 1987. — Vol. 9. — P. 561—565.
8. Grassler Y., Stepuschkin V. D., Zoloev G. K., Scheich D. W. // Fresenius Z. analyt. Chem. — 1988. — Bd 330. — S. 412—413.
9. Hems D. A., Brosnan J. T. // Biochem. J. — 1970. — Vol. 120. — P. 105—111.
10. Hurvitz A. // J. Pharmacol. exp. Ther. — 1981. — Vol. 216. — P. 90—94.
11. Needleman P., Passonneau J. V., Lowry O. H. // Amer. J. Physiol. — 1986. — Vol. 215. — P. 255—259.
12. Peiffer A., Feuerstein G., Zerbe R. L., Faden A. I. // Endocrinology. — 1983. — Vol. 113. — P. 929—938.
13. Traverso L. W., Bellamy R. F., Hollenbach S. J., Benar J. D. O. // Surg. Gynec. Obstet. — 1985. — Vol. 161. — P. 229—239.

NEGATIVE EFFECT OF ENCEPHALINES ON ENERGY METABOLISM IN KIDNEY OF RATS WITH HEMORRHAGE

V. D. Slepushkin, Y. Grassler, D. W. Scheuch

Institute for Postgraduate Training of Physicians, Ministry of Public Health of the USSR, Novokuznetsk, Institute of Pathological Biochemistry, Medical Academy of the DDR, Dresden

Content of adenine nucleotides, lactic and pyruvic acids, glucose and fructose-6-phosphate was studied in kidney of rats with hemorrhage constituting 3 % of body mass after intravenous administration at a dose of 100 mg/kg of agonists of μ -opiate receptors DAGO and of Δ -opiate receptors DADL and dalargine. Stimulation of both these types of receptors amplifies the kidney ischemia developed after hemorrhage, which was expressed as increased decomposition of ATP, decrease in energetic charge of the adenine nucleotide system (DAGO) and increase in content of AMP (DADL, dalargine).

© Э. С. ГЕВОРКЯН, 1991

УДК 612.822.015.1:577.152.34].014.46[615.357:577.175.642].085.2

Э. С. Геворкян

ИЗМЕНЕНИЕ АКТИВНОСТИ НЕКОТОРЫХ ПРОТЕИНКИНАЗ ВО ФРАКЦИЯХ СИНАПТОСОМ ГОЛОВНОГО МОЗГА КРЫС ПРИ IN VITRO ВОЗДЕЙСТВИЕМ ЭСТРАДИОЛА

Ереванский университет

В настоящее время известны два основных универсальных пути передачи сигнала с поверхности клетки вовнутрь: циклонуклеотидный и фосфоинозитидный механизмы [1]. Конечным этапом этих регуляторных путей передачи является активация специфических протеинкиназ, фосфорилирующих определенные белки, ферменты и тем самым контролирующими внутриклеточный метаболизм. Ранее было показано, что эстрадиол способен вызвать изменение инициации катаболизма фосфоинозитидов в мембранах синапсом головного мозга крыс [2], что, по-видимому, свидетельствует о возможной регуляции этим стероидным гормоном фосфоинозитидного пути внутриклеточной передачи сигнала. В настоящей работе проведено исследование влияния эстрадиола in vitro

на активность протеинкиназ, контролируемых фосфоинозитидным и циклонуклеотидным механизмами в синаптосомах и в их растворимой и мембранной фракциях.

Методика. Исследования проводили на беспородных крысах-самках массой 150–200 г. Синаптосомы выделяли по методу [3]. Мембранную и растворимую фракции синаптосом выделяли с применением осмотического шока. В синаптосомах и их фракциях определяли активность протеинкиназы А и протеинкиназы С [3], а также Ca^{2+} -кальмодулинкиназы [6]. Акцептором фосфорной группы служил (γ - ^{32}P)-АТФ с радиоактивностью $5-10 \cdot 10^4$ имп/мин/ммоль. Для определения активности трех протеинкиназ готовили соответствующую реакционную смесь [3, 6], в которую при изучении действия эстрадиола добавляли гормон, растворенный в пропиленгликоле. Использовали четыре концентрации гормона: 10^{-9} , 10^{-6} , 10^{-7} и 10^{-5} М. В контрольном варианте в реакционную смесь добавляли пропиленгликоль. Активность изученных протеинкиназ выражали в единицах, соответствующих количеству фермента, включающего 1 нмоль фосфата из АТФ в молекулу субстрата за 1 мин [3]. Количество белка определяли по методу Лоури [4].

Результаты и обсуждение. Из протеинкиназ, активность которых контролируется внутриклеточными универсальными регуляторными системами, в первую очередь необходимо указать на протеинкиназу А (цикло-АМФ-зависимую протеинкиназу), протеинкиназу С (Ca^{2+} , фосфолипидзависимую протеинкиназу) и Ca^{2+} -кальмодулинзависимую протеинкиназу. Имеются данные о наличии этих протеинкиназ в различных тканях животных, в частности во фракции синаптосом клеток головного мозга [3, 5]. Структура и функции этих протеинкиназ изучены недостаточно, хотя известны белки, специфически фосфорилируемые протеинкиназой А, протеинкиназой С и Ca^{2+} -кальмодулинкиназой.

Усредненные значения количества белка в изученных фракциях равнялись: во фракции синаптосом — 30 мг/г ткани, в мембранной фракции — 24 мг/г ткани и в растворимой фракции — 4 мг/г ткани. Результаты трех серий экспериментов приведены в таблице, из которой видно, что в контроле уровень активности всех изученных протеинкиназ примерно одинаков. При воздействии эстрадиола in vitro активность повышается, однако в разной степени, в первую очередь в зависимости от концентрации гормона.

Активность протеинкиназы А (ПКА), протеинкиназы С (ПКС) и Ca^{2+} -кальмодулинкиназы (ККК) в синаптосомах и их фракциях в контроле и при воздействии различных концентраций эстрадиола (E_2) in vitro

Исследуемые фракции	Концентрация эстрадиола, М	ПКА	ПКС	ККК
Синаптосомы	Контроль	1,25±0,05	1,25±0,06	1,12±0,05
	10^{-9}	1,27±0,06	1,48±0,05*	1,18±0,04
	10^{-8}	1,29±0,06	1,52±0,06*	1,20±0,05
	10^{-7}	1,46±0,06	1,57±0,07*	1,42±0,06*
	10^{-5}	1,65±0,09*	1,65±0,10*	1,59±0,08*
Мембранная фракция синаптосом	Контроль	1,32±0,06	1,13±0,04	0,85±0,02
	10^{-9}	1,36±0,06	1,44±0,06*	0,98±0,03
	10^{-8}	1,38±0,08	1,49±0,05*	1,15±0,05*
	10^{-7}	1,56±0,08	1,56±0,07*	1,21±0,06*
	10^{-5}	1,79±0,12*	1,64±0,10*	1,24±0,08*
Растворимая фракция синаптосом	Контроль	0,90±0,02	1,82±0,12	1,35±0,06
	10^{-9}	0,85±0,04	1,99±0,14	1,36±0,09
	10^{-8}	0,87±0,03	2,02±0,13	1,39±0,06
	10^{-7}	0,95±0,04	2,05±0,14	1,46±0,08
	10^{-5}	0,98±0,06	2,08±0,15	1,58±0,10

Примечание. Звездочка — $p < 0,05$.

При этом если высокие (фармакологические) концентрации гормона вызывают достоверное увеличение активности всех изученных ферментов, то при физиологических концентрациях эстрадиола заметное повышение активности отмечено только для протеинкиназы С, в то время как изменения активности протеинкиназы А и Ca^{2+} -кальмодулинкиназы недостаточны. Этот факт, по-видимому, свидетельствует о более важной роли протеинкиназы С в процессах фосфорилирования белков, регулируемых эстрадиолом, и подтверждает значимость фосфоинозитидной регуляторной системы в стероидзависимой модификации белков в клетках головного мозга крысы.

ЛИТЕРАТУРА

1. Берридж М. Дж. // В мире науки.— 1985.— № 12.— С. 98—109.
2. Геворкян Э. С., Тадевосян Ю. В., Карагезян Г. Ц. // Всесоюзный симпозиум по биохимии липидов: Тезисы.— Алма-Ата, 1987.— С. 25.
3. Kikkawa U., Takai Y., Minakuchi R. et al. // J. Biol. Chem.— 1982.— Vol. 257, N 22.— P. 13 341—13 348.
4. Lowry O. H., Rosebrough N. Y., Farr A. L., Randall R. J. // Ibid.— 1951.— Vol. 193, N 1.— P. 265—275.
5. Nairn A. C., Greengard P. // Proc. nat. Acad. Sci. USA.— 1983.— Vol. 80.— P. 760—764.
6. Qi De-Fang, Schatzman R. C., Mazzei G. J. et al. // Biochem. J.— 1983.— Vol. 213.— P. 281—288.

Поступила 02.08.89

ALTERATION IN ACTIVITY OF SOME PROTEIN KINASES IN SYNAPTOSOMAL FRACTIONS OF RAT BRAIN AFTER ACTION OF ESTRADIOL *IN VITRO*

E. S. Gevorgyan

Chair of Biophysics, State University, Yerevan

Effect of various concentrations of estradiol on activity of protein kinases A and C as well as of Ca^{2+} -calmodulin kinase was studied in synaptosomes, their membrane and soluble fractions *in vitro*. Pharmacological concentrations of the hormone activated distinctly all the kinases studied, while physiological concentrations of estradiol increased markedly the activity of protein kinase C. These data suggest that protein kinase C is of importance for protein phosphorylation regulated by estradiol in rat brain cells.

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 1991

УДК 616.5-004.1-031.4-07:616.633.821-092:612.017.4

Н. Н. Прозоровская, Т. Н. Сучкова, Е. А. Козлов, С. В. Сучков, Т. А. Прохорова, А. А. Дельвие

СВЯЗЬ МЕЖДУ РАСПАДОМ ЗРЕЛОГО КОЛЛАГЕНА И УРОВНЕМ ЕСТЕСТВЕННОЙ ЦИТОТОКСИЧНОСТИ У БОЛЬНЫХ ОЧАГОВОЙ СКЛЕРОДЕРМИЕЙ

Институт биологической и медицинской химии АМН СССР, Москва

Ранее [2, 3] нами было выдвинуто предположение о том, что при очаговой склеродермии динамика изменений в отношении уровней коллагенолиза и коллагенообразования определяется рядом иммунологических факторов, в том числе функциональным состоянием естественных клеток-киллеров (ЕКК). Для проверки этого предположения было проведено исследование характера взаи-

моотношений между уровнем экскреции пиридинолина и уровнем естественной цитотоксичности у больных очаговой склеродермией. Пиридинолин играет роль основной межмолекулярной связи в фибриллярных коллагенах большинства типов соединительной ткани, практически отсутствуя в коже и роговице [6] и является специфическим маркером деградации коллагеновых фибрилл и соединительной ткани внутренних органов.

Результаты проведенного исследования продемонстрировали наличие обратной корреляции между интенсивностью распада фибриллярного коллагена и активностью ЕКК. Полученные данные также показали, что лечение больных очаговой склеродермией Т-активином оказывает не только корригирующее действие на функциональную активность ЕКК, но и нормализующее влияние на уровень экскретируемого с мочой пиридинолина.

Методика. Под наблюдением находилось 11 пациентов (9 женщин и 2 мужчин) в возрасте от 22 до 68 лет (средний возраст $48,6 \pm 14,9$ года; $M \pm \sigma$), страдавших очаговой склеродермией сроком от 4 мес до 7 лет, из которых у 4 больных была генерализованная и у 7 — ограниченная бляшечная форма. В качестве контрольной группы было обследовано 20 добровольцев сходного возраста.

Активность ЕКК определяли в стандартном микроцитотоксическом тесте, как описано ранее [4].

Стандартный препарат пиридинолина был получен из ахиллова сухожилия быка по методу, описанному D. Euge и соавт. [5]. Для определения концентрации пиридинолина использовали стандартный раствор N-этил-3-пиридинола («Aldrich Chemical Co.», США), основываясь при расчетах на том, что оба соединения имеют одинаковые коэффициенты молярной экстинкции [5].

Чтобы определить содержание пиридинолина в моче, 50 мл из ее утренней порции фракционировали на колонке с сефадексом G-10 (5×70 см) с регистрацией оптической плотности элюата при 280 нм. Материал первого пика лиофилизировали и гидролизовали в 6 н. НСI в течение 22 ч при температуре 105 °С. Гидролизат высушивали, растворяли в 10 % уксусной кислоте и последовательно фракционировали на колонках с сефадексом G-15 ($2,5 \times 32$ см) и на предварительно откалиброванной с пиридинолином колонке ($0,9 \times 60$ см) с ионообменной смолой Aminex Q150S ("Bio-Rad", США) [9].

Концентрацию пиридинолина (суммарно лизилпиридинолина и оксизилпиридинолина) определяли, сравнивая флуоресценцию опытных проб с таковой стандартного раствора пиридинолина (длина волны возбуждения 295 нм, эмиссии — 395 нм). Количество пиридинолина относили к креатинину (Пир/Кр, нмоль/мкмоль).

Креатинин определяли методом Поннера и соавт. [1], основываясь на цветной реакции Яффе.

Анализы проводили два дня подряд в следующие сроки: до начала лечения, сразу после его завершения и в отдаленный период — через 5—6 мес после окончания терапевтического курса. Для лечения применяли отечественный препарат Т-активин, получение которого, дозировка и клиническая оценка эффективности описаны нами ранее [3].

Результаты и обсуждение. Исследование содержания пиридинолина в моче больных очаговой склеродермией показало, что величина отношения Пир/Кр колеблется в диапазоне от 0,016 до 0,159 нмоль/мкмоль, составляя в среднем $0,094 \pm 0,049$. Эта величина достоверно выше, чем у практически здоровых людей, у которых она составляла в среднем $0,037 \pm 0,018$ ($p < 0,01$).

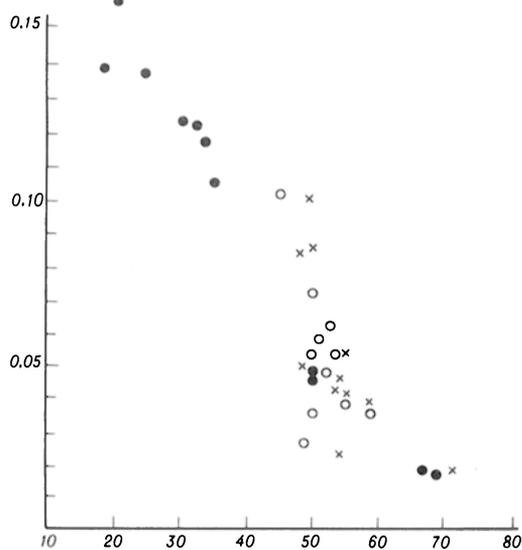
Согласно данным литературы [7], высокий уровень экскреции пиридинолина может иметь место в пожилом возрасте и свидетельствовать о развитии остеопороза, однако тщательное клиническое обследование указанной выборки больных очаговой склеродермией не выявило у них клиниче-

Экскреция пиридинолина с мочой у больных очаговой склеродермией в зависимости от возраста, длительности и клинической формы заболевания, а также от уровня естественной цитотоксичности ($M \pm \sigma$)

Фактор сравнения	Число больных	Пир/Кр (нмоль/мкмоль)
Доноры (норма)	20	$0,037 \pm 0,018$
Больные очаговой склеродермией	11	$0,094 \pm 0,049$
Возраст, годы:		
22—37	4	$0,106 \pm 0,035$
46—56	3	$0,046 \pm 0,042$
61—67	4	$0,101 \pm 0,053$
Длительность заболевания, годы:		
менее 1	5	$0,089 \pm 0,049$
2—3	3	$0,062 \pm 0,044$
6—7	3	$0,133 \pm 0,018$
Клиническая форма:		
ограниченная	7	$0,073 \pm 0,049$
генерализованная	4	$0,130 \pm 0,017$
Уровень естественной цитотоксичности, %:		
$30,7 \pm 5,7$	7	$0,129 \pm 0,016$
$50,0 \pm 0,0$	2	$0,0475 \pm 0,0005$
$67,0 \pm 1,0$	2	$0,0165 \pm 0,0005$
$54,6 \pm 3,6$ (норма)	10	

ских признаков остеопороза. Исследование линейной корреляции между возрастом больных и уровнем экскреции пиридинолина не обнаружило какой-либо связи ($r=0,11$) (см. таблицу).

Не установлено также зависимости экскреции пиридинолина от срока заболевания ($r=0,325$), однако у больных с генерализованной формой заболевания отношение Пир/Кр было заметно выше, чем при ограниченной форме ($p < 0,05$). Исследование зависимости величины отношения Пир/Кр от активности ЕКК продемонстрировало существенные различия в уровне экскреции пиридинолина, определяемые значениями активности ЕКК у обследованных больных и наличие обратной корреляции ($r=-0,977$) между этими показателями (см. рисунок).



Связь между экскрецией пиридинолина с мочой и уровнем естественной цитотоксичности у больных очаговой склеродермией.

По оси абсцисс — Пир/Кр; по оси ординат — естественная литическая активность клеток-киллеров, %. Крестик — исходные данные, точка — после лечения, кружок — в отдаленный период (через 5—6 мес после завершения лечения).

Результаты лечения Т-активином представлены на рисунке. После проведения курса лечения у 7 больных наблюдалась нормализация показателей естественной цитотоксичности и экскреции пиридинолина, которая сохранялась и в отдаленный период. Однако у 3 больных, несмотря на отмеченную тенденцию к нормализации этих показателей, наблюдались признаки обострения в отдаленный период, и двоим из них было проведено повторное лечение.

Проведенное исследование позволило выявить высокую обратную корреляцию между литической активностью ЕКК и интенсивностью деградации фибриллярного коллагена у больных очаговой склеродермией. Лечение Т-активином оказывало не только корригирующее действие на функциональную активность ЕКК, но и нормализующее влияние на показатель Пир/Кр. Этот факт свидетельствует о наличии зависимости между состоянием естественной цитотоксичности и катаболизмом коллагена у больных очаговой склеродермией.

Повышенный уровень экскреции пиридинолина с мочой у ряда больных очаговой склеродермией может указывать на то, что патологический процесс охватывает, по-видимому, помимо дермы, и другие виды соединительной ткани и лечение Т-активином лишь временно снижает активность этого процесса. Доказательством этого служит, в частности, тот факт, что у 3 больных с изначально высоким показателем Пир/Кр не была достигнута полная его нормализация, а в отдаленный период после лечения снова наблюдалось его увеличение наряду с проявлением признаков обострения процесса.

Однако повышенный уровень экскреции с мочой зрелых шшивок со структурой пиридинолина может также быть связан с появлением этих шшивок в фибриллярном коллагене бляшек, как это имеет место, например, в фибриллярном коллагене ткани после ожоговых патологических, гипертрофических и келоидных рубцов [8]. Подтверждением этого может служить более высокий уровень экскреции пиридинолина с мочой у больных с генерализованной формой.

Установление тесной связи между уровнем зрелых шшивок с пиридинолиновой структурой и уровнем естественной цитотоксичности у больных очаговой склеродермией свидетельствует о существовании тесной связи между состоянием клеточного иммунитета и характером течения патологического процесса.

ЛИТЕРАТУРА

- Карпенко В. С., Колесников Г. Ф., Петрунь Н. М. и др. // Функциональная диагностика в урологии и нефрологии. — Киев, 1977. — С. 8—10.
- Прозоровская Н. Н., Сучкова Т. Н., Сучков С. В., Дельвиг А. А. // Вопр. мед. химии. — 1988. — № 1. — С. 95—100.
- Сучкова Т. Н., Прозоровская Н. Н., Сучков С. В., Дельвиг А. А. // Вестн. дерматол. — 1987. — № 9. — С. 8—14.
- Сучкова Т. Н., Чекнев С. Б. // Там же. — 1986. — № 10. — С. 13—17.
- Eyre D. R., Koob N. J., van Ness K. R. // Analyt. Biochem. — 1984. — Vol. 137. — P. 380—388.
- Eyre D. R., Paz M. A., Gallop P. M. // Ann. Rev. Biochem. — 1984. — Vol. 53. — P. 717—748.
- Fujimoto D., Suzuki M., Vchiyama A. et al. // J. Biochem. (Tokyo). — 1983. — Vol. 94. — P. 1133—1136.

8. Moriguchi T., Fujimoto D. // J. invest. Derm.— 1979.— Vol. 72.— P. 143—145.
 9. Ogawa T., Ono T., Tsuda M. et al. // Biochem. biophys. Res. Commun.— 1982.— Vol. 107.— P. 1252—1257.

Поступила 17.04.90

INTERRELATIONSHIP BETWEEN DECOMPOSITION OF MATURE COLLAGEN AND THE STATE OF NATURAL CYTOTOXICITY IN PATIENTS WITH FOCAL SCLERODERMIA

N. N. Prozorovskaya, T. N. Suchkova, E. A. Kozlov, S. V. Suchkov, T. A. Prokhorova, A. A. Deloig

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

Increased rate of pyridinoline excretion with urine was detected in patients with focal sclerodermia: the ratio pyridinoline/creatinine was equal to 0.094 ± 0.049 as compared with that of 0.073 ± 0.049 in controls. Concentration of mature collagen cross-links involving pyridinoline structure in urine of patients with focal sclerodermia did not depend on the patients age and the disease duration. However, this pattern correlated distinctly with clinical form of the disease (0.073 ± 0.049 in local form and 0.013 ± 0.017 in generalized form of sclerodermia) as well as correlated reversely with the rate of activity of natural killer cells ($r = -0.977$).

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 1991

УДК 612.17.015:577.112].019:599.75

Т. В. Попова, Р. М. Срапионян, А. А. Галоян

ОБНАРУЖЕНИЕ И ИДЕНТИФИКАЦИЯ В СЕРДЦЕ БЫКА НОВЫХ КАРДИОАКТИВНЫХ БЕЛКОВ

Институт биохимии АН Армянской ССР, Ереван

Открытие эндокринного сердца в 1967 г. [3] и исследование широкого метаболического спектра кардиоактивности не только в мозге [1], но и в других органах, в частности в сердце, привели к обнаружению [5], а в дальнейшем и к детальной идентификации, помимо нейрогормон С-подобных соединений, также и других кардиоактивных соединений, прямо или косвенно участвующих в нейрогуморальной регуляции сердечно-сосудистой деятельности. Были получены данные [4], свидетельствующие об участии крупноклеточных ядер гипоталамуса в осуществлении обратных связей между этим регионом мозга и сердцем, основой которых, как известно, является комплекс гормональных сигналов, влияющих на соответствующие структуры гипоталамуса. Установлено, что в критических ситуациях из сердца в кровоток выделяются специфические агенты, которые и способствуют выходу в общую циркуляцию кардиоактивных нейрогормонов группы С и тем самым замыкают круг feed back [10].

В связи с поисками пусковых механизмов действия нейрогормонов большое значение приобретает вопрос об их связывании с определенными белками сердечной мышцы. Проведенные в этом направлении исследования [6] выявили в сердце ряда животных (кошки, овцы, свиньи, быка) 3 белка, связывающих кардиоактивные соединения [7]. В дальнейшем благодаря усовершенствованию методов выделения и очистки удалось обнаружить до 7 подобных белков и изучить

их региональное распределение [8]. Установлено было, что кардиоактивные белки обнаруживались в предсердном и ушковом регионах сердца; в желудочках же эти белки отсутствуют. В настоящей работе рассмотрены вопросы выделения вышеуказанных 7 белков и идентификация ряда их биологических свойств.

Методика. Очищенную от жировой ткани, пленок, сосудов сердечную мышцу расчленили; в опыт брали ушковую и предсердную область. Образцы гомогенизировали в воде в соотношении 1:2 (масса:объем) на дезинтеграторе ФУГ-1 в течение 5—8 мин (мельющие тела 80 см^3 , при 8°C , 3000 об/мин). Гомогенат центрифугировали 15 мин при 5000 g. Надосадок фракционировали сульфатом аммония в пределах 10—20 % насыщения, полученную суспензию центрифугировали 60 мин при 10 000 g, осадок диализовали и использовали для дальнейшей очистки.

Гель-фильтрацию осуществляли на сефадексе G-100 в колонке размером $37 \times 3 \text{ см}$, элюцию проводили борно-борным буфером pH 8,0 со скоростью 40 мл/ч.

Ионообменную хроматографию (ИОХ) проводили на ДЭАЭ-целлюлозе с применением линейного градиента элюции, где значительный градиент концентрации соли NaCl (от 0,2 до 0,5 M) сочетался с небольшим понижением pH фосфатного буфера от 6,5 до 5,0 (размер колонки $30 \times 1,3 \text{ см}$, скорость элюции 20 мл/ч). Рехроматографию проводили при тех же условиях.

Гомогенность белковых препаратов контролировали методом диск-электрофореза в 7,5 % ПААГ по методу [9], а также определением N-концевых аминокислот. Окрашивание гелей проводили в 0,25 % растворе амидо-черного 10 В.

Аминокислотный анализ проводили после гидролиза препаратов в стандартных условиях (5,7 н. HCl, 22 ч, 110°C) в автоматическом анализаторе «Durrum Model 250» (США).

Определение биологической активности по изменению коронарного оттока проводили в условиях *in situ* на кошках под уретановым наркозом.

Результаты и обсуждение. Используемая схема очистки позволила выделить кардиоактивные белки в отдельности из предсердного и ушкового регионов сердца. Как показали результаты гель-фильтрации, белки предсердия, высолненные в пределах насыщения 10—20 %, элюируются тремя пиками активности (П-1, П-2, П-3), один из которых (П-1) элюируется в свободном объеме элюента. Белки ушковой области, высолненные в тех же пределах насыщения, элюируются двумя пиками активности (У-1, У-2) (рис. 1).

Последующий этап (ИОХ и рехроматография на ДЭАЭ-целлюлозе) не только обеспечил достаточно высокую степень очистки, но и позволил выявить в составе первого пика предсердия, элюируемого с сефадекса G-100, два активных белка (П-1А и П-1Б), между выходами которых отмечался значительный интервал, исчисляемый как во времени (5 ч), так и объемом элюента (100 мл) (рис. 2). При ИОХ на ДЭАЭ-целлюлозе белков ушковой области второй пик активности разделился на два белка (У-2А и У-2Б), временной интервал между выходами которых достигал 4 ч, а различие между объемами элюента составляло 80 мл. Чтобы убедиться в достоверности полученных фактов, мы произвели рехроматографию каждого активного белка на ДЭАЭ-целлюлозе, сохраняя условия эксперимента. Положение зон активных белков при этом не изменилось.

Результаты электрофореза в 7,5 % ПААГ показали, что все очищенные кардиоактивные белки идентифицируются в виде четких однородных зон, за исключением образца У-2Б, который характеризуется некоторой микрогетерогенностью.

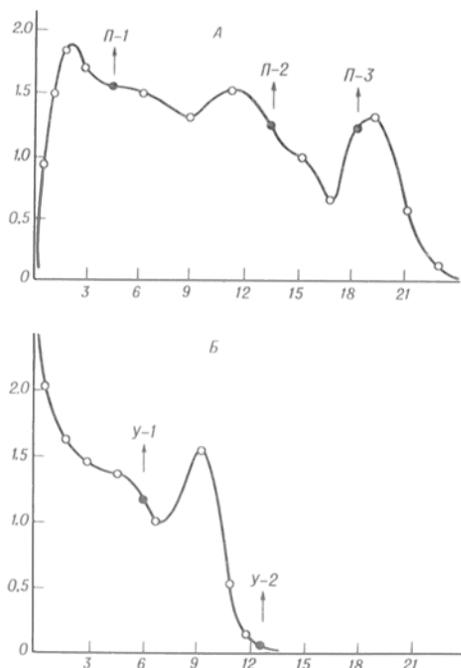


Рис. 1. Гель-фильтрация на сефадексе G-100 белков предсердной (А) и ушковой (Б) области сердца быка.

Здесь и на рис. 2: по оси абсцисс — номер фракции; по оси ординат — единицы оптической плотности при 280 нм.

Описанная схема очистки позволяет получить примерно 1 мг электрофоретически гомогенных белков из 1 кг сырой ткани. Уместно отметить, что с использованием детергентов, в частности тритона X-100, количество кардиоактивных белков не изменилось, хотя и общая сумма белков, выделенных в тех же пределах насыщения (10—20 %), увеличилась примерно в 20 раз. Это позволяет заключить, что исследуемые белки являются исключительно водорастворимыми.

Исследование ряда химических свойств кардиоактивных белков сердца показало, что они достаточно стабильны в буферных растворах при pH от 3,5 до 8,6 и в диапазоне температур от 0 до 40 °С. Как уже было сказано, они водорастворимы, Люори-положительны, при pH 8,0 мигрируют

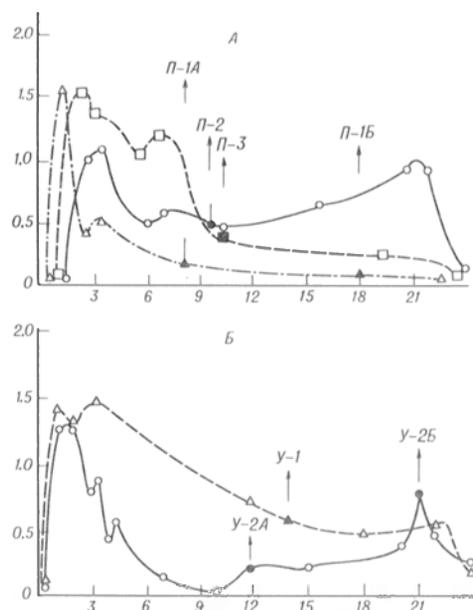


Рис. 2. ИОХ на ДЭАЭ-целлюлозе кардиоактивных белковых фракций предсердной (А) и ушковой (Б) области сердца быка.

к аноду с почти одинаковой электрофоретической подвижностью. Поведение описанных белков свидетельствует об их достаточно кислой природе, что подтверждается также преобладанием в их составе аспарагинового и глутаминового кислотных остатков (см. таблицу).

Остатки кислых аминокислот составляют в белках сердца (в последовательности, приводимой в таблице) примерно 26, 51, 24, 24, 25, 12 и 32 моль %. На долю основных аминокислот приходится в том же соответствии 14, 12, 7, 13, 11, 12 и 19 моль %. Обращает на себя внимание высокое содержание группы полярных аминокислот — серина, глутаминовой кислоты, глицина, аланина, составляющие примерно 45—70 % от общей суммы аминокислотных остатков. Одновременно следует отметить низкое содержание неполярных аминокислот, в частности тирозина и фенилаланина, остатки которых в белке П-3 вообще отсутст-

Аминокислотный состав кардиоактивных белков предсердного и ушкового регионов сердца быка

Аминокислота	Содержание аминокислотных остатков, нмоль на 1 моль белка						
	П-1А	П-1Б	П-2	П-3	V-1	V-2А	V-2Б
Аспарагиновая	1,169 (5)	1,334 (4)	2,077 (8)	0,412 (3)	1,762 (6)	1,967 (5)	0,203 (1)
Треонин	0,326 (1)	0,755 (2)	1,583 (6)	0,222 (1)	1,526 (5)	0,857 (2)	—
Серин	3,341 (16)	0,344 (1)	6,257 (23)	0,753 (5)	7,385 (23)	1,197 (3)	0,195 (1)
Глутаминовая	3,564 (17)	6,466 (2)	5,543 (21)	0,622 (4)	1,432 (5)	2,424 (7)	0,273 (2)
Пролин	0,816 (4)	0,655 (2)	1,029 (4)	—	1,174 (4)	1,259 (3)	—
Глицин	3,177 (15)	2,095 (6)	5,200 (19)	0,914 (6)	4,331 (14)	2,233 (6)	0,365 (3)
Аланин	1,606 (8)	1,754 (5)	3,565 (13)	0,643 (4)	2,841 (9)	2,272 (6)	0,223 (2)
Валин	0,543 (2)	0,834 (2)	1,152 (4)	—	0,986 (3)	1,267 (3)	—
Изолейцин	0,365 (1)	0,436 (1)	0,731 (3)	—	0,570 (2)	0,639 (1)	—
Лейцин	0,560 (2)	1,013 (3)	1,120 (4)	0,181 (1)	0,801 (3)	1,226 (3)	—
Тирозин	0,203 (1)	0,233 (1)	0,549 (2)	—	0,379 (1)	—	—
Фенилаланин	0,325 (1)	0,561 (1)	0,595 (2)	—	0,312 (1)	0,573 (1)	—
Гистидин	0,671 (3)	0,371 (1)	1,061 (4)	0,186 (1)	1,557 (5)	0,363 (1)	—
Лизин	1,563 (7)	0,900 (2)	0,932 (3)	0,238 (1)	0,805 (3)	0,945 (3)	0,181 (1)
Аргинин	0,295 (1)	0,607 (1)	0,269 (1)	0,151 (1)	0,909 (3)	0,690 (1)	0,126 (1)
M_r D	10 008	3949	14 025	3045	10 319	5549	1256
N-концевая аминокислота	Глицин	Глутамино- вая кис- лота	Глицин	Глицин	Лейцин	Аланин	Глицин

Примечание. Триптофан не определялся.

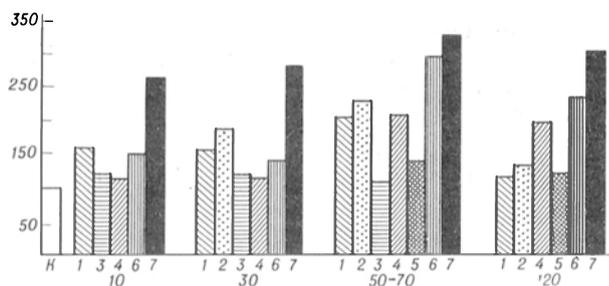


Рис. 3. Изменения коронароактивности под действием кардиоактивных белков предсердной и ушковой области сердца быка.

По оси абсцисс: время после введения белков, мин; по оси ординат — увеличение коронарного оттока за единицу времени, % от контроля. 1 — П-1А; 2 — П-1Б; 3 — П-1С; 4 — У-1; 5 — У-2А; 6 — У-2Б; 7 — У-2Б; К — контроль.

вуют. Не обнаружены в этом белке также и такие аминокислоты, как валин, метионин, пролин. Что касается 3 других предсердных белков, то различия в их составе носят в основном количественный характер. Из ушковых белков по аминокислотному составу особенно отличается 11-членный белок У-2Б.

В таблице приведены также результаты определения N-концевых аминокислот и молекулярная масса (M_r) искомым белков, рассчитанная по данным аминокислотного состава. Исследуемые белки весьма различались по M_r . Исходя из полученных данных, по-видимому, корректнее некоторые из исследуемых соединений считать скорее полипептидами (У-2Б=1255 Д; П-3=3044 Д; П-1Б=3948 Д). В свою очередь можно отметить сходство белков предсердия по N-концевой аминокислоте, которой является глицин, тогда как у ушковых белков N-концевыми аминокислотами оказались лейцин, аланин, глицин. УФ-спектр этих соединений характеризуется слабым поглощением в области 240—340 нм и не имеет максимумов в указанном диапазоне, что является следствием незначительного содержания ароматических аминокислот или полным их отсутствием (П-3 и У-1).

Величина активности исследуемых белков, определяемая по изменению коронарного оттока, была различной. При внутривенном введении от 2 до 5 мкг У-2А и У-2Б белки увеличивали коронарный отток примерно на 200 % и более (рис. 3). При этом отмечается увеличение коронарного оттока уже через 10 мин после введения препаратов, динамичное нарастание эффекта с характерным максимумом на 50—70-й минуте и продолжительностью действия до 3—4 ч. В отличие от ушковых белков белки П-1А и П-3, вводимые в дозе от 18 до 20 мкг, увеличивают коронарный отток примерно на 100 %. Белок П-1Б отличается тем, что увеличение коронарного оттока под действием этого белка наблюдается лишь на 30-й минуте после его введения, остальные коронарные эффекты предсердных белков сходны с таковыми ушковых белков. Данные, касающиеся действия этих белков на артериальное давление, свидетельствовали о том, что все описанные белки оказывают на него стабилизирующее действие.

Сопоставляя полученные данные, можно заключить, что эти расхождения связаны, по-видимому, со структурой данных белков. Однако поскольку их структура не выяснена, трудно сделать однозначные выводы относительно существования

множественных форм. Можно предположить, что в ходе выделения происходит частичное протолитическое расщепление более крупных молекул П-2 и У-2А. В этом случае появление множественных форм — артефакт метода выделения. Не исключено, что существование множественных форм есть результат различных путей процессинга предшествующих молекул. По-видимому, пептиды с разной длиной молекулы, обладающие кардиоактивностью, выполняют вполне определенные регуляторные функции в организме. В настоящее время мы пока не обладаем информацией о том, что происходит после связывания этих белков с такими полифункциональными соединениями, как С-подобные гормоны. Известно, что последние, кроме значительного увеличения коронарного оттока, влияют на сосудистый тонус и сердечную деятельность.

Эти эффекты могут развиваться за счет различных механизмов. Один из них — регуляция внутриклеточного уровня цАМФ — является достаточно изученным [2]. Вместе с тем имеются указания на то, что в реализации коронарорасширяющего эффекта этих соединений принимает участие Ca^{2+} , внутриклеточный уровень которого регулируется под их действием.

Представляют интерес данные об увеличении содержания кардиоактивных белков предсердия под действием гистамина и прозерина и, наоборот, полном их исчезновении в результате денервации сердца. Можно предположить, что в регуляции этого процесса могут принимать участие факторы, опосредованные ЦНС [10].

ЛИТЕРАТУРА

1. Галоян А. А. // Вопросы биохимии мозга. — Ереван, 1978. — Т. 13. — С. 9—37.
2. Галоян А. А., Гурвиц Б. Я., Погосян М. А. // Вопросы биохимии мозга. — Ереван, 1976. — Т. 11. — С. 89—97.
3. Галоян А. А., Ростомян М. А. // Биол. журн. Армении. — 1967. — Т. 20, № 9. — С. 3—7.
4. Мисирян С. С., Срапионян Р. М., Саркисян Ш. О. и др. // Там же. — № 7. — 1983. — Т. 36. — С. 706—709.
5. Срапионян Р. М., Галоян А. А. // Докл. АН АрмССР. — 1973. — Т. 46, № 3. — С. 174—178.
6. Срапионян Р. М., Мисирян С. С. // Биол. журн. Армении. — 1974. — Т. 26, № 6. — С. 88—89.
7. Срапионян Р. М., Мисирян С. С., Галоян А. А. // Вопросы биохимии мозга. — Ереван, 1975. — Т. 10. — С. 122—129.
8. Срапионян Р. М., Попова Т. В., Галоян А. А. // Биол. журн. Армении. — 1987. — Т. 15, № 7. — С. 588—590.
9. Davies B. J. // Ann. N. Y. Acad. Sci. — 1964. — Vol. 121. — P. 404—427.
10. Galoyan A. A. // Neurochem. Res. — 1986. — Vol. 11, N 6. — P. 769—787.

Поступила 12.05.89

IDENTIFICATION OF NEW CARDIOACTIVE PROTEINS IN BOVINE HEART TISSUE

T. V. Popova, R. M. Srapionyan, A. A. Galoyan

Institute of Biochemistry, Academy of Sciences of the Armenian SSR, Yerevan

Seven cardioactive polypeptides were identified in precardiac and auricular regions of bovine heart. Procedures used for purification of the polypeptides involved extraction of water-soluble proteins, fractionation by ammonium sulfate, gel filtration on Sephadex G-100, chromatography and rechromatography on DEAE cellulose. Some physico-chemical and biological properties were studied: amino acid composition, N-terminal amino acids, molecular mass and the effects on coronary blood vessels. The data obtained suggest that multiple forms of these proteins may exist either as a result of partial hydrolysis of large molecules or due to processing of precursors.

Ж. В. Шутенко, Д. В. Мейрена, И. Я. Калвиньш,
Э. Я. Лукевиц

ПОТЕНЦИРОВАНИЕ АНТИКЕТОГЕННОГО ДЕЙСТВИЯ ЭКЗОГЕННОЙ ГЛЮКОЗЫ С ПО- МОЩЬЮ НОВОГО ИНГИБИТОРА β -ОКИСЛЕ- НИЯ МИЛДРОНАТА — 3-(2,2,2-ТРИМЕТИЛ- ГИДРАЗИНИЙ)ПРОПИОНАТА

Институт органического синтеза АН Латвии, Рига

Ряд патологических состояний организма характеризуется усиленной мобилизацией липидов из жировых депо. Это может носить адаптационный характер (например при голодании), а также быть следствием глубоких метаболических расстройств. При этом происходит повышение скорости окисления жирных кислот на фоне подавления гликолиза. В результате описанных выше изменений в крови отмечается снижение концентрации глюкозы, лактата и пирувата наряду с увеличением количества свободных жирных кислот и кетоновых тел [2, 7—9, 12, 13, 15, 16, 20]. Введение экзогенной глюкозы голодающим крысам оказывает выраженное антикетогенное и антилиполитическое действие, способствуя увеличению соотношения инсулин/глюкагон и снижению уровня свободных жирных кислот в сыворотке крови [2]. Однако скорость гликолиза при этом не увеличивается, что связано с неспособностью экзогенной глюкозы восстанавливать сниженную при голодании концентрацию фруктозо-2,6-бисфосфата [6, 9].

Важным моментом в лечении ишемической болезни сердца и диабета является усиление гликолитической энергопродукции [14]. Одним из оправданных способов такого рода воздействия становится применение ингибиторов карнитинзависимого метаболизма [19, 22]. Ингибирование β -окисления длинноцепочечных жирных кислот приводит к предотвращению аккумуляции цитрата, усилению гликолиза на уровне фосфофруктокиназы, повышению активности пируватдегидрогеназного комплекса и уменьшению концентрации детергентных метаболитов жирных кислот (длинноцепочечных ацил-КоА и ацилкарнитина) в сердце, оказывающих как неспецифическое, так и специфическое повреждающее действие на кардиомиоциты [3, 5, 10, 22].

В настоящей работе проведено изучение влияния нового синтезированного в Институте органического синтеза АН Латвийской ССР ингиби-

тора карнитинзависимого метаболизма жирных кислот милдроната — 3-(2,2,2-триметилгидразиний)пропионата, являющегося структурным аналогом γ -бутиробетаина, на эффекты экзогенной глюкозы в отношении продукции кетоновых тел у сытых и голодающих в течение 48 ч крыс¹.

Методика. Опыты проводили на белых крысах-самцах массой 180—200 г, полученных из питомника Института органического синтеза АН Латвии. Животные содержались на стандартном рационе вивария. В течение 10 дней крысам перорально вводили милдронат в дозах 200 и 400 мг/кг. За 48 ч до окончания эксперимента животных переводили на режим голодания со свободным доступом к воде. Половине животных каждой группы (контрольной и получавшей милдронат) через 1 ч после последнего введения препарата и за 1 ч до забоя вводили перорально экзогенную глюкозу в дозе 2 г/кг. В каждой группе использовано по 10 крыс. Через 2 ч после последнего введения препарата крыс обезглавливали.

Реактивы. D-(—)- β -гидроксibuтиратдегидрогеназа ([R]-3-гидроксibuтанонат: НАД⁺ оксидоредуктаза; КФ 1.1.1.30) («Boehringer», ФРГ), трис-HCl, НАД («Reanal», Венгрия), кислоты и соли (ч. д. а).

Для определения β -гидроксibuтирата белки сыворотки осаждали 30 % HClO₄, нейтрализовали до pH 7,0 20 % KOH, центрифугировали (3000 об/мин, 10 мин) и использовали для определения нейтрализованный надосадок. Основу метода составляет ферментативная реакция превращения β -гидроксibuтирата в ацетоацетат, катализируемая D-(—)- β -гидроксibuтиратдегидрогеназой в присутствии НАД [21]. Измерение проводили на двухлучевом спектрофотометре («Hitachi 557», Япония). Для расчета конечной концентрации β -гидроксibuтирата в сыворотке крови использовали коэффициент экстинкции НАД · H₂ при длине волны 340 нм, равный 6,22 см²/мкмоль.

Для статистической обработки результатов применяли непараметрический U-критерий Вилкоксона — Манна — Уитни [1].

Результаты и обсуждение. При введении милдроната в курсовом режиме (200 и 400 мг/кг) отмечено зависимое от дозы повышение содержания β -гидроксibuтирата в сыворотке крови сытых крыс. Введение глюкозы за 1 ч до забоя угнетало стимулируемый милдронатом кетогенез. Применение препарата в дозе 200 мг/кг у сытых крыс потенцировало антикетогенное действие экзогенной глюкозы (см. таблицу). Усиление продукции кетоновых тел под влиянием милдроната в условиях содержания на стандартном рационе вивария с достаточным поступлением жиров может быть следствием компенсаторного усиления пероксисомального окисления жирных кислот. Повышение роли пероксисомального метаболизма характерно для ингибиторов β -окисления, в частности для клофибрата, и осуществляется

¹ Целесообразность данного исследования очевидна, так как с 1987 г. Фармакологическим комитетом СССР разрешено клиническое применение препарата «Милдронат» у взрослых в качестве кардиопротекторного и антиишемического средства.

Влияние курсового введения милдроната на содержание β -гидроксibuтирата в сыворотке крови сытых и голодающих в течение 48 ч крыс в условиях нагрузки глюкозой

№ группы	Условия эксперимента	β -гидроксibuтират, мкмоль/мл	
		сытые крысы	голодающие крысы
1	Контроль	0,07 (0,04—0,15)	1,77 (1,43—2,17)
2	Милдронат (200 мг/кг)	0,15 (0,10—0,20)	0,93 (0,81—1,04)*
3	Милдронат (400 мг/кг)	0,39 (0,28—0,51)*	0,78 (0,41—1,13)*
4	Глюкоза (2 г/кг)	0,06 (0,03—0,09)	0,72 (0,32—1,18)*
5	Милдронат (200 мг/кг) + глюкоза (2 г/кг)	0,03 (0,02—0,04)***	0,23 (0,07—0,39)***
6	Милдронат (400 мг/кг) + глюкоза (2 г/кг)	0,12 (0,07—0,17)**	0,22 (0,19—0,25)***

Примечание. Различия между сытыми и голодающими крысами во всех группах статистически значимы ($p < 0,05$): одна звездочка — по сравнению с 1-й группой; две — по сравнению со 2, 3 и 4-й группами.

на фоне усиления активности карнитинацилтрансфераз (в том числе карнитинацетилтрансферазы). Это в свою очередь способствует поддержанию на высоком уровне концентрации короткоцепочного ацилкарнитина и его β -окисления, идущего без образования детергентных длинноцепочных метаболитов жирных кислот [11, 17].

48-часовое голодание приводит к увеличению концентрации β -гидроксibuтирата в сыворотке крови крыс в 25,3 раза. Курсовое применение милдроната вызывает снижение содержания его в сыворотке крови, причем с увеличением дозы препарата до 400 мг/кг обнаруживается тенденция к большему снижению кетоновых тел. Под влиянием экзогенной глюкозы наблюдается угнетение стимулированного голоданием кетогенеза в 2,46 раза. Предварительное курсовое введение милдроната усиливает антикетогенное действие экзогенной глюкозы в среднем в 3 раза. Таким образом, потенцирование антикетогенного действия экзогенной глюкозы под влиянием милдроната весьма значительно.

Если воздействие препарата на продукцию кетоновых тел у голодающих крыс связано с его способностью ингибировать биосинтез карнитина из γ -бутиробетайна, снижать скорость метаболизма длинноцепочных жирных кислот и вызывать угнетение карнитинзависимого кетогенеза [18], то в случае с сытыми животными его влияние является следствием наложения двух механизмов действия: ингибирования карнитинзависимого кетогенеза и компенсаторной активации кетогенеза из карнитиннезависимых источников (короткоцепочечных жирных кислот).

Эффекты экзогенной глюкозы, обнаруженные в наших экспериментах, связаны, по всей видимости, с антилиполитическим ее действием, реализующимся через повышение уровня инсулина [2]. Ингибитор карнитинзависимого метаболизма милдронат способствует усилению метаболизма глюкозы [4], что является общим свойством известных ингибиторов карнитинзависимого окисления жирных кислот [5, 10, 22]. Основу данного эффекта составляет, по-видимому, предотвращение истощения запасов естественного активатора фосфофруктокиназы — фруктозо-2,6-бисфосфата [6], а также сохранение достаточно высокой скорости его биосинтеза в условиях подавления β -окисления длинноцепочечных жирных кислот. Активация гликолитического пути метаболизма глюкозы при использовании милдроната способствует потенцированию под его влиянием антикетогенного действия экзогенной глюкозы, причем, значительное воздействие препарата проявляется при патологическом состоянии организма. В данном случае это усиленная мобилизация липидов из жировых депо, вызванная 48-часовым голоданием.

Таким образом, в результате проведенного исследования установлено, что курсовое введение ингибитора карнитинзависимого метаболизма жирных кислот милдроната, угнетающего биосинтез карнитина из γ -бутиробетайна, потенцировало антикетогенное действие экзогенной глюкозы. Применение милдроната и других ингибиторов биосинтеза карнитина может иметь значение в случаях усиления продукции кетоновых тел по карни-

тинзависимому пути и снижения чувствительности метаболизма жирных кислот к глюкозе.

ЛИТЕРАТУРА

1. Гублер Е. Р., Генкин А. А. Применение непараметрических критериев статистики в медико-биологических исследованиях.— Л., 1973.
2. Ньюсхолм Э., Старт К. Регуляция метаболизма.— М., 1977.
3. Симкович Б. З., Мейрена Д. В., Хаги Х. Б. и др. // Фармакол. и токсикол.— 1987.— № 2.— С. 100.
4. Шугенко Ж. В. Регуляция метаболизма миокарда структурным аналогом γ -бутиробетайна — милдронатом: Автореф. дис. ... канд. биол. наук.— Тарту, 1988.
5. Eistetter K., Wolf H. P. O. // J. med. Chem.— 1982.— Vol. 25, N 2.— P. 109.
6. French T. J., Holness M. J., MacLennan P. A., Sugden M. C. // Biochem. J.— 1988.— Vol. 250, N 3.— P. 733.
7. Grautham B. D., Zammit V. A. // Biochem. J.— 1986.— Vol. 239, N 2.— P. 458.
8. Holness M. J., Sugden M. C. // Ibid.— 1987.— Vol. 247, N 3.— P. 627.
9. Holness M. J., MacLennan P. A., Palmer T. N., Sugden M. C. // Ibid.— 1988.— Vol. 252, N 2.— P. 325.
10. Korb H., Hoefl A., Hunneman D. H. et al. // Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol.— 1984.— Bd 327, N 1.— S. 70.
11. Markwell M. L. K., Bieber L. I., Tolbert N. E. // Biochem. Pharmacol.— 1977.— Vol. 26, N 18.— S. 1697.
12. Newgard D. B., Hirsch L. J., Foster D. W., McGarry J. D. // J. biol. Chem.— 1983.— Vol. 258, N 13.— P. 8046.
13. Newsholme E. A., Randle P. J. // Biochem. J.— 1964.— Vol. 93, N 3.— P. 641.
14. Opie L. H. // Drake-Holland A. J., Noble J. M. Cardiac Metabolism.— New York, 1983.— P. 279.
15. Randle P. J., Newsholme E. A., Garland P. B. // Biochem. J.— 1964.— Vol. 93, N 3.— P. 652.
16. Randle P. J. // Biochem. Soc. Trans.— 1986.— Vol. 14, N 5.— P. 799.
17. Reddy J. K., Kumar S. // J. Biochem.— 1979.— Vol. 85, N 3.— P. 847.
18. Simkhovich B. Z., Shutenko Zh. V., Meirena D. V. et al. // Biochem. Pharmacol.— 1988.— Vol. 37, N 2.— P. 195.
19. Stephens Th. W., Higgins A. J., Cook C. A., Harris R. A. // Biochem. J.— 1985.— Vol. 227, N 2.— P. 651.
20. Van Schaftingen E., Hers H.-G. // Biochem. biophys. Res. Commun.— 1981.— Vol. 101, N 3.— P. 1078.
21. Williamson D. H., Mellanby J. // Methods of Enzymatic Analysis / Ed. H. U. Bergmeyer.— Weinheim, 1965.— Vol. 1.— P. 459.
22. Wolf H. P. O., Engel D. W. // Europ. J. Biochem.— 1985.— Vol. 146, N 2.— P. 359.

Поступила 16.02.90

POTENTIATION OF THE ANTIKETOGENIC EFFECT OF EXOGENOUS GLUCOSE BY MEANS OF MILDRONATE, THE NOVEL INHIBITOR OF β -OXIDATION

Zh. V. Shutenko, D. V. Meirena, I. J. Kalvins, E. Ya. Lukevics
Institute of Organic Synthesis, Academy of Sciences of the Latvian SSR, Riga

Antiketogenic effect of exogenous glucose (2 g/kg, per os, 1 hr before death) was potentiated after preadministration of mildronate 3-(2,2,2-trimethylhydrazinium)propionate into rats either kept on usual ration or fasting within 48 hrs at a dose of 200 and 400 mg/kg, per os, during 10 days. Mildronate is inhibitor of carnitine-dependent metabolism of fatty acids affecting at the step of γ -butyrobetaine turnover into carnitine. The drug inhibitory influence studied appears to be realized via activation of the glycolytic pathway of glucose metabolism specific for inhibitors of β -oxidation.

В. Д. Пасечников, А. О. Вирганский

РОЛЬ ЦИКЛИЧЕСКИХ НУКЛЕОТИДОВ В АДАПТАЦИИ К ГИПОКСИИ СЛИЗИСТОЙ ОБОЛОЧКИ ЖЕЛУДКА

Ставропольский медицинский институт

Одним из механизмов биохимической адаптации является мобилизация резервов организма путем поддержания скорости и направления метаболических процессов в соответствии с потребностями организма и их изменениями в зависимости от условий среды [17]. Известно, что в процессе адаптации организма к действию гипоксии большую роль играет функциональная активность аденилат- и гуанилатциклазных (АЦ и ГЦ) систем [1, 4].

В последнее время регионарная гипоксия слизистой оболочки желудка (СОЖ) рассматривается как важный фактор ульцерогенеза [21].

Целью настоящей работы явилось изучение функционального состояния циклазных систем при различных условиях кислородного обеспечения СОЖ у больных язвенной болезнью желудка (ЯБЖ) и здоровых лиц.

Методика. Обследовано 30 больных ЯБЖ в стадии обострения и начинающейся ремиссии. Измерение pO_2 в перилульцерозной зоне СОЖ проводили полярографическим методом с помощью открытого платинового микроэлектрода (диаметр 0,1 мм) и хлорсеребряного электрода. Платиновый микроэлектрод помещали в биопсийный канал фиброгастродуоденоскопа, измерения проводили под визуальным контролем. Перед исследованием и после него проводили калибровку электрода нулевым раствором и раствором, уравновешенным с атмосферным воздухом [3].

В биопсийных образцах перилульцерозной зоны СОЖ исследовали активность АЦ и ГЦ по изменению концентрации циклических нуклеотидов (ЦН) в средах инкубации [9, 22] за 30 мин при 37 °С. Концентрацию ЦН определяли радиоиммунологическим методом, используя тест-наборы фирмы «Amersham», Великобритания. Количество ЦН и активность циклаз пересчитывали на 1 мг белка гомогената. Белок определяли по Лоури.

Контрольную группу составили 20 человек с практически неизменной по эндоскопическим критериям СОЖ, в которой проводились аналогичные измерения изучаемых показателей.

Все цифровые показатели обработаны с использованием статистических методов, включающих исключение случайных величин по критерию Шовене и оценку достоверности по критерию Стьюдента [8].

Результаты и обсуждение. Исследования показали, что в перилульцерозной зоне СОЖ напряжение кислорода (pO_2) оказалось значительно ниже показателей в интактной зоне с соответственно $29,90 \pm 2,35$ и $51,0 \pm 3,60$ мм рт. ст.; $p < 0,05$). В зоне формирующегося рубца pO_2 достигло показателей интактной СОЖ и составило $52,62 \pm 1,40$ мм рт. ст., $p > 0,05$.

В то же время в ткани перилульцерозной СОЖ отмечалась активация ГЦ и депрессия активности АЦ, приводившие к накоплению цГМФ и снижению коэффициента цАМФ/цГМФ (активность ГЦ — $16,35 \pm 1,20$ пмоль цГМФ за 30 мин на 1 мг белка, АЦ — $36,79 \pm 3,38$ пмоль цАМФ за 30 мин на 1 мг белка, цАМФ/цГМФ — $0,99 \pm 0,02$; в контрольной группе соответственно $9,2 \pm 1,41$, $129,3 \pm 28,64$, $3,2 \pm 0,7$; $p_{1-3} < 0,05$). В процессе зажив-

ления язвенного дефекта в СОЖ формирующегося рубца активность АЦ достоверно увеличилась в сравнении с перилульцерозной зоной ($58,56 \pm 5,21$ пмоль цАМФ за 30 мин на 1 мг белка; $p < 0,05$). В то же время активность ГЦ в формирующемся рубце достоверно уменьшилась в сравнении с перилульцерозной слизистой ($13,00 \pm 1,13$ пмоль цГМФ за 30 мин на 1 мг белка; $p < 0,05$). Существенно, что увеличение активности АЦ и снижение активности ГЦ при заживлении язвенного дефекта привели к выравниванию соотношения цАМФ/цГМФ ($2,7 \pm 0,28$; $p < 0,05$ в сравнении с контрольной группой).

Таким образом, полученные результаты свидетельствуют об одностороннем изменении активности циклаз в СОЖ при изменении обеспеченности кислородом. Так, при гипоксии СОЖ увеличивалась активность ГЦ и снижалась — АЦ, при возврате к нормоксии наблюдались реципрокные изменения активности циклаз.

Вероятно, выявленная закономерность изменения активности соответствующих циклаз, соотношения ЦН при меняющихся условиях кислородного режима СОЖ отражает один из центральных механизмов адаптации клеток и организма в целом в ответ на действие гипоксического фактора.

Роль циклических нуклеотидов в адаптации различных органов и тканей к гипоксии сводится к перестройке адрено- и холинергических механизмов в формировании реакции ткани на недостаточность кислорода. Так, уменьшение активности АЦ и синтеза цАМФ (медиатора симпатической нервной системы) увеличивает выживаемость животных в условиях гипоксии. С другой стороны, повышение активности ГЦ и соответственно увеличение синтеза цГМФ (медиатора парасимпатической нервной системы) рассматриваются как естественный адаптивный механизм, позволяющий клетке приспособиться к условиям гипоксии посредством активации цГМФ-зависимых реакций метаболизма [1, 14].

При гипоксии СОЖ в эксперименте получены данные о фазном характере изменения количества ЦН: увеличение цАМФ в первые минуты гипоксии сменялось его снижением вплоть до 24 ч после введения норадреналина [5]. В то же время количество цГМФ снизилось, но через 3—6 ч значительно превысило исходный уровень. Соотношение цАМФ/цГМФ через 3—6 ч оказалось сниженным и оставалось таковым даже спустя сутки после введения катехоламинов.

Совершенно очевидным является факт стимуляции образования свободных радикалов в СОЖ при действии механизма «гипоксия — восстановление кровотока» [21, 23]. Установлено, что при увеличении общего кровотока СОЖ [18] в перилульцерозной зоне отмечается его снижение [16]. Активация ксантиноксидазы в ишемизированной ткани СОЖ [21] и дегградация АТФ до гипоксантина [11] способствуют образованию свободных радикалов — O_2 , H_2O_2 , OH и перекисей липидов [21, 23] при восстановлении кровотока коллатеральным путем или в результате реперфузии [13]. Нами показана реакция антиокислительной системы СОЖ, приводящая в этих условиях к формированию адаптивных реакций первого порядка — функций обезвреживания или разрушения потенциально вредных для клетки веществ.

В силу неадекватности этого механизма и, возможно, в связи с падением уровня других тканевых антиокислителей, блокированием путей восстановления их окисленных форм и др. происходит «срыв» функциональной активности антиокислительной системы, что способствует накоплению в СОЖ кислородных радикалов и перекисей липидов [6].

В этих условиях выявленное [6] повышение активности супероксиддисмутазы (СОД) и снижение активности глутатионпероксидазы, вероятно, модулирует другую адаптивную реакцию — перестройку функциональной активности циклазных систем. Убедительно показана физиологическая роль СОД как регулятора функции ГЦ [19]. Доказано также, что образующийся в ходе рекомбинации O_2 и H_2O_2 гидроксильный радикал стимулирует активность ГЦ непосредственно и посредством гидроперекисей липидов [15, 19].

По-видимому, снижение активности АЦ в условиях гипоксии также модулируется ферментами. Показано, что механизмы «гипоксия — реперфузия» также стимулируют активность тканевых фосфолипаз, гидролизующих фосфолипиды клеточных мембран до ненасыщенных жирных кислот [20]. Последние обладают способностью депрессировать активность АЦ [10].

Снижение активности АЦ также может быть обусловлено деградацией субстрата (АТФ) и, кроме того, способностью продукта распада АТФ (аденозина) депрессировать ее деятельность [12].

Следует отметить, что, несмотря на явную позитивную направленность реакций ферментов, в СОЖ происходят процессы, явно выходящие за рамки адаптивных. Речь идет о лабилизации лизосомальных мембран, происходящей вследствие снижения коэффициента цАМФ/цГМФ, приводящей к выходу кислых гидролаз в СОЖ и проявлению их деструктивного действия [5, 7].

Вероятно, такая последовательность биохимических процессов, приводящая к активации ГЦ в клетках СОЖ периульцерозной зоны, являясь по сути патологической реакцией, по форме отражает и позитивные (адаптивные) изменения метаболизма. Возможно, что цГМФ, являясь выраженным митогеном [14], интенсифицирует процессы репарации (в частности, раневых поверхностей) путем активации синтеза коллагена, мобилизации энергетических ресурсов [2]. Смена акцентов (уменьшение концентрации цАМФ и увеличение — цГМФ) при развивающейся регионарной гипоксии периульцерозной зоны еще раз наглядно, на наш взгляд, демонстрирует уникальность механизмов адаптации, направленных на сохранение интенсивности клеточной пролиферации при изменившихся условиях (дефицит макроэргов, снижение pO_2).

Таким образом, определение активности ферментов циклазной системы в СОЖ может служить информативным показателем, отражающим как состояние кислородного гомеостаза, так и адаптивные возможности тканей в динамике ответной реакции организма на действие гипоксического фактора.

ЛИТЕРАТУРА

1. Буравкова Л. Б. Циклические нуклеотиды и энергообмен тканей при действии некоторых факторов космического

полета: Автореф. дис. ... канд. мед. наук. — М., 1979.

2. Зайденберг М. А., Коробкина Р. П., Пособа И. М. и др. // Вопр. мед. химии. — 1980. — № 6. — С. 770—774.
3. Коваленко Е. А., Березовский В. А., Эпштейн И. М. Полярнографическое определение кислорода в организме. — М., 1975.
4. Кожемьякин Л. А., Коростовцев Д. С., Королева Т. П. // Циклические нуклеотиды. — М., 1979. — С. 92—135.
5. Логинов А. С., Белостоцкий Н. И., Амиров Н. III. // Бюл. экпер. биол. — 1988. — № 8. — С. 149—151.
6. Пасечников В. Д., Мосин В. И., Виргенский А. О. // Тер. арх. — 1988. — № 2. — С. 30—33.
7. Пасечников В. Д. // Вопр. мед. химии. — 1989. — № 3. — С. 51—54.
8. Сенеглаев Д. Статистические методы в научных медицинских исследованиях. — М., 1968.
9. Becker M., Ruoff H. J. // Digestion. — 1982. — Vol. 23. — P. 194—200.
10. Craven P. A., De Rubertis F. R. // Metabolism. — 1982. — Vol. 31. — P. 103—116.
11. Cunningham S. K., Keaveny I. V. // Irish. J. med. Sci. — 1977. — Vol. 146. — P. 136—143.
12. Daly J. W. // J. med. Chem. — 1982. — Vol. 25, N 3. — P. 197—207.
13. Fridovich I. // Science. — 1978. — Vol. 201. — P. 875—880.
14. Haddox M. K., Furcht L. T., Gentry S. R. et al. // Nature. — 1976. — Vol. 262. — P. 146—148.
15. Hidaka H., Asano T. // Proc. nat. Acad. Sci. USA. — 1977. — Vol. 74. — P. 3657—3661.
16. Hiramatsu A., Tateiva J., Sasakawa M. et al. // Scand. J. Gastroent. — 1982. — Vol. 17. — P. 23.
17. Hochachka P. W., Somero G. N. Biochemical Adaptation. Princeton University Press, 1984.
18. Kamada T., Kawano S., Sato N. et al. // Scand. J. Gastroent. — 1983. — Vol. 84, N 6. — P. 1541—1546.
19. Mittal Ch., Murad F. // Proc. nat. Acad. Sci. USA. — 1977. — Vol. 74, Pt 4. — P. 4360—4364.
20. Otamiri T., Frauenz L., Lindmark D., Tagesson C. // Gut. — 1987. — Vol. 28. — P. 1445—1453.
21. Perry M. A., Wadhwa A., Parks D. et al. // Gastroenterology. — 1986. — Vol. 90. — P. 362—367.
22. Sung C. P., Jenkins B. C., Burns L. R. et al. // Amer. J. Physiol. — 1973. — Vol. 225. — P. 1359—1363.
23. Yoshida N., Yoshikawa T., Naito Y. et al. // Gastroenterology. — 1988. — Vol. 94, N 5. — Pt 2. — P. A 512.

Поступила 24.11.89

ROLE OF CYCLIC NUCLEOTIDES IN ADAPTATION OF GASTRIC MUCOSAL MEMBRANE TO HYPOXIA

V. D. Pasechnikov, A. O. Virgansky

Medical School, Stavropol

State of oxygen consumption in gastric mucosal membrane evaluated by means of pO_2 measurement as well as metabolism of cyclic nucleotides were studied in patients with ulcerous disease. Hypoxia of periulcerous area and alterations in functional activity of the cyclase systems were detected. Reciprocal alterations in the cyclases activity, as a result of which the ratio of cyclic nucleotides was changed under dissimilar conditions of oxygen consumption in gastric mucosal membrane, were considered as essential adaptive reaction related to maintenance of proliferation under conditions of oxygen and energy rich substances deficiency.

В. Г. Амаатуни, А. К. Захарян

СОПРЯЖЕННОСТЬ ИЗМЕНЕНИЙ КАТЕХОЛАМИНОВ, ТИОЛОВЫХ СОЕДИНЕНИЙ И ПЕРЕКИСНОГО ОКИСЛЕНИЯ ЛИПИДОВ ПРИ БРОНХИАЛЬНОЙ АСТМЕ

Ереванский медицинский институт

Изменения в обмене катехоламинов (КА) играют существенную роль в развитии бронхиальной астмы (БА). Высокая концентрация адреналина (А) вызывает активацию перекисного окисления липидов (ПОЛ), связанную с его жиромобилизирующей функцией и образованием супероксидного аниона при хиноидном окислении А [16]. Повышение содержания КА наблюдается в фазе обострения, во время приступа БА и даже при длительном астматическом состоянии [6, 12, 13, 14]. Есть исследования [11], в которых отмечается снижение концентрации КА в крови во время приступа.

Одним из факторов патогенеза БА является усиление ПОЛ [1], приводящее к деструкции липидного бислоя мембран, нарушению мембранной проницаемости, деятельности важнейших ферментов и изменению функционального состояния мембранно-рецепторного комплекса. Тиоловые же соединения, входя в состав липопротеиновых комплексов мембранных структур, участвуют в стабилизации и повышении резистентности клеточных мембран к повреждающему действию липидных перекисей [9]. Они также предохраняют А от окисления [7]. В свою очередь А активирует тиоловые ферменты, в частности аденилатциклазу, активность которой зависит от концентрации SH-групп [20].

Цель настоящего исследования — изучение концентрации в крови КА (адреналина и норадреналина — НА), содержания тиоловых групп (общих и небелковых), α -токоферола, фермента супероксиддисмутазы (СОД) и ПОЛ мембранных в сопоставлении друг с другом и рядом клинических и функциональных показателей у больных атоической и инфекционно-зависимой БА, а также хроническим астматическим бронхитом (ХАБ) в различные фазы заболевания.

Методика. Обследованы 34 больных ХАБ и 132 больных БА в возрасте от 20 до 60 лет. На основании клинико-лабораторного, аллергологического и функционального исследования больные были распределены по форме, степени тяжести и фазе заболевания. Атоическая форма БА легкого течения (АБА₁) имела место у 24, инфекционно-зависимая (ИЗБА) — у 108 больных. У 21 пациента заболевание было легкого течения (ИЗБА₁), у 34 — средней тяжести (ИЗБА₂), у 23 — тяжелого течения (ИЗБА₃). 17 больных находились в периоде астматического приступа, 13 — в астматическом состоянии. Контрольную группу здоровых составили 20 человек.

Мы определяли содержание в крови уровня А и НА путем окисления феррицианидом калия при различных рН с последующим измерением флуоресценции на флуоресцентном спектрофотометре фирмы «Hitachi» при длинах волн 540 и 520 нм. Содержание А и НА выражали в микрограммах (мкг) на 1 л крови [14]. Скорость ПОЛ в мембранах эритроцитов определяли, измеряя количество образовавшегося малонового диальдегида (МДА) по его реакции с тиобарби-

туровой кислотой (максимум поглощения комплекса при 535 нм). Скорость окисления выражали в наномолях на 1 мг белка [4]. Содержание SH-групп в цельной и депротеинизированной крови определяли после образования меркаптида в результате взаимодействия п-хлормеркурибензоата с SH-соединениями с возрастанием оптической плотности раствора (максимум поглощения при 255 нм). Содержание SH-групп выражали в мг % [8]. Определение содержания α -токоферола в плазме крови проводили по методу D. Duggan [18] на флуоресцентном спектрофотометре фирмы «Hitachi» (максимум флуоресценции при 330 нм) и выражали в микромолях вещества на 100 мл плазмы. Определение активности СОД в эритроцитах проводили методом, основанным на измерении степени торможения скорости изменения окраски нитротетразолия синего [21]. Активность СОД выражали в единицах на 1 мл крови. Результаты обрабатывали методом вариационной статистики с использованием критерия Стьюдента.

Результаты и их обсуждение. Исследования показали (табл. 1) достоверное увеличение содержания в крови А и НА у больных при всех формах БА в межприступном периоде и ХАБ, которое тем значительнее, чем тяжелее заболевание. В состоянии астматического приступа содержание А и НА увеличивается еще больше, достигая максимальных величин ($3,10 \pm 0,15$ мкг/л, $p < 0,001$ и $1,16 \pm 0,09$ мкг/л, $p < 0,001$). В астматическом состоянии содержание А достоверно снижается до нормы, а НА — до уровня на 42 % ниже контроля. В фазе ремиссии уровень КА снижается, причем содержание А все еще остается выше контрольной величины на 58—100 %, а НА достигает нормы. Содержание А у больных всех групп независимо от фазы заболевания увеличивается несколько больше, чем НА. В связи с этим величина коэффициента НА/А, равная в норме $1,73 \pm 0,07$, достоверно снижается у больных: примерно в равной степени у больных ХАБ и АБА₁ ($0,83$ — $0,93$) и значительно больше у больных ИЗБА₁₋₃ в межприступном периоде ($0,43$ — $0,38$). В состоянии приступа коэффициент НА/А выше ($0,57$), чем вне приступа ($0,38$), а при астматическом состоянии коэффициент выше ($0,84$), чем во время приступа ($0,57$).

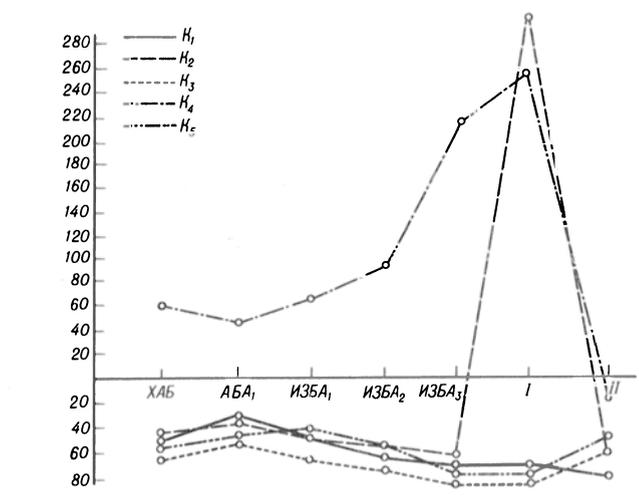
Независимо от формы и тяжести БА в фазе обострения содержание как общих, так и небелковых тиоловых групп заметно ниже, чем в фазе полной или неполной ремиссии, наступающей после курса лечения, причем степень ее тем больше, чем тяжелее течение болезни. Самый низкий уровень общих (SH₁) и небелковых (SH₂) тиоловых групп наблюдается у больных в состоянии астматического приступа ($20,24 \pm 2,3$ и $2,5 \pm 0,3$ мг %; $p < 0,001$). В астматическом же состоянии содержание тиоловых групп было достоверно выше контрольных величин (SH₁ на 32 %, SH₂ на 51 %). В литературе [5] также показано увеличение уровня КА в состоянии приступа, после него и в межприступном периоде при одновременном снижении SH-групп в крови. О роли антиоксидантной защиты в предупреждении повреждающего действия свободных радикалов — перекисей ненасыщенных жирных кислот свидетельствуют данные о состоянии других антиоксидантов при БА [1—3].

При изучении изменений в системе ПОЛ — антиокислительная активность крови (АОА) важна не столько оценка абсолютных величин отдельных показателей, сколько соотношение α -токоферола, активности СОД, общих и небелковых тио-

Таблица 1
Изменение содержания катехоламинов (в мкг/л), интенсивности ПОЛ (в нмоль/мг белка) и тиоловых групп (в мг %) у больных ХАБ и БА в различных фазах заболевания

Форма заболевания	Число больных	Средние значения показателей	Фаза обострения						Фаза ремиссии					
			A	HA	HA/A	ПОЛ	SH ₁	SH ₂	A	HA	HA/A	ПОЛ	SH ₁	SH ₂
ХАБ	34	M ± m 0,70 ± 0,04*** % отклонения от контроля 176	0,58 ± 0,04**	0,83 ± 0,02*	6,61 ± 0,22***	35,07 ± 1,7***	2,97 ± 0,26***	0,56 ± 0,02*	0,48 ± 0,01	0,90 ± 0,03*	6,65 ± 0,15*	59,46 ± 2,5	5,00 ± 0,37	
БА ₁	24	M ± m 0,60 ± 0,07* % отклонения от контроля 93	0,34 ± 0,03	0,93 ± 0,04***	4,91 ± 0,2*	38,36 ± 1,6***	2,91 ± 0,50***	80	-10	-48	72	0	2	
ИЗБА ₁	21	M ± m 1,5 ± 0,04*** % отклонения от контроля 393	0,64 ± 0,03***	0,43 ± 0,02***	7,83 ± 2,1***	35,03 ± 2,1***	3,05 ± 1,22***	0,49 ± 0,01*	0,51 ± 0,01	1,05 ± 0,03*	4,17 ± 0,01*	62,2 ± 1,3	4,61 ± 0,42	
ИЗБА ₂	34	M ± m 1,80 ± 0,02*** % отклонения от контроля 480	0,76 ± 0,02***	0,42 ± 0,008***	8,96 ± 0,11***	32,05 ± 1,7***	3,78 ± 1,32***	0,59 ± 0,02*	0,53 ± 0,02	0,90 ± 0,02*	6,5 ± 0,2*	63,2 ± 2,3	5,97 ± 0,27	
ИЗБА ₃	23	M ± m 2,07 ± 0,04*** % отклонения от контроля 567	0,79 ± 0,01***	0,38 ± 0,01***	10,17 ± 0,21***	21,86 ± 2,1***	2,81 ± 0,27***	0,62 ± 0,008*	0,62 ± 0,02	0,99 ± 0,03*	7,13 ± 0,13*	58,0 ± 2,2	5,67 ± 0,26	
Астматический приступ	17	M ± m 3,10 ± 0,15* % отклонения от контроля 900	1,16 ± 0,09*	0,57 ± 0,05*	12,33 ± 0,20*	20,14 ± 2,3*	2,5 ± 0,3*	0,62 ± 0,01*	0,56 ± 0,01	0,90 ± 0,02*	7,8 ± 0,14*	57,00 ± 2,3	5,10 ± 0,30	
Астматическое состояние	13	M ± m 0,39 ± 0,03* % отклонения от контроля 26	0,31 ± 0,03*	0,84 ± 0,08*	14,56 ± 0,28*	78,27 ± 5,9*	7,5 ± 1,8	100	17	-43	85	-0,4	14	
Контроль	20	M ± m 0,31 ± 0,01	0,53 ± 0,03	1,73 ± 0,07	3,92 ± 0,22	59,07 ± 1,88	4,95 ± 0,4	90	6	-48	103	-4	3	

Примечание. Одна звездочка — средние величины, достоверно отличающиеся от показателей при астматическом приступе (p < 0,05), две — от показателей в фазе ремиссии (p < 0,05). Подчеркнуты средние величины, достоверно отличающиеся от показателей при астматическом приступе (p < 0,05).



Соотношение показателей АОА и ПОЛ в крови больных БА и ХАБ.
K₁ — α-токоферол/ПОЛ; K₂ — СОД/ПОЛ·100; K₃ — SH₁/ПОЛ·10; K₄ — SH₂/ПОЛ; K₅ — СОД/SH₁·10. По оси абсцисс — форма и степень тяжести заболевания; I — астматический приступ, II — астматическое состояние; по оси ординат — степень отклонения от контроля (в %).

ловых групп к уровню ПОЛ. Они представлены в виде 4 коэффициентов (K — 1, 2, 3, 4), отражающих соответствие АОА крови к уровню ПОЛ и, следовательно, компенсированность метаболической системы ПОЛ — АОА (α-токоферол/ПОЛ, СОД/ПОЛ·100, SH₁/ПОЛ·10, SH₂/ПОЛ). На рисунке видно, что при всех формах БА величины всех 4 К ниже, чем в контрольной группе, причем тем значительнее, чем тяжелее форма заболевания. Наибольшее уменьшение величин K₁ и K₂ в астматическом состоянии (на 77 и 70 %) происходит одновременно со значительным увеличением K₃ и K₄ (на 160 и 116 %) по сравнению с астматическим приступом, что обусловлено относительно большим увеличением содержания общих и небелковых тиоловых групп по сравнению с усилением ПОЛ. В состоянии астматического приступа «компенсация» резко возросшего ПОЛ осуществляется СОД, активность которой значительно (в 4 раза) превосходит контрольную величину. В астматическом состоянии при резко выраженной недостаточности α-токоферола антирадикальную защиту осуществляют тиоловые соединения. Сопоставление приведенных данных показывает, что постепенная интенсификация ПОЛ от ИЗБА₁ до ИЗБА₃ и состояния астматического приступа происходит одновременно с приростом А и, очевидно, им в значительной степени обусловлено [16] с той, однако, разницей, что в межприступном периоде с утяжелением заболевания нарастает дефицит всей антиокислительной системы, а в критической стрессорной ситуации приступа большее нарастание ПОЛ ограничивается значительной активацией СОД. При астматическом же состоянии в связи с развитием фазы декомпенсации стресс-реакции со снижением содержания А до нормы еще большая интенсификация ПОЛ уже не связана с гипердреналиемией, а может быть следствием глубокой депрессии всей системы антирадикальной защиты, в особенности активности СОД. Очевидно, одним из важных механизмов перехода астматического приступа в астматическое состояние является резкое снижение активности СОД. Одно-

временно заметное увеличение тиоловых соединений в крови позволяет предложить расчет соотношения между активностью СОД и содержанием общих (SH₁) тиоловых групп в качестве коэффициента K₅ (СОД/SH₁·10), характеризующего переход астматического приступа в астматическое состояние. Как видно на рисунке, при всех формах БА величина K₅ выше нормы: у больных АБА₁ на 42 %, ИЗБА₁ — на 60 %, ИЗБА₂ — на 82 %, ИЗБА₃ — на 206 %. Во время астматического приступа величина K превосходит контроль на 250 %, в астматическом же состоянии I степени происходит резкое снижение K₅ ниже контрольных величин на 21 %.

Индивидуальный анализ изменений предлагаемого K показал, что при значениях его от 0,30 до 0,65 следует диагностировать БА легкого течения в стадии обострения и активность патологического процесса I степени, при значениях K₅ от 0,66 до 0,90 — БА средней тяжести и активность патологического процесса II степени, при значениях от 0,91 до 1,16 — БА тяжелого течения и активность патологического процесса III степени, при значениях выше 1,19 — астматический приступ. Опасность развития астматического состояния возникает тогда, когда при непрекращающемся удущем и неэффективности бронхолитических препаратов величина коэффициента СОД/SH₁·10 резко снижается до нормального уровня (0,33±0,008) и ниже.

Избыток КА в крови приводит к значительному усилению ПОЛ. На нашем материале (табл. 2) это видно по наличию высокой прямой корреляционной связи между содержанием А и НА, с одной стороны, и уровнем ПОЛ — с другой, при всех формах и степенях тяжести заболевания ($r=0,70-0,92$). Однако увеличение их происходит непропорционально. У всех больных как БА (за исключением астматического состояния), так и ХАБ соотношение между А и ПОЛ (А·10/ПОЛ) в межприступном периоде в фазе обострения достоверно выше нормы и тем значительнее, чем тяжелее заболевание (на 63–224 %), достигая наибольшего увеличения в состоянии астматического приступа (на 297 %). В астматическом же состоянии высокая обратная корреляция между А и ПОЛ ($r=-0,92$) и наиболее низкие величины коэффициента А·10/ПОЛ связаны с резким относительным снижением содержания КА и резким увеличением ПОЛ, обусловленным также

глубокой депрессией антирадикальной защиты за счет α-токоферола и СОД [1].

При значениях К А·10/ПОЛ от 0,40 до 1,30 следует диагностировать хронический астматический бронхит в фазе обострения; при увеличении выше 1,30 у больных ХАБ возникает угроза перехода его в БА; при резком снижении значений К у больных БА в состоянии астматического приступа до нормальных величин (0,63±0,08) и ниже и неэффективности бронхолитических препаратов диагностируется угроза развития астматического состояния: при астматическом состоянии величина коэффициента колеблется от 0,15 до 0,55. Граничные значения коэффициента А×10/ПОЛ в астматическом состоянии находятся в зоне ниже контрольной величины и резко выделяются от граничных значений при астматическом приступе (от 2,18 и выше), находясь в зоне, значительно превышающей контроль. Очевидно, определение К А·10/ПОЛ может внести определенную коррекцию в дифференциальную диагностику ХАБ и БА, установления угрозы перехода астматического приступа в астматическое состояние, что позволит своевременно определить правильную тактику лечебно-профилактических мер в отношении этих больных.

Если рассматривать приведенные данные с позиций адаптационного синдрома с учетом того, что повышенное содержание КА вызывает такие благоприятные изменения у больных БА, как понижение функциональной активности тучных клеток, активацию синтеза простагландинов группы E [19], понижение тонуса гладких мышц бронхов, разжижение бронхиальной слизи, усиление деятельности реснитчатого эпителия [22], а также функции Т-супрессоров [17], то повышение содержания А в сыворотке крови по мере утяжеления инфекционно-зависимой БА и при возникновении астматического приступа следует интерпретировать как компенсаторную реакцию. Резкое снижение его концентрации при переходе приступа в астматическое состояние I степени, следовательно, является одним из ранних признаков фазы истощения. Прямая корреляционная связь изменений ПОЛ мембран эритроцитов и уровня А в крови вплоть до астматического состояния может указывать на образование в этих случаях супероксидных радикалов. Резкое снижение содержания А в астматическом состоянии при дальнейшем значительном усилении ПОЛ, очевидно, сле-

Таблица 2

Соотношение содержания А и НА к уровню ПОЛ в крови больных ХАБ и БА в фазе обострения (M±m)

Форма заболевания	Число обследованных	А·10/ПОЛ	% отклонения от контроля	r корреляции А и ПОЛ	НА·10/ПОЛ	% отклонения от контроля	r корреляции НА и ПОЛ
ХАБ	34	1,03±0,02*	63	0,78	1,04±0,21	-18	0,77
АБА ₁	24	1,19±0,05*	89	0,92	0,91±0,11*	-28	0,86
ИЗБА ₁	21	1,95±0,04*	209	0,72	0,62±0,12*	-51	0,78
ИЗБА ₂	34	2,01±0,01*	219	0,88	0,78±0,10*	-38	0,84
ИЗБА ₃	23	2,04±0,01*	224	0,87	0,88±0,18	-30	0,70
Астматический приступ	17	2,50±0,08*	297	0,75	1,10±0,12	-13	0,84
Астматическое состояние	13	0,27±0,03*	-57	-0,92	0,25±0,02*	-80	-0,82
Контроль	8	0,63±0,08		0,56	1,26±0,1		0,89

Примечание. Звездочка — средние величины, достоверно отличающиеся от показателей у здоровых ($p<0,05$).

дует поставить в связь с продолжающейся инициацией новых цепей свободнорадикального окисления, вызванной глубокой депрессией АОА: ферментов СОД, каталазы, пероксидазы и α -токоферола [1—3]. При этом в антирадикальной защите начинают принимать участие тиоловые соединения, значительный прирост которых становится возможным благодаря резкому снижению синтеза А и возможного образования его метаболитов — адренохрома и адреноксина, окисляющих SH-группы ферментов и тиоловых соединений, участвующих в реализации адренергических реакций [10]. Наш опыт изучения приведенных выше коэффициентов позволяет считать их более информативными, чем предложенные ранее критерии [1, 2] перехода ХАБ в БА и угрозы развития астматического состояния.

ЛИТЕРАТУРА

1. Амагуни В. Г., Карагезян К. Г., Сафарян М. Д. // Тер. арх.— 1980.— № 3.— С. 96—100.
2. Амагуни В. Г., Сафарян М. Д. // Там же.— 1984.— № 8.— С. 81—85.
3. Амагуни В. Г., Сафарян М. Д. // Там же.— 1986.— № 4.— С. 23—25.
4. Владимиров Ю. А., Арчаков А. И. Перекисное окисление липидов в биологических мембранах.— М., 1972.
5. Катаев К. В. // Тер. арх.— 1976.— № 2.— С. 100—103.
6. Колесов Д. В., Фролов Е. П., Лукачева Т. И. // Педиатрия.— 1968.— № 9.— С. 43.
7. Манцхин Б. П. Физиология адренорецепторов.— М., 1968.
8. Рубин Х. М., Романчук Л. А. // Вопр. мед. химии.— 1961.— Т. 7, вып. 6.— С. 652—655.
9. Соколовский В. В., Атянина Т. Ф., Сорокин А. И. // Докл. АН СССР.— 1973.— Т. 209, № 3.— С. 738—741.
10. Трахтенберг И. М., Савицкий И. В., Тринус Ф. П. // Укр. журн.— Киев, 1963.— Т. 9, № 6.— С. 748—751.
11. Тузиков В. Г. // Казан. мед. журн.— 1962.— № 4.— С. 11—14.
12. Тюрин П. А. Бронхиальная астма у детей.— М., 1977.
13. Чучалин А. Г. Бронхиальная астма.— М., 1985.
14. Шаталов А. А. // Вопр. мед. химии.— 1969.— Т. 15, № 3.— С. 323—327.
15. Юрнев П. П., Семенович Н. И., Чучалин А. Г. Бронхиальная астма.— М., 1976.
16. Bors W., Michel C., Seran M., Lengfelder E. // Biochim. biophys. Acta.— 1978.— Vol. 540.— P. 162—172.
17. Depelchin A., Letesson J. J. // Immunol. Lett.— 1981.— Vol. 3, N 4.— P. 207—213.
18. Duggan D. D. // Arch. Biochem.— 1959.— Vol. 84.— P. 116.
19. Gabrielian E. S., Amroyan E. A. // Acta physiol. pharmacol. bulg.— 1976.— Vol. 2, N 2.— P. 3.
20. Kather H. et al. // Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol.— 1976.— Vol. 292, N 2.— P. 177.
21. Nishikimi M., Rao N. A., Yagi K. // Biochem. biophys. Res. Commun.— 1972.— Vol. 46.— P. 849.
22. Sackner M. A. // Chest.— 1978.— Vol. 73, N 6.— Suppl.— P. 958—966.

Поступила 11.08.89

RELATIONSHIP BETWEEN ALTERATIONS IN CATECHOLAMINES, THIOLS AND LIPID PEROXIDATION IN BRONCHIAL ASTHMA

V. G. Amatuni, A. K. Zakharyan

Medical School, Yerevan

Dynamics of adrenaline (A), noradrenaline, SH-groups and lipid peroxidation (LP) was studied in 34 patients with chronic asthmatic bronchitis and in 132 patients with bronchial asthma. The data obtained suggest that ratios A·10/LP and SOD/SH·10 enabled to evaluate the disease compensation or transformation of asthmatic attack into asthmatic state as well as to differentiate chronic asthmatic bronchitis from bronchial asthma.

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 1991

УДК 617.577-007.61-008.6-085.217.24 + 615.356.03

Н. Н. Прозоровская, Е. А. Қозлов, С. В. Лукьянов, С. С. Рудаков, В. Н. Прозоровский, А. А. Дельвиц

ЭКСКРЕЦИЯ ПИРИДИНОЛИНА С МОЧОЙ У ДЕТЕЙ С СИНДРОМАМИ ЭЛЕРСА—ДАНЛО И МАРФАНА И ВЛИЯНИЕ НА НЕЕ ТЕРАПИИ β -АДРЕНОБЛОКАТОРОМ И КОМПЛЕКСОМ ВИТАМИНОВ

Институт биологической и медицинской химии АН СССР, П ММИ им. Н. И. Пирогова и академическая группа акад. АН СССР Ю. Ф. Исакова, Москва

Результаты проведенного нами ранее исследования [4] дали основание предполагать, что под влиянием терапии β -адреноблокатором и комплексом витаминов достигается временная коррекция соединительной ткани. Настоящая работа посвящена проверке этого предположения с помощью исследования экскреции с мочой пиридинолина у детей с соединительнотканскими синдромами и влияния на нее указанной терапии.

Пиридинолин является производным 3-гидроксипиридина и играет роль основной межмолекулярной поперечной связи в фибриллярных коллагенах соединительных тканей хряща, костей, сухожилий, аорты и т. д., исключая кожу и роговицу, где он не обнаружен [6]. У пиридинолина (гидроксипиридинолина) есть аналог (лизилпиридинолин), у которого отсутствует 3-гидроксильная группа и который в значительных количествах присутствует в коллагене костной ткани, тогда как пиридинолин превалирует в хрящевой ткани [6]. Пиридинолин, экскретируемый с мочой, может быть использован в качестве специфического маркера деградации зрелого коллагена [7].

Исследование экскреции с мочой продукта деградации зрелого коллагена (пиридинолина) позволяет выявить нарушения процесса созревания коллагена при синдромах Элерса — Данло и Марфана и изменения этого процесса в результате терапии β -адреноблокатором и комплексом витаминов.

Методика. Под наблюдением находилось 27 детей (12 девочек и 15 мальчиков) в возрасте от 1 года до 14 лет. Из них у 9 был идентифицирован синдром Элерса — Данло (СЭД, группа 1): у 7 больных — I, II или III типа, у 1 больной — IV типа и у 1 больного — предположительно VII типа. У 12 больных диагностирован синдром Марфана (группа 2) и у 6 больных — неклассифицированный комплекс дефектов развития марфаноподобного фенотипа (НКДР+МФ, группа 3).

Для установления ориентировочных норм пиридинолина использовали контрольную группу из 20 здоровых детей (10 девочек и 10 мальчиков) сходного возраста.

Анализу подвергали утреннюю порцию мочи, собранную после соблюдения бесколлагеновой диеты на протяжении предшествующих суток. Анализ повторяли дважды: у здоровых детей с интервалом 3—5 дней и у больных до начала лечения и после его завершения.

Всем больным назначали 2,5-месячный курс лечения — β -адреноблокатором (обзидан, индерал) и витаминами (рибофлавин, пиридоксин и аскорбиновая кислота), дозировка которых и предполагаемый механизм воздействия описаны ранее [4]. 22 больным данную терапию проводили в качестве предоперационной подготовки к торакопластике по поводу врожденной деформации грудной клетки (ВДГК), воронкообразной или килевидной. Операция была сделана 18 больным,

Уровень экскреции с мочой пиридинолина и полипептид-связанного оксиуролина в зависимости от идентифицированного синдрома ($M \pm \delta$)

Группа обследованных	n	Пир/Кр	ОпФ1/Кр
1	9	0,104 ± 0,030 (0,074 — 0,134)	8,1 ± 5,0 (3,1 — 13,1)
2	12	0,192 ± 0,078 (0,114 — 0,270)	14,4 ± 5,4 (9,0 — 19,8)
3	6	0,149 ± 0,058 (0,091 — 0,207)	12,5 ± 8,1 (4,4 — 20,6)
Здоровые дети	20	0,187 ± 0,047 (0,140 — 0,234)	9,7 ± 1,8 (7,9 — 11,5)

Примечание. В скобках — диапазон стандартного отклонения; n — число обследованных.

5 больным (без ВДГК) лечение было назначено в качестве поддерживающей терапии.

Лечение контролировали клиническим и биохимическим методами. Первый включал эхокардиографическое обследование с измерением диаметра аорты на уровне полулунных клапанов и величины пролапса митрального клапана (ПМК), второй — определение пиридинолина и полипептидсвязанного оксиуролина в моче.

Стандартный препарат пиридинолина был получен из бычьего ахиллова сухожилия методом, описанным M. D. Euge и соавт. [5], с последующим фракционированием на сефадексе G-15 и хроматографированием на фосфоцеллюлозе и ионообменной смоле аминокс-G150S. После экстракции 4 M раствором гуанидин-НСl в 0,05 M трис-НСl pH 7,5 в течение 48 ч при 4 °C ткань промывали водой и гидролизовали кипячением с обратным холодильником в 3 н. НСl в течение 48 ч. Гидролизат концентрировали и четырежды экстрагировали равным объемом ледяной уксусной кислоты и 4 объемами n-бутанола. Образовавшиеся в течение ночи на холоду коричневое масло высушивали в вакууме, растворяли в 10 % уксусной кислоте и фракционировали на колонке (2,5×32 см) с сефадексом G-15, элюируя этим же раствором. Фракции, содержащие флюоресцирующий материал, высушивали в вакууме, растворяли в воде и наносили на колонку (0,9×12,5 см) с фосфоцеллюлозой (H⁺-форма; «Whatman», Англия). Флюоресценцию измеряли на спектрофлуориметре «Элюмин 300» отечественного производства, используя длины волн возбуждения 297 нм и эмиссии 395 нм. Хроматографию проводили градиентным элюированием [7]. Фракции, содержащие флюоресцирующий материал, высушивали, растворяли в 0,11 н. НСl и проводили хроматографическое фракционирование на колонке (0,9×60 см) с аминоксом-155 («Biogad», США), используя в качестве элюента 0,38 н. раствор натрийцитратного буфера pH 4,26 (скорость элюции 72 мл/ч) и собирая фракции объемом 3 мл. Флюоресцирующий материал выходил в 19—23 фракциях и имел характерные для пиридинолина УФ-спектр и спектр флюоресценции. Для обессоливания применяли сефадексе G-15.

Чистоту стандартного препарата пиридинолина определяли методом ВЭЖХ (жидкостной хроматограф «Алтех», модель 324, США) на колонке C-18 (10 мм×25 см, «Altech Ultrasphere ODS») в изократическом режиме с использованием: 15 % раствора этанола в 0,1 % растворе гептафтормасляной кислоты с регистрацией УФ-поглощения и флюоресценции. Время задержки пиридинолина 14 мин.

Для определения концентрации пиридинолина использовали 0,1 M стандартный раствор N-этил-8-пиридинола («Aldrich Chemical Co.», США), основываясь при расчетах на допущении, что оба соединения имеют одинаковые молярные коэффициенты экстинкции [5].

У больных детей и детей контрольной группы пиридинолин определяли в 50 мл утренней порции мочи после фракционирования на колонке (5×70 см) с сефадексом G-10 в материале 1-го пика, который лиофилизировали и гидролизовали в 6 н. НСl в течение 22 ч при 105 °C. Гидролизаты высушивали, растворяли в 10 % уксусной кислоте и фракционировали последовательно на колонке с сефадексом G-15 и аминоксом-Q150S, как описано выше для получения стандарта. Фракции, содержащие флюоресцирующий материал, объединяли и концентрацию пиридинолина определяли флуориметрически, сопоставляя со стандартным раствором пиридинолина известной концентрации. Количество пиридинолина отнесли к креатинину (Пир/Кр) и выражали в нмолях на 1 мкмоль.

Креатинин определяли методом Поннера и соавт. [2], основанным на цветной реакции Яффе, полипептидсвязанный оксиуролин — в материале 1-го пика после фракционирования мочи на колонке с сефадексом G-10, как описано ранее [3], и отнесли к креатинину (ОпФ1/Кр) в нмолях на 1 моль.

Статистическую обработку данных проводили на «Искре 226» по программам СТАТ 23 и СТАТ 6. При сравнении данных между группами использовали t-критерий Стьюдента.

Результаты и обсуждение. Результаты исследования экскреции пиридинолина с мочой (табл. 1) показали самую низкую среднюю величину отношения Пир/Кр в группе 1 (СЭД) с достоверными отличиями от его величины в контрольной группе ($p < 0,001$) и группе 2 (синдром Марфана; $p < 0,01$). Однако в пределах каждой группы, включая контрольную, наблюдался весьма широкий диапазон варьирования величин отно-

шения Пир/Кр, который может быть обусловлен различиями в возрасте (1—14 лет) детей, входящих в группы. Анализ корреляционной связи выявил наличие возрастной зависимости показателя Пир/Кр в контрольной группе ($r = 0,796$), между тем как у детей с соединительнотканными синдромами такая зависимость отсутствовала.

Мы исследовали параллельно два показателя деградации коллагена, один из которых — уровень пиридинолина — является специфическим маркером распада зрелого коллагена, тогда как другой не отличается специфичностью. Согласно данным литературы [9, 10], образование полипептидсвязанного оксиуролина может быть вызвано как распадом фибриллярных коллагенов в ткани, так и отщеплением N-концевого участка проколлагена. В пределах всех групп больных детей было обнаружено широкое варьирование величин также и отношения ОпФ1/Кр, причем достоверные отличия от нормы были выявлены только в группе больных с синдромом Марфана ($p < 0,05$), в которой показатель Пир/Кр также не отличался значимо от контроля (см. табл. 1).

Эти наблюдения навели на мысль о классификации синдромальных больных на основании индивидуального сопоставления величин Пир/Кр и ОпФ1/Кр с диапазоном нормы. В результате было получено 4 подгруппы, отражающих 4 варианта сочетаний исследованных показателей относительно нормы (табл. 2). Анализ распределения больных по подгруппам показал, что оно в значительной степени зависит от присутствующего синдрома. Так, в подгруппе 1 преобладали больные с НКДР+МФ, в подгруппе 2 — с синдромом Марфана, в подгруппе 3 — с СЭД, а в подгруппу 4 вошли только больные с синдромом Марфана.

Информативность полученных сочетаний можно предположительно и достаточно условно интерпретировать следующим образом: в подгруппе 1 — повышенный синтез коллагена или повышенный распад коллагенов (или других оксипролинсодержащих белков) на фоне нормального процесса созревания коллагена; в подгруппе 2 — нарушение фибриллогенеза на фоне нормального синтеза и распада коллагена, т. е. возможность нарушения образования поперечных связей в коллагеновых фибриллах; в подгруппе 3 — подавление синтеза и процесса созревания коллагена; в подгруппе 4 — усиленный метаболизм коллагена.

Следует отметить, что больные с идентифици-

Подгруппы синдромальных больных, сформированные в зависимости от величины отношений Пир/Кр и ОпФ1/Кр относительно диапазона нормы (контрольная группа)

Подгруппа	Пир/Кр	ОпФ1/Кр	Число больных			
			общее	с СЭД	с синдромом Марфана	с НКДР+МФ
1	Н	↑	7	2 (22; 28,6)	2 (17; 28,6)	3 (50; 42,8)
2	↓	Н	7	2 (22; 28,6)	4 (33; 57,1)	1 (17; 14,3)
3	↓	↓	8	5 (56; 62,5)	1 (8; 12,5)	2 (33; 25)
4	↑	↑	5	0	5 (42; 100)	0

Примечание. Н — в пределах нормы; ↑ — выше верхней границы; ↓ — ниже нижней границы; в скобках: первое число — процентная доля от общего числа больных с данным диагнозом, второе — от общего числа больных в данной подгруппе.

рованным СЭД VII и IV типа вошли в подгруппы 2 и 3 соответственно. Известно, что СЭД IV типа характеризуется нарушениями синтеза, секреции или структуры коллагена III типа, а при СЭД VII типа наблюдается нарушение процесса образования коллагеновых фибрилл, связанное с нарушением протеолитического отщепления N-концевых пропептидов от проколлагена типа I [1, 8]. Клинические типы СЭД I—III характеризуются аномальной структурой коллагеновых фибрилл, но биохимические дефекты не установлены. По некоторым данным, при синдроме Марфана возможно снижение активности лизилоксидазы и вследствие этого нарушение процесса образования поперечных связей [1, 8]. В подгруппу 2 больных, у которых предположительно могли бы иметь место такие дефекты, вошло 4 пациента с синдромом Марфана из 12 обследованных.

Изменения в экскреции продуктов деградации коллагена под влиянием проведенной терапии в зависимости от их исходного уровня отражены в табл. 3. Указанная терапия способствовала повышению уровня пиридинолина, если исходно он был ниже нормы, практически не оказывая никакого влияния на исходно «нормальные» или повышенные по сравнению с нормой уровни. Повидимому, это можно объяснить стимулирующим воздействием на процесс созревания коллагена, которое может быть связано с усилением гидроксилирования пролина и лизина. Следует отметить,

что если в подгруппе 3 величина отношения Пир/Кр в результате лечения повысилась на 82 %, то в подгруппе 2 — только в среднем на 33 %. Влияние терапии на экскрецию полипептидсвязанного оксипролина не было однозначным. Исходно повышенная величина отношения ОпФ1/Кр в подгруппах 1 и 4 снизилась до почти нормы, в подгруппе 3 повысилась, но осталась значительно ($p < 0,001$) ниже нормы, а в подгруппе 2 она практически не изменилась. Таким образом, полученные результаты указывают, по-видимому, на нормализующее влияние терапии β -адреноблокатором и комплексом витаминов на метаболизм коллагена, хотя механизмы такого влияния остаются не вполне ясными.

Положительное клиническое влияние терапии оценивали по улучшению общего состояния, исчезновению или уменьшению числа жалоб со стороны больных, прибавке в массе тела, уменьшению или исчезновению ПМК, сужению корня аорты, а также отсутствию в послеоперационный период тяжелых осложнений такого типа, как парез кишечника, плеврит, пневмония. Исходя из такой оценки, общее положительное влияние терапии отмечено у 18 (67 %) из 27 больных (табл. 4). Из 18 оперированных больных у 13 не наблюдались осложнения указанного характера. Из 12 больных с ПМК исчезновение или уменьшение его наблюдалось у 8 больных, у 1 больного картина осталась без изменений и у 3 больных (1 с СЭД, 2 с синдромом Марфана) он увеличивался, однако на фоне сужения корня аорты. Эти трое больных относились к подгруппе 2 и имели осложнения в послеоперационном периоде. Таким образом, самой «неблагоприятной» оказалась подгруппа 2, в которой отношение Пир/Кр было исходно низким при нормальном отношении ОпФ1/Кр, что может, по-видимому, указывать на наличие в одном из генов фибриллярных коллагенов структурной мутации, не поддающейся коррекции указанной терапией.

В целом положительное влияние терапии отмечено у 5 (44 %) из 9 больных с СЭД, у 9 (75 %) из 12 больных с синдромом Марфана и у 5 (83 %) из 6 больных с НКДР+МФ.

В комплексном влиянии терапии β -адреноблокатором и витаминами В₂, В₆ и аскорбиновой кислотой участвуют, очевидно, несколько механизмов, дающих в итоге совместного действия положительный эффект, однако прояснить эти механиз-

Таблица 3

Изменение под влиянием терапии отношений Пир/Кр и ОпФ1/Кр в зависимости от их исходной величины или принадлежности больных с соединительнотканью синдромами к той или иной подгруппе ($M \pm \delta$)

Подгруппа	Число больных	Срок исследования	Пир/Кр	ОпФ1/Кр
1	7	До лечения	$0,194 \pm 0,039$	$18,4 \pm 2,9$
		После лечения	$0,217 \pm 0,025$	$12,2 \pm 1,1^{**}$
2	7	До лечения	$0,112 \pm 0,010$	$9,5 \pm 1,3$
		После лечения	$0,149 \pm 0,020^*$	$10,0 \pm 1,3$
3	8	До лечения	$0,085 \pm 0,027$	$4,0 \pm 1,0$
		После лечения	$0,155 \pm 0,029^*$	$7,1 \pm 0,7^*$
4	5	До лечения	$0,264 \pm 0,020$	$18,9 \pm 0,9$
		После лечения	$0,257 \pm 0,025$	$11,3 \pm 1,2^{**}$

Примечание. Описание подгрупп дано в табл. 3; одна звездочка — $p < 0,01$, две — $p < 0,001$.

Клиническая оценка влияния терапии в зависимости от исходной величины отношений Пир/Кр и ОпФ1/Кр или принадлежности больных к той или иной подгруппе

Характеристика	Подгруппа (число больных)				Всего 27
	1(7)	2(7)	3(8)	4(5)	
С пролапсом митрального клапана:					
до лечения	1	5	4	2	12
после лечения:					
с уменьшением	1	1	4	2	8
без изменений	—	1	—	—	1
с увеличением	—	—	—	—	—
С расширением корня аорты:					
до лечения	1	3	2	2	8
с сужением после лечения	1	3	2	2	7
Оперированы	4	6	3	5	18
с осложнениями в послеоперационном периоде (парез кишечника, плеврит, пневмония)	1	4	—	—	5
Без изменений после лечения	2	2	1	—	5
С общим положительным эффектом терапии	4 (57 %)	2 (28,6 %)	7 (87,5 %)	5 (100 %)	18 (66,7 %)

мы на основании результатов проведенного исследования не представляется возможным.

Суммируя полученные результаты, можно сделать следующие выводы.

У детей с синдромами Элерса — Данло, Марфана и неклассифицированным комплексом дефектов развития марфаноподобного фенотипа обнаружены 4 варианта сочетаний величин отношений Пир/Кр и ОпФ1/Кр относительно нормы, существование которых, по-видимому, связано с различными нарушениями метаболизма коллагена, обусловленными, очевидно, как структурными дефектами, так и изменениями посттрансляционного созревания. Эффективность терапии β-адреноблокатором и комплексом витаминов в значительной степени зависит от того, какой вариант сочетания величин отношений Пир/Кр и ОпФ1/Кр относительно нормы был исходно у больного. Указанная терапия оказывает временное нормализующее влияние на величину отношений Пир/Кр и ОпФ1/Кр, при этом эффективность «биохимической коррекции» коррелирует с клинической эффективностью лечения. Эффективность терапии β-адреноблокатором и комплексом витаминов в отношении соединительнотканых синдромов в настоящем исследовании располагалась следующим образом в порядке убывания: неклассифицированный комплекс дефектов развития марфаноподобного фенотипа, синдром Марфана, синдром Элерса — Данло.

10. Szymanowicz A. G., Legentile J. P., Maquart F. X. et al. // Pharm. Biol.— 1981.— Vol. 15, N 132.— P. 99/37—110/48.

Поступила 05.12.89

EXCRETION OF PYRIDINOLINE WITH URINE IN CHILDREN IMPAIRED BY EHLERS-DUNLOP AND MARPHAN DISEASES AND EFFECT OF β-ADRENOBLOCKING AGENTS AND VITAMIN COMPLEX ON THE EXCRETION

N. N. Prozorovskaya, E. A. Kozlov, S. V. Lukyanov, S. S. Rudakov, V. N. Prozorovsky, A. A. Delovig

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

Excretion of pyridinoline and polypeptide-bound hydroxyproline with urine was studied in 27 children with hereditary impairment of connective tissue. At the same time, effects of β-adrenoblocking agents and vitamin complex, prescribed during preoperation period before thoracoplasty in hereditary chest deformation, were investigated. Clinical efficiency of the treatment depended distinctly on the initial value of ratios pyridinoline/creatinine and polypeptide-bound hydroxyproline/creatinine. Total positive effect of the therapeutic course, considering also echocardiographic examination and postoperational complications, was observed in 44 % of patients with Ehlers-Dunlop syndrome and in 75 % of patients with Marphan syndrome.

© Т. П. ВАВИЛОВА, Ю. А. ПЕТРОВИЧ, 1991

УДК 612.313.1.015.1:577.152.11.088.1

Т. П. Вавилова, Ю. А. Петровиц

ОПРЕДЕЛЕНИЕ АКТИВНОСТИ НИТРАТРЕДУКТАЗЫ В СМЕШАННОЙ СЛЮНЕ

Московский медицинский стоматологический институт им. Н. А. Семашко

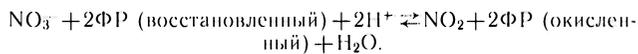
Необходимость определения в слюне содержания нитритов и активности нитратредуктазы, участвующей в метаболизме нитратов, обусловлена высоким содержанием нитратов и нитритов в пище, воде, табачных изделиях [3, 5] и возможным образованием нитрозаминов в слюне при недостаточном гигиеническом уходе за полостью рта из-за избытка аниона тиоцианата [7], катализирующего нитрозирование аминов в слюне. Вместе с тем сведения о метаболизме нитратов

ЛИТЕРАТУРА

1. Дельвиц А. А. // Вопр. мед. химии.— 1986.— № 2.— С. 2—14.
2. Карпенко В. С., Колесников Т. Ф., Петрунь Н. М. и др. // Функциональная диагностика в урологии и нефрологии.— Киев, 1977.— С. 8—10.
3. Прозоровская Н. П., Глиняная С. В., Дельвиц А. А. // Вопр. мед. химии.— 1986.— № 6.— С. 84—86.
4. Прозоровская Н. П., Глиняная С. В., Герашенко А. П. и др. // Там же.— 1988.— № 5.— С. 99—104.
5. Eyre D. R., Kool T. J., Van Ness K. P. // *Analyt. Biochem.*— 1984.— Vol. 104.— P. 380—388.
6. Eyre D. R., Paz M. A., Gallop P. M. // *Ann. Rev. Biochem.*— 1984.— Vol. 53.— P. 717—748.
7. Fujimoto D., Suzuki M., Uchiyama A. et al. // *J. Biochem. (Tokyo)*.— 1983.— Vol. 94.— P. 1133—1136.
8. Krieg Th., Hein R., Hatamochi A., Aumailley M. // *Europ. J. clin. Invest.*— 1988.— Vol. 18.— P. 105—123.
9. Szymanowicz A. G. // *J. Chromatogr.*— 1981.— Vol. 225.— P. 55—63.

тов в ротовой полости противоречивы [14, 17].

Нитратредуктаза выделена из различных бактерий, грибов, водорослей и микроорганизмов [4, 12]. Показано, что смешанная слюна также обладает нитратредуктазной активностью [1, 2, 10, 16, 19]. В зависимости от используемого фермента донора электронов различают 2 типа нитратредуктаз: с полной и короткой цепью переноса электронов к нитрату. Нитратредуктазы с полной цепью (КФ 1.6.6.1, КФ 1.6.6.2, КФ 1.6.6.3) являются флавопротеинами, и используют в качестве донора электронов НАДН₂ и НАДФН₂. Нитратредуктаза бактерий принадлежит к типу коротких или терминальных нитратредуктаз, имеющих укороченную цепь внутриферментного транспорта и использующих в качестве донора электронов восстановленный ферредоксин (ФР) или его химический аналог — метил(бензил)виологен. Нитратредуктаза такого типа катализирует реакцию:



Терминальные нитратредуктазы имеют, как правило, низкую молекулярную массу и лишены четвертичной структуры [11].

Установлено, что некоторые микроорганизмы полости рта в определенных условиях способны метаболизировать нитраты [6, 8, 9]. Существующие в настоящее время методики определения активности нитратредуктазы в слюне [10, 19] не учитывают возможных особенностей механизма действия бактериальных ферментов, особенностей самой слюны, и поэтому не отражают истинную активность фермента, присутствующего в смешанной слюне (СС).

В связи с этим мы поставили цель разработать доступную, легко воспроизводимую методику определения активности нитратредуктазы в слюне человека с последующим применением для оценки состояния полости рта.

Методика. В работе использовали следующие реактивы: метилвиологен (МВ) и бензилвиологен (БВ) («Fluka», Швейцария), НАДН («Reanal», Венгрия, другие реактивы были отечественного производства).

Слюну получали без стимуляции путем сплевывания в течение 3–5 мин. Использовали как цельную СС, так и отдельно осадок и надосадочную жидкость, полученную после центрифугирования слюны при 8000 об/мин в течение 30 мин. Для анализа брали свежесобранную слюну и слюну, хранящуюся при 4 °С в течение 24 ч.

Определение содержания нитритов проводили по [18]. В центрифужную пробирку помещали 0,1–0,2 мл слюны, до 2,0 мл дистиллированной воды, затем добавляли 0,5 мл 0,6 % раствора сульфаниловой кислоты в 20 % растворе HCl и 0,5 мл 0,1 % водного раствора N-1-нафтилэтилендиамина (НЭДА), перемешивали, оставляли на 10 мин при комнатной температуре для развития окраски и центрифугировали при 3000 об/мин в течение 15 мин для осаждения белков. Интенсивность окраски надосадочной жидкости измеряли на спектрофотометре при длине волны 548 нм. Количество нитритов рассчитывали по калибровочной кривой, построенной с использованием дважды перекристаллизованного нитрита натрия (в 1 мл раствора было 8 нмоль нитрита натрия).

Определение активности нитратредуктазы проводили следующим образом: инкубационную смесь объемом 0,7 мл, содержащую 0,1–0,2 мл слюны, 0,1 мл дитионита ($4,6 \times 10^{-3}$ М в $95 \cdot 10^{-3}$ М NaHCO₃), 0,1 мл МВ ($5,8 \times 10^{-3}$ М) или 0,1 мл БВ ($20 \cdot 10^{-3}$ М), 0,1 мл NaNO₃ ($1 \cdot 10^{-1}$ М) и соответствующего количества $5 \cdot 10^{-2}$ М фосфатного буфера, pH 6,5, инкубировали в водяной бане при 37 °С в течение 30 мин. По окончании инкубации пробы интенсивно встряхивали до полного обесцвечивания и доводили объем до 2,0 мл дистиллированной водой, затем добавляли реактивы на нитриты.

Активность нитратредуктазы выражали в микромолях нитрита, образовавшегося за 1 мин в 1 л слюны по формуле:

$$A = \frac{C_0 - C_{\text{исход}}}{t \cdot v}, \text{ где } C_0 \text{ — количество нитритов (в мкмоль на 1 л), определяемое после инкубации; } C_{\text{исход}} \text{ — исходное количество нитритов в микромолях на 1 л, определяемое до инкубации; } t \text{ — время инкубации; } v \text{ — объем слюны в пробе.}$$

Результаты и обсуждение. При определении активности нитратредуктазы очень важна чувствительность методики определения нитритов. Для проведения реакции можно использовать растворы α-нафтиламина и диметил-α-нафтиламина [10, 18], но образовавшийся при этом цветной комплекс неустойчив и окраска исчезает спустя 5 мин после начала реакции [18]. В своей работе для определения нитритов мы использовали НЭДА, так как в последнем случае развивающаяся окраска раствора устойчива в течение 4 ч. Однако при определении количества нитритов в слюне мешает присутствие белков, в первую очередь гликопротеинов, которые плохо осаждаются и придают раствору мутность. Мы сравнивали несколько способов осаждения белка из реакционной смеси (табл. 1) и остановились на центрифугировании раствора при 3000 об/мин в течение 15 мин после добавления кислот и НЭДА (с образованием диазониевой соли). Кислоты вызывали денатурацию белка, а последующее центрифугирование уменьшало мутность раствора. Осаждение белков необходимо проводить только в конце реакции. Это связано с тем, что, по нашим данным, активность нитратредуктазы значительно выше в осадке, чем в надосадочной жидкости. Вместе с тем присутствие в реакционной смеси надосадочной жидкости необходимо, так как она является источником доноров электронов [10].

Предлагаемое нами осаждение белков обеспечивает хорошую воспроизводимость результатов и не требует дополнительных этапов депротеинизации слюны.

Осадок смешанной слюны содержит слущенный эпителий слизистой оболочки полости рта, около 300 видов микроорганизмов [15], мигрировавшие через слизистую оболочку лейкоциты. Любой из этих компонентов может быть источником нитратредуктазы. Для выявления происхождения слюнной нитратредуктазы мы сравнили активность фермента в осадке и в надосадочной жидкости, а

Таблица 1

Влияние условий осаждения белка на определение содержания нитратов

Состав смеси	$t_{\text{опт}}$
0,2 мл СС + 1,8 мл дистиллированной воды + 0,5 мл сульфаниловой кислоты + 0,5 мл НЭДА (без центрифугирования)	0,260
0,2 мл СС + 1,8 мл дистиллированной воды + 0,5 мл сульфаниловой кислоты + 0,5 мл НЭДА	0,095
0,2 мл СС + 1,8 мл 5 % ТХУ + 0,5 мл сульфаниловой кислоты + 0,5 мл НЭДА	0,120
1 мл 5 % ZnSO ₄ + 0,8 мл 1 н. NaOH + 0,2 мл СС + 0,5 мл сульфаниловой кислоты + 0,5 мл НЭДА	0,095

Примечание. 2, 3 и 4-ю пробы центрифугировали при 3000 об/мин в течение 15 мин, после чего измеряли оптическую плотность надосадочной жидкости.

Определение нитритов в смешанной слюне в процессе инкубации (4 ч)

Разведение слюны	E^{548} до инкубации	E^{548} после инкубации
Неразведенная	0,285	2,0
1:10	0,033	0,890
1:100	0,000	0,085
1:1000	0,000	0,003
1:10 000	0,000	0,000

также поставили опыты на разведение слюны с созданием условий для роста микрофлоры, содержащейся в ней. Если содержание нитритов в осадке и надосадочной жидкости было приблизительно равным ($56 \pm 1,3\%$ в надосадочной жидкости по отношению к смешанной слюне), то активность нитратредуктазы в осадке была почти в 100 раз выше по сравнению с жидкой фазой слюны. После инкубации разведенной слюны в течение 4 ч в термостате при 37°C (табл. 2) содержание нитритов в слюне возрастает. Таким образом, высокая активность нитратредуктазы в осадке слюны и опыты с инкубацией, создающие оптимальные условия для роста микрофлоры, подтверждают микробное происхождение фермента.

На скорость ферментативной реакции влияют условия хранения смешанной слюны. Так, прогревание слюны при 60°C в течение 20 мин сопровождается падением активности фермента до 0, а замораживание слюны на 24 ч приводит к уменьшению активности нитратредуктазы вдвое.

Оптимальные значения pH для нитратредуктазы колеблются от 6,0 до 7,02 [10, 16, 19]. Мы исследовали влияние pH на активность нитратредуктазы в 5 образцах слюны (см. рисунок). В 2 образцах максимальная активность определялась при pH 6,5, в 1 при pH 6,6 и в 2 при pH 7,0. Полученные нами данные в известной мере совпадают с результатами других авторов. Можно думать, что в каждом конкретном случае существует свой пик максимальной активности фермента, связанный с характером микрофлоры, что не позволяет указать конкретный pH-оптимум для слюнной нитратредуктазы. Мы предлагаем определять активность нитратредуктазы слюны в интервале pH 6,5—7,0.

На скорость нитратредуктазной реакции также влияет характер донора электронов, поэтому в на-

Таблица 3
Использование нитратредуктазой различных доноров электронов

Донор электронов	Активность, мкмоль на 1 л в 1 мин
Контроль (без прибавления доноров)	3,55
$\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$ ($46 \cdot 10^{-3}$ М) + NaHCO_3 ($5,7 \cdot 10^{-3}$ М)	3,32
$\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$ + NaHCO_3 + МВ ($0,6 \cdot 10^{-3}$ М)	12,3
$\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$ + NaHCO_3 + БК ($2 \cdot 10^{-3}$ М)	29,3
НАДН_2 ($1 \cdot 10^{-3}$ М)	3,37

шей работе мы использовали несколько различных доноров электронов (табл. 3). Введение в систему дитионита натрия, БВ, МВ и НАДН_2 неодинокво влияло на скорость реакции. Если дитионит натрия и НАДН_2 в указанных концентрациях существенно не влияли на скорость ферментативной реакции, то МВ и БВ значительно повышали скорость ферментативной реакции. Это свидетельствует о том, что слюнные нитратредуктазы относятся к терминальному типу нитратредуктаз.

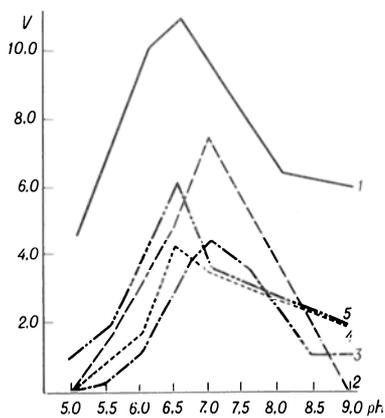
Нитратредуктазная активность характеризуется линейной зависимостью в пределах от 0,05 до 0,3 мл слюны. Большие объемы слюны вводить в пробы нецелесообразно, т. к. слюна может содержать высокие концентрации нитритов и присутствующие гликопротеины полностью не осаждаются, что может привести к искажению результатов.

При изучении слюны у 38 лиц без патологических изменений пародонта нитратредуктазная активность была обнаружена во всех образцах. Она колебалась в пределах от 0,8 до 17,3 мкмоль на 1 л за 1 мин. Среднее значение составляло $8,75 \pm 0,84$ мкмоль на 1 л за 1 мин. Не выявлено достоверных различий активности фермента в зависимости от пола ($8,44 \pm 1,16$ мкмоль на 1 л за 1 мин у мужчин и $8,67 \pm 1,30$ мкмоль на 1 л за 1 мин у женщин).

Таким образом, предложенная нами модификация метода [13] определения активности нитратредуктазы позволяет учесть особенности действия нитратредуктазы в слюне и является приемлемой для оценки метаболизма нитратов в полости рта.

ЛИТЕРАТУРА

1. Вавилова Т. П., Петрович Ю. А., Барер Г. М. и др. // Стоматология. — 1989. — № 1. — С. 24—26.
2. Гилева О. С. Биохимия слюны, клиника и профилактика заболеваний слизистой оболочки полости рта в условиях производственного воздействия табака: Автореф. дис. ... канд. мед. наук. — М., 1988.
3. Гилева О. С., Петрович Ю. А. // Вопр. питания. — 1988. — № 5. — С. 9—14.
4. Львов П. П. // Молекулярные механизмы усвоения азота растениями. — М., 1983. — С. 127—150.
5. Мухомов В. И. // Вопр. питания. — 1988. — № 2. — С. 4—8.
6. Bowden G. H., Hardie J. M. // Isolation of Anaerobes Eds. D. A. Shepton et al. — New York, 1971. — P. 177—205.
7. Boyland E., Walner S. Q. // Nature. — 1974. — Vol. 248. — P. 601—602.
8. Breed R. S., Murray E. G., Smith N. B. // Bergery's Manual of Determination Bacteriology. — Baltimore, 1957. — P. 1094.



Влияние pH-среды на активность нитратредуктазы слюны.

1, 2, 3, 4, 5 — образцы смешанной слюны. По оси ординат — активность фермента (в мкмоль/мл/л).

9. Broschinski L., Fische G., Namasch K. A. et al. // Zbl. Bakt.— 1987.— Bd A 264, N 1—2.— S. 163—166.
10. Goaz P. W., Biswell H. A. // J. dent. Res.— 1961.— Vol. 40, N 2.— P. 355—365.
11. Guerrero M. G., Vega J. M., Losada M. // Ann. Rev. Plant Physiol.— 1981.— Vol. 32.— P. 169—204.
12. Hewitt E. J., Nolton B. A., Garner C. D. // Biochem. Soc. Trans.— 1979.— Vol. 7, N 4.— P. 619—633.
13. Kennedy R., Rigaud J., Trinchant J. C. // Biochim. biophys. Acta.— 1975.— Vol. 397.— P. 24—25.
14. Leach S. A., Packer P. J., Hill M. J. // Biochem. Soc. Trans.— 1987.— Vol. 15, N 5.— P. 911—912.
15. Listrgarten M. A. // J. clin. Periodont.— 1986.— Vol. 13, N 5.— P. 419—425.
16. Miller M. C. III, Biswell H. A., Goaz P. W. // J. dent. Res.— 1962.— Vol. 41, N 3.— P. 549—572.
17. Milligan J. R., Zucker P. F., Swann P. F. et al. // Relevance N-Nitroso Compounds Human Cancer.— Lyon, 1987.— P. 297—298.
18. Nicholas D. J. D., Nason A. // Meth. Enzymol.— 1957.— Vol. 111.— P. 981—983.
19. Srivastava K. C., Siddigni M. H., Rose B. et al. // Naturwissenschaften.— 1982.— Bd 69.— S. 400—401.

Поступила 12.01.90

ACTIVITY OF NITRATE REDUCTASE IN MIXED SALIVA

T. P. Vavilova, Yu. A. Petrovich

Medical Stomatological School, Moscow

A procedure is developed for estimation of nitrate reductase activity in saliva. Effects of pH, temperature and nature of electron donor on the enzymatic activity were studied. The maximal enzymatic activity was found at pH 6.5-7.0; heating and freezing of saliva led to loss of the enzymatic activity. Salivary nitrate reductases are of microbial origin and belong to "terminal" type of nitrate reductases. The enzyme activity varied in the interval 0.8-17.3 nmole/min per 1 L saliva and did not depend on human sex.

© С. А. КУЦЕНКО, В. В. ШИЛОВ, 1991

УДК 616-099-02: [615.917:547.239.2]-092.9-07: [616-008.931:577.152.193 + 616-008.939.626]

С. А. Куценко, В. В. Шилов

ДИНАМИКА АКТИВНОСТИ ЦИТОХРОМ-ОКСИДАЗЫ И СОДЕРЖАНИЯ ГЛУТАТИОНА В ТКАНЯХ КРЫС, ОТРАВЛЕННЫХ ЦИАНИСТЫМ КАЛИЕМ И НИТРИЛАМИ

Военно-медицинская академия им. С. М. Кирова, Ленинград

Метаболизм нитрилов сопровождается образованием в организме высокотоксичного цианиона — ингибитора цитохромоксидазы [4, 11]. Однако, по данным ряда авторов, в механизме действия нитрилов нарушению биоэнергетических процессов не принадлежит решающая роль [6, 7]. Предполагается, что нитрилы, действуя целой молекулой, связывают свободные сульфгидрильные группы. Это, в частности, сопровождается снижением содержания в тканях восстановленного глутатиона [2]. Разрешение этого противоречия имеет принципиальное значение при разработке эффективных средств и схем оказания помощи отравленным нитрилами. Задача усложняется тем, что, по имеющимся данным, цианиды также способны взаимодействовать с сульфгидрильными группами, понижать активность глутатионзависимых энзимов [8].

С целью определения биологической значимости указанных явлений для патогенеза интоксикации нитрилами и цианидами проведено сравнительное изучение динамики содержания восстановленного глутатиона и активности цитохромоксидазы в тканях животных, отравленных этими токсикантами.

Методика. Опыты выполнены на беспородных белых крысах-самцах массой 160—200 г. Нитрилы (акронитрил, ацетонитрил, валеронитрил, бензонитрил) и цианистый калий вводили животным однократно внутривенно в дозе П.Д₅₀ (83,5, 1265, 548, 890,0, 6,8 мг/кг соответственно). Через 0,25, 1, 3, 8, 24 ч животных декапитировали. Активность цитохромоксидазы в ткани мозга определяли, как описано в литературе [3, 10]. Содержание восстановленного глутатиона в гомогенате ткани печени и мозга исследовали с помощью реактива Эйлмана [9]. Путем статистической обработки данных определяли величину $M \pm m$. Достоверность различий между сравниваемыми величинами оценивали с помощью критерия Стьюдента t с вероятностью ошибки менее 5%.

Результаты и обсуждение. Как следует из данных табл. 1, интоксикация KCN, акрилонитрилом, валеронитрилом сопровождается существенным снижением активности цитохромоксидазы в ткани мозга отравленных животных. Эффект достигает максимума с наивысшей скоростью при отравлении KCN (через 15 мин активность уменьшается на 47%). При интоксикации акрилонитрилом лишь через 1 ч после введения отмечается максимальное снижение активности цитохромоксидазы (на 36%), валеронитрилом через 8 ч — на 24%. Известно, что выраженность реакции организма на воздействие альтерерирующего фактора находится в прямой зависимости от глубины повреждения и скорости его формирования [1]. В связи с этим полученные результаты указывают на существенно большее значение феномена нарушения процессов тканевого дыхания для патогенеза интоксикации цианистым калием, чем акрило- и валеронитрилом и тем более ацето- и бензонитрилом, практически не изменяющих активность цитохромоксидазы.

В табл. 2, 3 представлены данные о влиянии цианистого калия и нитрилов на содержание глутатиона в мозге и печени экспериментальных животных. Установлено, что KCN статистически достоверно не изменяет уровень восстановленного глутатиона в органах белых крыс. Лишь через 1 ч после введения токсиканта отмечается тенденция к снижению исследуемого показателя в ткани печени (92% от нормы). Все изученные нитрилы существенно снижают содержание глутатиона в тканях. В мозге эффект выражен слабее, чем в печени (максимальное снижение примерно на 25—30% при интоксикации акрило- и ацетонитрилами). С наивысшей скоростью и наибольшей глубиной эффект развивается при интоксикации акрилонитрилом. Уже через 15 мин содержание глутатиона в печени снижается примерно на 30%, через 1 ч — более чем на 80%, а через 3 ч отмечается максимальное (9-кратное) снижение его уровня.

Другие нитрилы существенно уступают акрилонитрилу по способности влиять на изучаемый показатель. Ацето-, валеро-, бензонитрил снижают содержание глутатиона в печени только в 2—5 раз, причем максимум снижения отмечается лишь через 3—8 ч после введения токсикантов.

Сравнительная оценка полученных данных подтверждает представления, согласно которым как

Динамика активности цитохромоксидазы (в % от отношения к контролю) в мозге крыс после внутрибрюшинного введения цианистого калия и нитрилов в дозе LD_{50} ($M \pm m$; $n=6$)

Токсическое вещество	Время после введения вещества, ч				
	0,25	1	3	8	24
КСН	43±6,2*	60±2,4*	83±7,1	85±5,7	88±4,3
Акрилонитрил	77±4,3*	64±5,7*	74±3,8*	71±3,8*	83±7,6
Ацетонитрил	97±6,6	100±4,7	105±7,6	96±7,1	100±7,1
Валеронитрил	89±7,1	85±5,7	82±6,2	76±5,2*	81±4,7*
Бензонитрил	105±5,7	95±3,3	94±8,1	92±3,8	101±6,6

* Здесь и в табл. 2, 3: $p < 0,05$.

Таблица 2

Содержание восстановленного глутатиона в мозге крыс после внутрибрюшинного введения цианистого калия и нитрилов в дозе LD_{50} (в мг/100 г ткани; $M \pm m$; $n=6$)

Токсическое вещество	Время после введения вещества, ч				
	0,25	1	3	8	24
Контроль		59±3,2	59,1±2,6		61,8±3,4
КСН	58±3,1	54,7±2,5	56,5±3,5	55,9±3,0	60,1±2,0
Акрилонитрил	55±1,5	52,6±2,5	45,6±1,5*	45,3±3,2*	58,0±2,1
Ацетонитрил	57,4±2,5	54,1±2,3	49,5±1,5*	42,3±1,6*	57,4±2,2
Валеронитрил	58,9±3,1	55,6±2,2	49,8±1,8*	49,5±1,6*	58,9±2,0
Бензонитрил	59,2±1,8	53,8±1,5	51,3±2,4	51,9±3,3	55,6±2,1

Таблица 3

Содержание восстановленного глутатиона в печени крыс после внутрибрюшинного введения цианистого калия и нитрилов в дозе LD_{50} (в мг/100 г; $M \pm m$; $n=6$)

Токсическое вещество	Время после введения, ч				
	0,25	1	3	8	24
Контроль		206,9±8,4	203,7±9,5		197,2±13,1
КСН	200,6±12,8	187,4±10,0	199,6±27,6	199,7±10,4	200,9±7,1
Акрилонитрил	147,7±9,3*	36,8±5,7*	27,4±3,6*	68,6±9,8*	153,8±5,9*
Ацетонитрил	191,9±5,6	157,6±6,5*	97,0±10,2*	137,7±7,2*	198±4,8
Валеронитрил	191,4±5,2	169,7±4,3*	147,7±7,2*	85,2±7,6*	267,5±21,7*
Бензонитрил	195,8±8,0	180±10,3	96,6±3,6*	83,9±8,2*	175,7±16,7

угнетение активности цитохромоксидазы, так и снижение уровня глутатиона в тканях, наблюдаемые при интоксикации нитрилами, неразрывно связаны с процессом их биотрансформации [4]. Так, сроки максимального угнетения активности энзима и снижения уровня трипептида существенно совпадают для акрилонитрила (1—3 ч) и валеронитрила (3—8 ч). Вместе с тем эти эффекты есть следствие действия на организм разных фрагментов молекул токсикантов. Отщепляющийся циан-ион, угнетая активность цитохромоксидазы, практически не изменяет уровень глутатиона (см. табл. 2, 3). Другие продукты метаболизма нитрилов связывают глутатион. По-видимому, последнее свойство является более общим для группы нитрилов. Так, бензо- и ацетонитрил не угнетают активность цитохромоксидазы, но снижают уровень глутатиона в тканях организма.

В связи с изложенным представляется возможным изученные вещества разделить на 3 группы. 1-я группа представлена цианистым калием. В основе интоксикации этим соединением лежит угнетение механизмов биологического окисления. Эффекты, реализующиеся через глутатионзависимые

процессы, не имеют патогенетического значения или выражены слабо.

2-я группа (акрило- и валеронитрил) — вещества, для которых оба изученных механизма могут иметь важное значение. Особенно это справедливо в отношении акрилонитрила, мало уступающего цианистому калию по ингибиторному действию на цитохромоксидазу и существенно превосходящего другие нитрилы по способности снижать содержание глутатиона в тканях.

Представителями 3-й группы являются ацето- и бензонитрил, токсиканты, для которых исследованные эффекты, особенно нарушение процессов биоэнергетики, вероятно, имеет второстепенное значение.

ЛИТЕРАТУРА

1. Голубев А. А., Люблина Е. И., Толоконцев Н. А., Филлов В. А. // Количественная токсикология. — Л., 1973.
2. Иванов В. В. // Фармакол. и токсикол. — 1980. — Т. 43, № 3. — С. 383—384.
3. Рыбальченко В. К., Коганов М. М. Структура и функции мембран. — Киев, 1988.
4. Сухомлинов Б. Ф., Трикуленко А. В. // Фармакол. и токсикол. — 1984. — Т. 47, № 1. — С. 123—126.

5. Трикуленко А. В. Исследование механизма биологического действия нитрилов пропеновой и изовалериановой кислот: Автореф. дис. ... канд. мед. наук.— Львов, 1982.
6. Трубищев Н. А. Токсикологическая характеристика ацетонитрида: Автореф. дис. ... канд. мед. наук.— Ярославль, 1966.
7. Hashimoto K., Kanai R. // *Ind. Hlth.*— 1965.— Vol. 30, N 3.— P. 30—46.
8. Misra A., Gupta G. S. D., Dutta K. K., Ray P. K. // *J. Toxicol. dip. exp.*— 1988.— Vol. 8, N 1.— P. 3—10.
9. Sedlak J., Lindsay R. H. // *Anal. biochem.*— 1968.— Vol. 25, N 1—3.— P. 192—205.
10. Vernon H. M. // *J. Physiol.*— 1911.— Vol. 42.— P. 402—432.
11. Willhite C. C., Smith R. P. // *Toxicol. appl. Pharmacol.*— 1981.— Vol. 59, N 3.— P. 589—602.

Поступила 13.11.89

DYNAMICS OF CYTOCHROME OXIDASE ACTIVITY AND GLUTATHIONE CONTENT IN TISSUES OF RATS INTOXICATED WITH POTASSIUM CYANIDE AND NITRILES

S. A. Kutsenko, V. V. Shilov

S. M. Kirov Military Medical Academy, Leningrad

Rats were intoxicated with LD₅₀ of potassium cyanide and some nitriles. Content of glutathione in brain and liver tissues and activity of cytochrome oxidase in brain were studied. Activity of brain cytochrome oxidase was inhibited in rats intoxicated with cyanide, acrylonitrile and valeronitrile. All the nitriles studied reduced the tissue glutathione content. Cyanides did not exhibit any effects on glutathione concentration.

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 1991

УДК 616-008.6-089.816: [616.36-008.8:541.138]-78

Ю. Б. Васильев, В. И. Сергиенко, В. А. Гринберг, А. К. Мартынов

УДАЛЕНИЕ ТОКСИНОВ ИЗ ОРГАНИЗМА С ПОМОЩЬЮ ЭЛЕКТРОХИМИЧЕСКОГО ОКИСЛЕНИЯ

Институт электрохимии им. А. Н. Фрумкина АН СССР, НИИ физико-химической медицины Минздрава РСФСР, Москва

Одним из аспектов экологической проблемы является охрана внутренней среды человека. У здорового человека эта функция в значительной степени осуществляется монооксигеназной системой печени, способствующей удалению из организма гидрофобных токсичных веществ путем их гидроксигирующего окисления молекулярным кислородом, катализируемого специальным детоксицирующим ферментом цитохромом P-450 [1, 12, 17].

Большое внимание биологов и медиков привлекает проблема создания искусственных систем, способных моделировать детоксицирующие функции печени. Это обусловлено тем, что существующие методы экстракорпоральной детоксикации (гемодиализ, гемосорбция) обладают недостаточной эффективностью по удалению гидрофобных токсинов [9, 11].

Электрохимические методы могут быть использованы для очистки от ядовитых и балластных веществ крови и тканей путем их гидроксигирующего окисления. Впервые идея моделирования детоксицирующей функции печени с помощью электрохимического окисления была сформулирована ранее [7, 11, 18]. Однако, несмотря на большой интерес к методу электрохимического

окисления, он не нашел клинического применения, так как первые исследования не касались существа проблемы, а лишь рассматривали принципиальную возможность детоксикации организма прямым электроокислением крови и других биологических жидкостей. Аппараты электрохимического окисления использовались лишь в стендовых опытах на модельных растворах и не давали представления о влиянии электрохимического окисления на биологические жидкости организма.

В настоящей работе проведены систематические исследования с целью выяснения принципиальной возможности электроокисления гидрофобных токсинов в крови, лимфе и плазме, изучения кинетики и механизма окисления типичных токсинов, определения влияния электрохимического окисления на различные показатели гомеостаза интактных животных, а также с тем, чтобы показать, насколько электрохимическое окисление эффективно при использовании на уровне организма.

Методика. На основе предварительных стендовых исследований был создан аппарат электрохимического окисления крови для клинического использования. Аппарат моделирует детоксицирующую функцию печени с помощью прямого окисления и состоит из реакционной ячейки и блока питания с контролирующими приборами. Электрохимическая ячейка объемом 30—150 мл выполнена из прозрачной пластмассы, имеет входной и выходной штуцеры. Электроды: анод — полированная платиновая проволока, d=0,3 мм, l=65 мм, катод — полированная никелевая пластина, S=40 см². Предусмотрена вибрация электродов, амплитуда движения ~2 мм. Движение электродов при действии вибрационного устройства получается двояким, в нем сочетается возвратно-поступательное движение с вращательным. Реакционная ячейка закрепляется на штативе, что позволяет регулировать ее высоту по отношению к уровню тела пациента. Прибор можно легко включать в контур с другими детоксицирующими устройствами, например гемосорбционной колонкой, аппаратом для гемодиализа.

В качестве основного вещества для изучения режимов работы аппарата, моделирующего детоксицирующую функцию печени с помощью прямого электрохимического окисления, был выбран билирубин, так как реакция его окисления в микросомах печени хорошо изучена [16] и легко контролируется визуально и спектрофотометрически. Концентрацию билирубина в растворе определяли спектрофотометрически (используя калибровочную кривую «Био-латест билирубин», «Лахема», Чехословакия) на приборах «Spectrotlon-402» и 410 (Венгрия). Спектрофотометрические определения содержания билирубина проводили при двух длинах волн — 430 и 480 нм. Регистрировали абсолютный и дифференциальный спектр билирубина на приборе «Unicam SP-8000» (Кембридж, Англия) в пределах длин волн 350—550 нм. Одновременно с определением концентрации билирубина ставили опыты по определению острой токсичности на мышах (всего 600 мышей) с блокадой РЭС [13]. Стендовые опыты проводили как с модельными растворами билирубина, так и с плазмой крови детей, больных гемолитической болезнью новорожденных.

На интактных животных (всего 54 беспородные собаки, масса тела от 6 до 13 кг) исследовали влияние электрохимического окисления на нормальные показатели гомеостаза (26 животных) и на скорость выведения билирубина из организма (14 подопытных животных + 14 животных контрольной группы). У собак под гексеналовым наркозом катетеризировали бедренную артерию и вену и по артериовенозному контуру подключали аппарат электрохимического окисления (аппарат и магистрали подвергали предварительной силиконизации). Перед началом перфузии животному вводили гепарин («Гедон Рихтер», Венгрия) из расчета 500 ед. на 1 кг массы тела животного. Кровь из артерии поступала в реакционную ячейку, затем возвращалась в бедренную вену. Окисление проводили в течение 2 ч при скорости потока крови через ячейку 50 мл/мин. Морфологические показатели крови исследовали до начала окисления и через 15, 30, 60 и 120 мин окисления. Производили подсчет количества эритроцитов, лейкоцитов, определение развернутой лейкограммы, содержания гемоглобина, свободного гемоглобина плазмы, гематокрита. Одновременно изучали биохимические параметры крови на аппаратах «Centrifichem-400» и 12- и 6-канальных анализаторах.

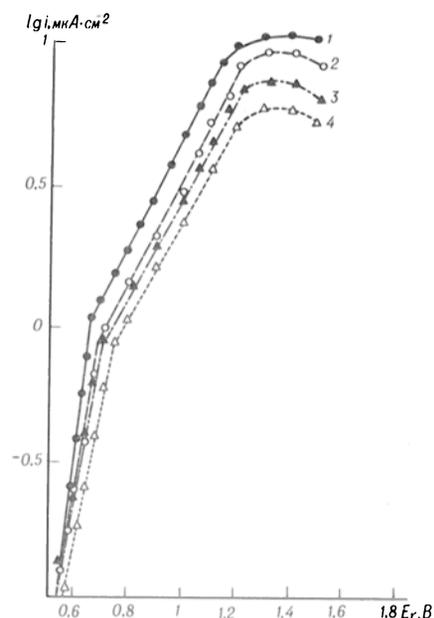


Рис. 1. Поляризационные кривые электроокисления билирубина в фосфатном буферном растворе pH 7,4 на гладком платиновом электроде при различных объемных концентрациях: 1 — 25 мг %; 2 — 15 мг %; 3 — 10 мг %; 4 — 2 мг %.

торах «SMAC Autoanalyzer System» («Техникон», США). Кислотно-щелочное состояние и газовый состав крови исследовали на аппарате «Микро-Аструи АВС-2» («Radiometer Copenhagen»). На 7 собаках изучали состояние свертывающей системы крови в процессе электрохимического окисления. Определяли количество тромбоцитов, время рекальцификации, толерантности крови к гепарину, тромбластиновое время по Квику, концентрацию фибриногена. Тромбоэластографические кривые регистрировали на тромбоэластографе «Хеллиге» (ФРГ). Изучали хемилюминесценцию сыворотки крови. Показатели состояния центральной и периферической гемодинамики в процессе электроокисления регистрировали на аппарате «Mingograph-82» («Siemens-Elema», ФРГ). После окончания экспериментов животных забивали и брали образцы тканей для гистологического исследования.

Результаты и обсуждение. Электроокисление органических веществ может происходить на различных электродах, однако большинство типичных токсинов с заметной скоростью окисляются только на электродах-катализаторах из металлов платиновой группы. Платиновый электрод является наиболее подходящим катализатором для моделирования гидроксимирующей функции цитохрома P-450, так как на нем подвергается окислению практически все токсины. В предварительных экспериментах было исследовано электроокисление на платиновом аноде различных токсинов эндогенного происхождения: билирубина, холестерина, мочевины [6], глюкозы [3], ксенобиотиков: метанола [2], этанола, фенола [10], формальдегида [8], производных барбитуровой кислоты [5]. В фосфатных буферных растворах и

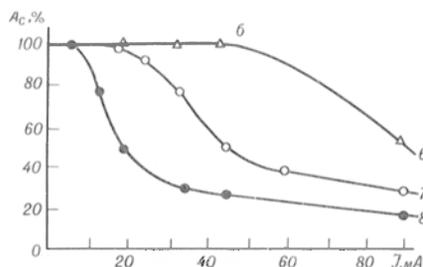
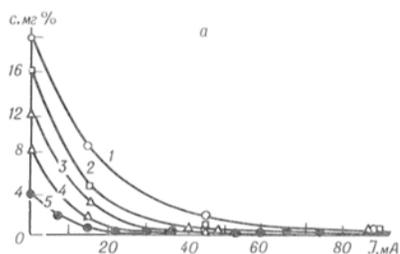


Рис. 3. Влияние токовой нагрузки на концентрацию билирубина в растворах различной исходной концентрации после 10 мин электролиза (а) и на выход по току в первые 3 мин электролиза (б). 1 — 6 — 20 мг %; 2 — 16 мг %; 3 — 12 мг %; 4 — 7 — 8 мг %; 5 — 8 — 4 мг %.

Рис. 2. Изменение концентрации билирубина во времени при различных токовых нагрузках на электрод в растворе 0,9 % NaCl pH 7,4 (а) (1 — 14 мА; 2 — 45 мА; 3 — 90 мА) и при токовой нагрузке 14 мА, но при различных исходных концентрациях билирубина (б).

физиологическом растворе на платиновом электроде происходит прямое электроокисление молекулы токсина на поверхности электрода, обычно протекающее через стадию хемосорбции. На рис. 1 приведены поляризационные кривые электроокисления билирубина на платиновом электроде в фосфатном буферном растворе. Изучено влияние различных параметров (концентрация токсина, поверхностная и объемная плотность тока, природа электродов, частота вибрации электродов, скорость и направление перфузии биологической жидкости) на электрохимическое окисление билирубина в физиологическом растворе и в крови. При окислении ярко-оранжевый раствор билирубина переходит в зеленый раствор и далее образует бесцветные продукты, не определяемые спектрофотометрически. Продукты электрохимического окисления билирубина идентичны тем, которые образуются при окислении билирубина в печени [16, 19].

Токовая нагрузка на электролизер — один из главных параметров процесса электрохимического окисления токсина. Результаты экспериментов в модельных растворах билирубина показали (рис. 2—3), что при увеличении силы тока, подаваемого на электроды, скорость окисления билирубина повышается. Однако наибольший прирост скорости окисления раствора билирубина (4 мг %) отмечается при тока меньше 14 мА ($j_a = 8,6 \text{ мА/см}^2$), далее этот прирост резко уменьшается. С увеличением объемной концентрации билирубина критическое значение тока (плотности тока) возрастает. Это критическое значение плотности тока связано с достижением максимального (предельного) тока окисления билирубина, кото-

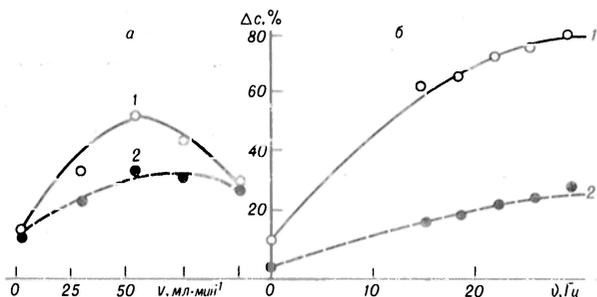


Рис. 4. Влияние скорости и направления перфузии раствора (а) и частоты вибрации электрода (б) на уменьшение концентрации билирубина вследствие его электроокисления при $I = 14$ мА.

а — $C_{\text{бил}} = 20$ мг % билирубина, $t_{\text{окисл}} = 15$ мин; 1 — направление перфузии сверху вниз; 2 — снизу вверх; б — $C_{\text{бил}} = 16$ мг % билирубина; 1 — $t_{\text{окисл}} = 10$ мин; 2 — $t_{\text{окисл}} = 3$ мин.

рый, как показывают результаты изучения влияния вибрации электрода и перфузии раствора (рис. 4), носит частично диффузионный характер. При переходе плотности тока через это критическое значение выход по току процесса окисления резко падает. Уменьшение плотности тока ниже этого критического значения (например, при токе 14 мА путем платинировки исследуемого анода до фактора шероховатости, $\gamma = 400$ или замены его гладкой платиной с в 100 раз большей поверхностью) при одной и той же токовой нагрузке не влияет на скорость окисления билирубина. Однако при одной и той же токовой нагрузке увеличение истинной поверхности электрода приводит к резкому возрастанию травмы крови вследствие увеличения числа форменных элементов крови, попадающих в поле двойного электрического слоя. Поэтому предложение, сделанное в работе [18], об использовании электродов с развитой поверхностью, по-видимому, является ошибочным. Электролиз крови для удаления токсинов целесообразно вести на гладких платиновых электродах при плотностях тока, близких к плотности предельного тока окисления токсина.

Кровь, плазма, лимфа и другие биологические жидкости — это негомогенные и очень сложные многокомпонентные системы. Поэтому при переходе от модельных физиологических растворов к изучению электроокисления крови и других биологических жидкостей мы столкнулись с рядом серьезных проблем.

Первая проблема — работоспособность электрохимической ячейки в крови или другой биологической жидкости. При контакте крови с электродами электрохимической ячейки наблюдается тромбообразование, поверхность электродов быстро покрывается белками и разрушенными форменными элементами, которые блокируют поверхность электродов, и процесс электроокисления токсических веществ в крови прекращается. Для борьбы с этим явлением нами предложены два метода: метод вибрирующих электродов [15] и метод электроокисления в кипящем слое [4]. Показано, что вибрация электродов при работе в крови и биологической жидкости препятствует образованию на поверхности электрода конденсированной пленки из белков и форменных элементов и обеспечивает нормальное протекание

тока через ячейку. Оптимальной является частота ~ 22 Гц, амплитуда ~ 2 мм.

Метод электроокисления в кипящем слое заключается в том, что процесс проводят при высоких плотностях тока, когда основная часть тока тратится на электролиз воды с выделением кислорода и водорода. Выделяющиеся пузырьки газов создают у электродов кипящий слой, препятствующий образованию на поверхности электрода конденсированной пленки из белков и форменных элементов. Оба метода обеспечивают нормальную работу электродов в крови и других биологических жидкостях.

Вторая проблема была связана с так называемым «эффектом белковой защиты». При переходе от окисления токсина в физиологическом растворе к окислению токсина, находящегося в крови или другой биологической жидкости, наблюдается резкое снижение парциальной скорости окисления. Это объясняется связыванием токсина с альбумином с образованием комплекса, который не подвергается прямому окислению на электроде. Белковая молекула препятствует подходу к поверхности электрода и адсорбции на ней ксенобиотика и его прямому окислению.

В крови 99 % билирубина находится в связанном с альбумином состоянии. Нами было изучено влияние концентрации альбумина на окисление билирубина. Добавление альбумина к физиологическому раствору при условиях, которые обеспечивают 100 % окисление билирубина, приводит к тому, что окисляется не более 74 ± 5 %. Переход же к плазме детей, больных ГБН, полученной в процессе замениого переливания крови, приводит к тому, что окисляется только 15 % билирубина. Как видно из рис. 5, на поляризационной кривой платинового электрода при введении в раствор, содержащий билирубин, альбумина токи окисления билирубина резко падают. При этом, как показывают исследования на электроде с обновляемой поверхностью, падение токов не связано с адсорбцией альбумина и с блокировкой поверхности электрода, а связано с исчезновением окисляющегося вещества из раствора.

Сульфаниламиды, ацетилсалициловая кислота, мочевина обладают большим сродством к альбумину, чем билирубин. Они могут вытеснять билирубин из его комплекса с альбумином [14]. И действительно, как видно из рис. 5, если к раствору билирубина с альбумином добавить мочевины, то на платиновом электроде появляются токи окисления билирубина (мочевина при этих условиях практически не окисляется). В препаративном электролизе раствора билирубина, содержащего альбумин в присутствии 1,5 г % мочевины, уровень окисления билирубина возрастал до 92 %, а в плазме детей, больных ГБН, до 41 %.

Таким образом, «эффект белковой защиты» является важнейшим фактором, приводящим к резкому снижению эффективности прямого электроокисления токсинов в крови и других биологических жидкостях. Если бы не присутствие в физиологических растворах ионов хлора, «эффект белковой защиты» сделал бы невозможным электроокисление токсинов (в отсутствие хлор-ионов введение альбумина полностью подавляет окисление билирубина). В растворах, содержащих

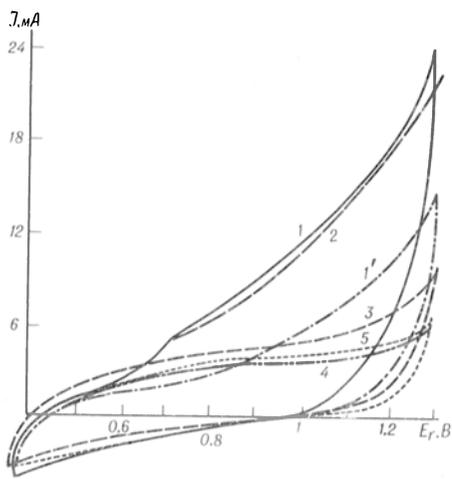


Рис. 5. Влияние альбумина и мочевины на электроокисление билирубина на платиновом электроде в фосфатном буферном растворе, содержащем 0,9 % NaCl, pH 8,4 ($\tau_{\text{адс}} = 15$ мин).

1 — 8 мг % билирубина (первый импульс); 1' — второй импульс; 2 — 8 мг % билирубина + альбумин + 2 мг % мочевины; 3 — альбумин; 4 — 8 мг % билирубина + альбумин; 5 — фон.

хлор-ионы в присутствии альбумина, в значительной степени изменяется механизм окисления токсина: окисление в значительной степени становится опосредованным. На поверхности электрода основным электродным процессом становится разряд ионов хлора.

Третья проблема — совместимость электрохимической ячейки с кровью. Показано, что в первую очередь травмирующее воздействие электроокисления на кровь связано с плотностью тока, протекающего через ячейку. При одной и той же токовой нагрузке увеличение истинной поверхности электрода приводит к резкому возрастанию травмы крови вследствие увеличения числа форменных элементов крови, попадающих в поле двойного электрического слоя.

На основе изучения нормальных показателей гомеостаза интактных животных в течение 2 ч электрохимического окисления показано, что при токе 14 мА (плотность тока на аноде $8,6 \text{ мА/см}^2$), скорости перфузии крови 54 мл/мин через ячейку объемом 30 мл практически все биохимические показатели крови остаются в пределах видовой нормы. Морфологический состав крови изменяется незначительно, как и при гемосорбции на непокрытых сорбентах. Изучение свертывающей системы крови показало, что в результате внутривенного введения гепарина в дозе 5 мл/кг развивается устойчивый антикоагуляционный эффект, позволяющий проводить электрохимическое окисление крови в течение 2 ч. К концу эксперимента в кровотоке оставалось до 70 % тромбоцитов (по сравнению с гепариновым фоном). Максимальное тромбоцитопеническое действие электроокисления наблюдало в первые 30 мин контакта крови с ячейкой. Через 1 сут после проведения электрохимического окисления отмечена практически полная нормализация показателей гемокоагуляции.

При токах выше 20 мА (анодная плотность тока 13 мА/см^2) электрод, несмотря на вибрацию, быстро блокировался фибрином и прохождение тока почти прекращалось. При этом изменения в

крови превышали допустимые, а при токах выше 22 мА наблюдался выраженный гемолиз. Поэтому ток 14 мА ($j_a = 8,6 \text{ мА/см}^2$) был выбран как рабочее значение для испытаний на животных и в клинике.

Метод прямого электрохимического окисления изучали на собаках с экспериментальной гипербилирубинемией, моделью механической желтухи и ожоговой бактериемии. Оказалось, что включение электролизера повышало эффективность удаления билирубина из кровяного русла на 50 % по сравнению с животными, которым на такое же время накладывали артериовенозный шунт. У подопытных животных отмечено снижение содержания холестерина в плазме крови на 30 %.

Механическую желтуху у собак воспроизводили с помощью двойной перевязки общего желчного и пузырного протоков. Использование электрохимического окисления позволило увеличить выживаемость животных более чем в 2 раза. У собак с ожоговой травмой (30 % поверхности тела) в стадии бактериемии проводили электрохимическое окисление на протяжении 2 ч. Через 20—60 мин у них отмечены подавление роста грамотрицательной микрофлоры и уменьшение количества колоний грамположительных бактерий.

Проведенные исследования показали возможности электрохимического окисления в моделировании функции монооксигеназ печени, а также в создании электрохимической модели монооксигеназной системы печени. Подробное изучение электрохимического окисления различных токсинов прямо в крови и других биологических жидкостях, исследования совместимости электрохимической ячейки с кровью позволили создать искусственную детоксицирующую систему клинического назначения.

ЛИТЕРАТУРА

1. Арчаков А. И. Микросомальное окисление. — М., 1975. — С. 327.
2. Bagotzky N. S., Vassiliev Yu. B. // *Electrochim. Acta.* — 1967. — Vol. 12. — P. 1323; 1966. — Vol. 11. — P. 1439.
3. Vassilyev Yu. B., Khazova O. A., Nikolaeva N. N. // *J. Electroanal. Chem.* — 1985. — Vol. 196. — P. 105, 127.
4. Васильев Ю. Б., Сергиенко В. И., Гринберг В. А., Мартынов А. К. А. с. СССР 1175494 // *Бюл.* № 32. — 1985.
5. Васильев Ю. Б., Гринберг В. А., Тусеева Е. К., Чеков П. А. // *Электрохимия.* — 1986. — Т. 22.
6. Громыко В. А., Цыганкова Т. Б., Гайдадымов В. Б., Васильев Ю. Б. // Там же. — 1973. — Т. 9. — С. 1685; 1974. — С. 57; 1975. — Т. 11. — С. 49, 589; 1979. — Т. 15. — С. 1218.
7. Жирнов Г. Ф., Изотов М. В., Карузина И. И. и др. // *Вопр. мед. химии.* — 1979. — № 2. — С. 218.
8. Кулиев С. А., Осетрова Н. В., Багоцкий В. С., Васильев Ю. Б. // *Электрохимия.* — 1980. — Т. 16. — С. 1091.
9. Комаров Б. Д., Лужников Е. А., Шиманко И. И. Хирургические методы лечения острых отравления. — М., 1981. — С. 270.
10. Левина Г. Д., Колосова Г. М., Васильев Ю. Б. // *Электрохимия.* — 1977. — Т. 13. — С. 1091.
11. Лопухин Ю. М., Молоденков М. Н. // *Гемосорбция.* — М., 1978.
12. Метеллица Д. И. Активация кислорода ферментными системами. — М., 1982; // *Успехи химии.* — 1981. — Т. 50. — С. 2019; 1982. — Т. 51. — С. 1818.
13. Недошвина Р. В. // *Пат. физиол. и экпер. терап.* — 1972. — Т. 2. — С. 39.
14. Пунченко П. А. // *Вопр. охр. мат.* — 1975. — № 8. — С. 15.
15. Сергиенко В. И., Мартынов А. К., Ханилов Н. В. А. с. 1074493 СССР // *Бюл.* — 1984. — № 7.

16. Тодоров Й. Клинические лабораторные исследования в педиатрии. — София, 1961.
 17. Biological Hydroxylation Mechanisms / Eds C. S. Boyd, R. M. S. Smellie. — New York, 1972. — P. 240.
 18. Yao S. J., Wolfson S. K. Patent USA N 3878564. 22.04.75.
 19. Zentzer W., Bronn A. // Amer. J. Dis. Child. — 1961. — P. 101, 113, 152—163.

Поступила 10.09.89

ELECTROCHEMICAL OXIDATION OF TOXINS IN VIVO FOR THEIR REMOVAL

Yu. V. Vasilev, V. I. Sergienko, V. A. Grinberg, A. K. Martynov
 Institute of Electrochemistry, Academy of Sciences of the

USSR, Institute of Physico-Chemical Medicine, Ministry of Public Health of the RSFSR, Moscow

Potentialities of electrochemical procedures were considered in simulation of liver monooxygenases functions directed to clearance of blood and tissues from toxic and ballast substances by means of hydroxylating oxidation. Electrooxidation of specific endogenous toxin bilirubin, catalyzed by platinum electrode, was studied in model physiological solutions, blood, lymph and blood plasma. Three problems developed during direct electrooxidation of toxins in blood: efficiency of electrochemical cell, "protein protection" of the toxin, compatibility of electrochemical cell and blood. Influences of electrochemical oxidation on various patterns of intact animal homeostasis were studied as well as efficiency of the oxidation in a body was shown. Artificial detoxicating system was elaborated for clinical purpose using these experimental data.

МЕТОДЫ БИОХИМИЧЕСКИХ ИССЛЕДОВАНИЙ

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 1991

УДК 616-008.9-074:658.52.011.56

И. И. Горшкова, Г. Г. Шаповский, О. Л. Сорокина

ПРОТОЧНО-ИНЖЕКЦИОННЫЙ АНАЛИЗ В КЛИНИЧЕСКОЙ БИОХИМИИ

Новосибирский институт биоорганической химии СО АН СССР, СКТБ специальной электроники и аналитического приборостроения СО АН СССР, Новосибирск

Проблема автоматизации рутинных анализов остро стоит во всех областях, где используются методы «жидкой химии», в частности в медицине, особенно при массовых обследованиях. Ручной метод анализа включает отбор пробы, отбор реагентов, их смешивание, инкубацию, измерение аналитического сигнала и затем расчет концентрации исследуемого вещества. Автоматизация такой процедуры при гарантированном увеличении точности анализов должна привести к экономии времени и реагентов.

Впервые идею непрерывного проточного анализа (НПА) жидких образцов сформулировал Л. Скеггс в 1957 г. [54]. В середине 70-х годов Я. Ружичка и Э. Хансен [45], К. Стьюарт [56] параллельно предложили новую разновидность НПА — проточно-инжекционный анализ (ПИА). Используя вначале как метод анализа неорганических ионов, ПИА завоевывает новые области применения, такие как органическая химия, биохимия, экология, медицина, фармакология и др. Число публикаций по ПИА растет экспоненциально и в настоящее время приближается к 2000 [51]. Среди них несколько монографий [6, 50], большое количество обзоров [4, 49, 51, 55]. Около 20% всех публикаций посвящено клиническим биохимическим анализам.

К сожалению, в отечественной литературе существует единственный обзор по ПИА [2], в котором внимание авторов сконцентрировано в основном на методиках промышленного анализа неорганических ионов и демонстрации возможностей ПИА как самого дешевого и высокопроизводительного метода автоматизированного массового анализа жидкостей. Учитывая это, мы

посчитали целесообразным систематизировать и обобщить материал о применении метода в клинической биохимии.

В автоанализаторах Скеггса, выпускаемых фирмой «Техникон» (США), поток жидкости, проходящий через трубчатый реактор, фрагментируется пузырьками воздуха, что обеспечивает эффективное перемешивание растворов и в то же время снижает гидродинамическое размывание пробы и взаимозагрязнение соседних проб. В подобных системах с помощью специальных устройств производится отделение воздуха (дегазация) непосредственно перед детектором.

ПИА основан на введении (инъекции) определенного объема образца в непрерывный поток носителя, при этом образец становится частью потока. При большой скорости потока, малом объеме вводимой пробы и достаточно узкой трубке (капилляре) отдельные пробы не смешиваются друг с другом, а лишь немного разбавляются жидкостью-носителем и представляют собой жидкую зону анализируемого вещества. Это позволяет отказаться от разделения (сегментирования) зоны пузырьками воздуха, как это делается в автоанализаторах Скеггса. Насос обеспечивает постоянное течение носителя и реагента, в системе отсутствуют сжимаемые сегменты воздуха, в результате время пребывания образца в системе жестко контролируется. Компоненты реакционной смеси смешиваются путем слияния потоков образца и реагентов. После слияния продолжается процесс размывания зоны образца в потоке, происходит смешивание с реагентом, частичное разбавление зоны образца реагентом и начинается химическая реакция.

На рис. 1 показана система ПИА для одного

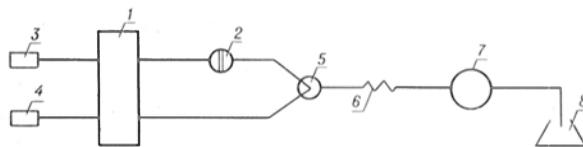


Рис. 1. Система ПИА для одного реагента.

1 — насос; 2 — инжектор; 3 — носитель; 4 — реагент; 5 — смеситель; 6 — реактор; 7 — детектор; 8 — слив.

реагента. Система может быть одноканальной, если в качестве носителя используется реагент. В двухканальной системе реагент может инжектироваться, подобно образцу, в виде зоны (метод перекрывающихся зон). Если при попадании зоны образца в детектор реакция не прошла на достаточную для детектирования глубину, поток может быть остановлен на любое время для более полного протекания реакции (метод остановленного потока). Во всех приборах, выпускаемых фирмами, и в большинстве самодельных установок используются перистальтические насосы. Проба обычно вводится с помощью ротационного клапана с петлевым дозатором, как при обычной ВЭЖ-хроматографии.

Степень разбавления пробы (дисперсия) по мере приближения к детектору зависит от ряда факторов: объема образца, длины и диаметра реакционной трубки, скорости потока. Наиболее часто в практических работах определяется так называемая дисперсия по Ружичке $D = C_0/C$, где C_0 — исходная концентрация исследуемого компонента в пробе, C — концентрация, соответствующая максимуму регистрируемого сигнала. Когда зона анализируемого вещества достигает детектора, ни химическая реакция, ни физический процесс разбавления не достигают стационарного состояния. Несмотря на это, можно определять концентрацию исследуемого образца, сравнивая получаемый сигнал с сигналами стандартных растворов, инжектированных таким же способом, как и образец. Именно в этом состоит фундаментальное отличие ПИА от традиционных методов анализа и от метода Скэггса, в которых измерения проводятся, когда закончились процессы перемешивания.

На рис. 2 представлена типичная зависимость сигнала детектора от времени. Кривая отражает непрерывное распределение концентрации продукта реакции и имеет форму асимметричного пика. Высота и форма пика зависят от параметров системы и типа химической реакции. Способы обработки ПИА-грамм могут быть самыми разнообразными: можно измерять высоту пика (это используется в основной массе работ), площадь пика, ширину пика на определенной высоте. Во всех случаях существует возможность расчета концентрации исследуемого образца с помощью определяемых параметров.

Кроме экономии времени при определении концентрации образцов, ПИА дает много новых возможностей для аналитической химии. Одна из них — градиентная техника [48]. По мере продвижения образца по проточной системе он размывается и создается его концентрированный градиент. Любая концентрация от нулевой до максимальной представлена в диспергированной зоне образца. Поскольку каждая концентрация связана со своим временем пребывания образца в системе, во всей ПИА-грамме содержится информация не только о концентрации исследуемого образца, но и о кинетике протекаемой реакции. Например,

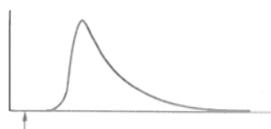


Рис. 2. Зависимость сигнала детектора от времени.

По вертикали — амплитуда сигнала, по горизонтали — время. Стрелка — момент инжекции.

метод остановленного потока дает возможность исследовать кинетику реакции при любой выбранной концентрации образца. Концентрация может быть выбрана простым изменением времени остановки.

В ПИА используются разнообразные способы детектирования. В этом смысле ПИА является не методом анализа, а скорее способом реализации различных методов анализа. В большинстве работ используется фотометрический принцип детекции (42 %). Около 28 % приходится на другие оптические методы (флуориметрия, турбидиметрия и др.), примерно столько же (29 %) — на электрохимический и около 1 % — на другие способы детекции.

Применению ПИА в клинической химии уделяется внимание в ряде общих обзоров, существует небольшое число обзоров, посвященных исключительно ПИА в клинике [22, 39, 38]. Основная масса опубликованных работ содержит либо описание адаптации известных способов определения различных веществ к режиму ПИА, либо разработку новых способов определения физиологически значимых веществ, круг которых постоянно расширяется. Большинство конкретных разработок делается на самодельных установках. В последние годы чаще используется оборудование, производимое фирмами (например «Текатор», Швеция). Описанные в литературе методы мы условно разделили на 4 группы в зависимости от химической процедуры. К 1-й группе мы отнесли методы определения компонентов сыворотки крови, основанные на обычной «неферментативной» химии, к 2-й — методы определения субстратов с помощью ферментов, к 3-й — методы определения активности ферментов, к 4-й — методы иммунохимического анализа (ИХА).

Рассмотрим 1-ю группу методов (табл. 1). В области аналитической неорганической химии накоплен большой экспериментальный и методический материал, который может быть переведен и уже переводится в режим ПИА.

Содержание ионов хлора в сыворотке крови определяют по их способности вытеснять ион роданида из тиоцианата ртути, который реагирует с ионом Fe^{3+} , давая окрашенное соединение [36]. Предложен фотометрический способ определения фосфата и хлорида [11, 45]. При определении этих компонентов в клинических анализах используют диализатор для удаления мешающих ионов, одновременно получая соответствующее разбавление.

Описан фотометрический метод определения ионов кальция в сыворотке крови по образованию окрашенного комплекса с о-крезолфталеином, а также одновременное потенциометрическое определение содержания Ca^{2+} и pH [13]. Содержание ионов Ca^{2+} в сыворотке крови определяют по ее каталитическому эффекту в окислительно-восстановительной реакции в системе $Fe^{3+}/S_2O_3^{2-}$ [34], а также в системе 2,2'-дипиридилкетон гидразон (ДПКГ)/перекись водорода [19]. В первом случае индикаторную реакцию включает инжекция образца и тиосульфата в циркулирующий в замкнутой системе поток $Fe(SCN)_3$. Развитие реакции тестируется по исчезновению красной окраски роданида железа. Во втором случае реакцию включает инжекция образца и перекиси

Неферментативные способы определения веществ

Определяемое вещество	Способ детекции	Объем пробы, мкл	Диапазон измерений	Коэффициент вариации, %	Производительность, число образцов в 1 ч	Источник
Cl ⁻	Фотометрия	6	50—150 мМ	1,0	180	[36]
Cl ⁻	»	60	50—150 мг/л	1,5	125	[11]
PO ₄ ³⁻	»	200	10—60 мг/л	0,9	130	[11]
Ca ²⁺	Фотометрия, потенциометрия	30	5·10 ⁻⁴ —5·10 ⁻³ М	1,0	100	[13]
Cu ²⁺	Фотометрия	20	0,25—20 мг/л	2	325	[34]
Cu ²⁺	Флюориметрия	60	0,2—300 нг/мл	1,4	72	[19]
Pb ²⁺	Атомно-абсорбционная спектрометрия	250	0,3—4,5 мкм/л	5	100	[30]
Na, K, Ca Mg, Li, Cu, Zn, Fe и др.	Индуктивно связанная плазма	10—20	0,5—3·10 ³ мг/л 0,01—10 мг/л	0,5—1,5	60—240	[3, 26]
Na ⁺ , K ⁺	Потенциометрия	200	10 ⁻³ —10 ⁻² М	0,8	90	[46]
K ⁺	»	20	10 ⁻³ —10 ⁻² М	2	60	[62]
Альбумин	Фотометрия	8	0—60 г/л	—	300	[27]
»	»	0,24	0—70 г/л	1,2	120	[40]
»	»	2	0—60 г/л	1	120	[35]
»	Флюориметрия	50	—	—	180	[5]
»	Фотометрия	10	20—60 г/л	2	30	[37]
»	»	2	0—80 г/л	1,5	180	[42]
Общий белок	»	20	0—100 г/л	2,5	150	[53]

водорода в поток ДПКГ, продукт окисления которого тестируется флюориметрически.

Предложена система для определения содержания свинца в сыворотке крови с помощью пламенной атомно-абсорбционной спектрометрии [30]. Описан метод быстрого одновременного определения ионов Na⁺, K⁺, Ca²⁺, Mg²⁺, Cu²⁺, Zn²⁺, Fe³⁺ в сыворотке крови на базе спектроскопии индуктивно связанной плазмы [3, 26]. В данном случае проточно-инжекционная система используется как способ непрерывного подвода образцов к распылителю. Известны проточно-инжекционные методы определения содержания в крови ионов K⁺ и Na⁺ с использованием в качестве детекторов ион-селективных электродов [46, 62]. На первый взгляд при подобного рода потенциометрических измерениях нет явной необходимости в проточных системах, так как возможно прямое погружение электродов в исследуемые образцы. Однако использование погружных электродов требует больших объемов пробы, а также определенного времени установления равновесия в системе. Использование проточно-инжекционной системы дает значительную экономию, во-первых, аналитического материала, а во-вторых, времени за счет возможности вести измерения в динамическом режиме. Последнее обеспечивается воспроизводимостью распределения образца в пределах зоны, проходящей через детектор, а также стабилизацией зависящих от скорости потока характеристик околоэлектродного слоя.

Большой интерес представляет определение органических соединений, таких, как общий белок, альбумин и др. Для определения альбумина сыворотки крови широко используется его реакция с бромкрезоловым зеленым (БКЗ). Трудности в определении альбумина с помощью ПИА связаны в основном с его слишком высокой концентрацией, требующей предварительного разбавления образцов [27, 40]. Достаточно низкая для получения оптимального сигнала концентрация альбу-

мина достигается с помощью метода перекрывающихся зон. Зоны образца и реагента подаются не синхронно, а так, чтобы пик зоны реагента смешивался с относительно разбавленным «хвостом» зоны образца [27]. Высокая производительность системы сочетается с увеличением специфичности реакции БКЗ с альбумином, так как уменьшается влияние глобулинов, вклад которых в регистрируемый сигнал увеличивается с увеличением времени инкубации.

Другой способ определения альбумина с БКЗ, также не требующий предварительного разбавления сыворотки, основан на прямом всасывании образца в непрерывный поток носителя. Зона образца даже смешивается с реагентом, который в данном случае подается постоянно [40]. Описано аналогичное определение альбумина [35], отличающееся тем, что образец не всасывается, а инжектируется в поток носителя. Концентрация альбумина определяется по площади пика. Альбумин также определяют в предварительно разбавленном образце сыворотки с помощью флюоресцентной метки ANS (натриевая соль 8-анилино-1-нафталин сульфокислоты) [5].

Бромкрезоловый пурпурный считается более специфическим реагентом на альбумин, чем БКЗ: образец инжектируется непосредственно в поток реагента. В системе достигается большая [45] дисперсия образца, поэтому не требуется предварительного разбавления [37, 42]. Адаптирован к ПИА широко известный метод Лоури для количественного определения белка. Метод предполагает последовательное использование 2 реагентов. Образец инжектируется в поток носителя. Сформированная зона образца смешивается последовательно с одним, а затем с другим реагентом [52]. Корреляция с ручным методом составляет 99,8 %.

Адаптирован к ПИА обычно используемый в клиниках биуретовый метод определения общего белка [53]; образец инжектируется в поток носителя, а сформированная зона образца сме-

Использование ферментов в ПИА

Определяемое вещество	Способ детекции	Фермент	Объем пробы, мкл	Диапазон измерений	Кэф-фициент вариации, %	Произво-дитель-ность, число образцов за 1 ч	Источник
Глюкоза	Фотометрия	ГДГ	100	2—20 мМ	2,0	60	[12]
»	»	ГДГ	10—26,5	0—15 мМ	2,0	120	[47]
»	»	ГДГ	23	0—500 мг/дл	2,5	120	[43]
»	Флюориметрия	ГО+ПО	10	—	2,5	—	[17]
»	Фотометрия	ГО+МР+ПО	10	50—200 мг/дл	2,1	100	[61]
»	»	ГО	1	0—300 мг/дл	2,1	20	[59]
»	»	ГО	10	0—400 мг/дл	21,5	30	[60]
»	Амперометрия	ГО	10—20	5—500 мг/дл	1,7	700	[63]
»	»	ГО*	5	1—800 мг/дл	1	100	[67]
Этанол	Фотометрия	ЛДГ	30	12,8—32 мг/л	2	80	[64]
»	Флюориметрия	ЛДГ	50	0,125—2 г/л	1,5	40	[7]
»	Фотометрия	ЛДГ*	50	0,5—28 мкг/мл	0,3	30	[44]
Холестерин	Амперометрия	ХО*	—	0—80 мг/дл	3	80	[23]
Триглицериды	»	Л+ГК+ГФДГ	20	50—250 мг/дл	—	25	[25]
»	»	Л+ГК+ГФДГ+ДФ	8	—	5	60	[40]
Мочевина	»	У	30	0—10 мМ	0,5	100	[33]
»	»	У	50	0—4,0 мМ	3	60	[70]
»	»	У*	45	1—40 мМ	1	40	[32]
»	Фотометрия	У*	50	1,25—10 мМ	1,1	40	[71]

Примечание. ПО — пероксидаза, МР — мутаротаза, ГК — глицеролкиназа, ГФДГ — глицеролфосфатдегидрогеназа, ДФ — диафороза, Л — липаза, У — уреаса. Звездочка — иммобилизованные ферменты.

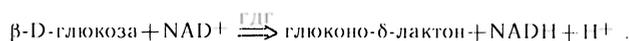
шивается с потоком биуретового реактива. Время от начала инъекции до появления сигнала детектора составляет около 3 с. В ручном варианте время реакции составляет не менее 10 мин.

Ферменты обладают двумя свойствами перво-степенной важности для аналитической химии: высокой селективностью и способностью к само-регенерации после каталитического цикла. В клинической химии широко используются наборы с ферментами для определения биологических суб-стратов, таких, как глюкоза, этанол, триглице-риды и др. В ручном варианте измерение обы-чно проводится методом конечной точки, однако возможны и кинетические измерения, где опреде-ляется скорость ферментативной реакции, которая пропорциональна концентрации определяемого субстрата.

Рассмотрим группу методов ПИА (табл. 2), в которых в качестве реагентов для клинических биохимических анализов используются ферменты. Основной целью работ по ПИА в этой области, помимо автоматизации рутинных исследований в кинетическом режиме, является разработка про-цедуры с минимальным расходом реагента (фер-мента). Эти методы получили широкое распро-странение, особенно в связи с возможностью им-мобилизации (ковалентного присоединения) фер-ментов на соответствующих сорбентах. В проточ-но-инъекционной системе с иммобилизованными ферментами все преимущества ферментативного способа определения различных веществ соче-таются с экономным расходом и увеличением стабильности ферментов, а также с улучшением воспроизводимости результатов. Опубликован подробный обзор систем ПИА, включающих в себя ферментативные реакторы [16].

Наибольшее число публикаций посвящено фер-ментативному определению глюкозы в биологи-ческих образцах. Одним из первых адаптирован к ПИА фотометрический метод определения

глюкозы в депротеинизированной сыворотке кро-ви на основе ее реакции с глюкозодегидроге-назой (ГДГ) и коферментом NAD^+ :



О количестве глюкозы судили по увеличению поглощения при 340 нм с помощью 2 после-довательно установленных детекторов [12]. Соче-тание метода перекрывающихся зон и остано-вленного потока позволило авторам [47] увели-чить чувствительность метода и уменьшить расход как образца, так и реагента по сравнению с ручным вариантом. В такой «открытой» проточ-ной системе растворы, содержащие фермент, NAD^+ , $NADH$, попадали в слив. В конфигу-рации «замкнутый контур» [43] $NADH$, образу-ющийся под действием ГДГ, в специальном резервуаре медленно регенерировался в NAD^+ под действием глутаматдегидрогеназы, и соответ-ствующего субстрата, также добавляемых в по-ток, циркулирующий в системе, и снова исполь-зовался для определения глюкозы.

Другой ферментативный способ определения глюкозы основан на окислении ее кислородом в присутствии глюкозооксидазы (ГО):



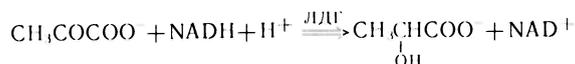
О протекании этой реакции можно судить либо по накоплению перекиси водорода, либо по убыли кислорода. Первый способ реализован в реакции образующейся перекиси с лейко-диацилдихлорфлюоресцеином под действием пе-роксидазы хрена. В результате образуется флюо-ресцирующий краситель дихлорфлюоресцеин [17]. Описан также фотометрический способ опреде-ления перекиси водорода, основанный на ее реак-ции с 4-аминоантипирином и фенолом [59—61].

Определение ферментативной активности с помощью ПИА

Определяемый фермент	Способ детекции	Объем пробы, мкл	Диапазон измерений	Коэффициент вариации, %	Производительность, число образцов за 1 ч	Источник
ЛДГ	Фотометрия	10	0–200 ед/л	4,8	30	[37]
ЛДГ	»	200	0,1–2,0 ед/л	3,0	—	[9]
ЛДГ	Амперометрия	100	0–385 ед/л	3–11	—	[57]
ЛДГ ₁	»	100	0–200 ед/л	3–11	—	[57]
Амилаза	»	100	0–500 ед/дл	2,0	120	[29]
»	Фотометрия	30	0–54 ед/мл	1,2	20	[28]
Щелочная фосфатаза	Флюориметрия	20	0–250 ед/л	2	30–40	[24]
Липаза	»	20	0–100 ед/л	2	15	[24]
Химотрипсин	»	20	0–200 ед/л	2	30	[24]
АХЭ	»	20	0–500 ед/л	2	60	[24]
АХЭ	Амперометрия	5	50–2·10 ⁴ ед/л	2	40	[68]
γ-ГТ	Фотометрия	30	25–100 ед/л	3,8	120	[36]
Кислая фосфатаза	»	21	1–20 ед/л	2–8	48	[41]
КК	Биолюминесценция	30	10–400 ед/л	5	—	[66]
Ферроксидаза	»	60	0,05–5 ед/мл	3,4	120	[58]
Гуаназа	Флюориметрия	20	0,05–50 ед/л	1,2	40	[14]

Примечание. γ-ГТ — γ-глутамилтранспептидаза, КК — креатинкиназа.

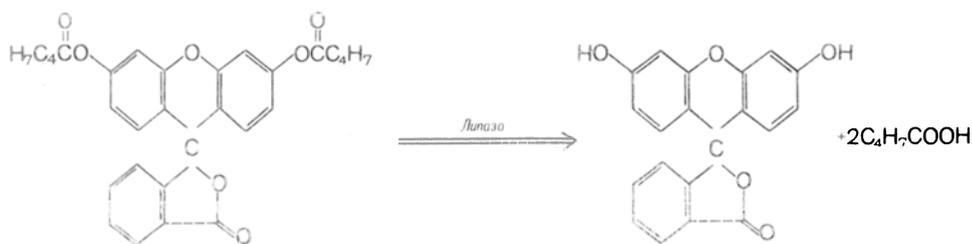
Измерение активности лактатдегидрогеназы (ЛДГ) (КФ 1.1.1.27) по изменению поглощения NADH в остановленном потоке в результате ферментативного восстановления пирувата — первый пример использования ПИА для определения ферментативной активности [31]:



Этот подход был использован для определения активности ЛДГ сыворотки крови методом остановленного потока [37] и в циклической системе, где одна проба проходит через детектор многократно [9]. Предложено амперометриче-

амбеллиферона фосфат, который при ферментативном гидролизе дает сильно флюоресцирующий продукт амбеллиферон:

Для определения активности липазы, которая от других эстераз отличается тем, что гидролизует эмульгированные субстраты лучше, чем растворимые, использовали гидрофобный субстрат дибутирилфлюоресцеин. Последний гидролизуется липазой до флюоресцеина.

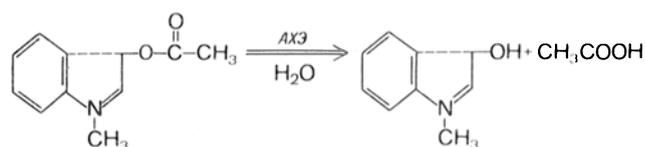


ское определение активности коферментов ЛДГ после их предварительного иммунохимического разделения [57].

Активность амилазы (КФ 3.2.1.1) определяли либо амперометрически по убыли кислорода в ряду сопряженных реакций, инициируемых этим ферментом [29], либо фотометрически по накоплению мальтозы, реагирующей с красителем [28].

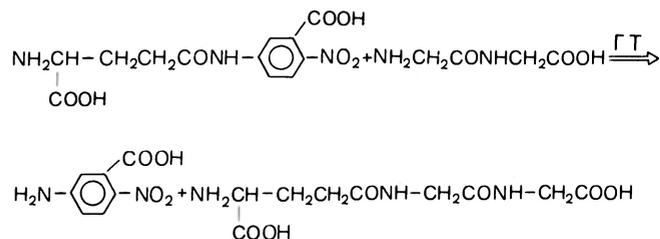
Определение активности 4 диагностически значимых ферментов — щелочной фосфатазы (КФ 3.1.3.1), липазы (КФ 3.1.1.3), ацетилхолинэстеразы (АХЭ) (КФ 3.1.1.7) и химотрипсина (КФ 3.4.21.1) — основано на сочетании методов перекрывающихся зон и остановленного потока с флюориметрическим способом детекции [24]. Так, при определении активности щелочной фосфатазы в качестве субстрата использовали

В качестве стабильного растворимого субстрата для флюориметрического определения активности химотрипсина авторами [24] был выбран N-глутарил-глицил-L-фенилаланин-β-нафтиламид, дающий после расщепления химотрипсином флюоресцирующий β-нафтиламин. Для определения активности АХЭ, проявляющей сродство к четвертичным аммониевым солям, в качестве флюоресцирующего субстрата предложен N-метилиндоксилацетат.



Описан амперометрический способ определения активности АХЭ [68]: инъецируемый фермент гидролизует ацетилхолин до холина, который затем окисляется холиноксидазой, иммобилизованной на тонкой пленке, покрывающей платиновый электрод. Регистрируется образующаяся перекись водорода.

Активность γ -глутамилтрансферазы (ГТ) (КФ 2.3.2.1), катализирующей перенос аминокислотного остатка от пептида к пептиду, определяли методом остановленного потока. В качестве субстрата для этой реакции использовали бесцветный L- γ -глутамил-3-карбокси-4-нитроанилид, из которого фермент освобождает 5-амино-2-нитробензоат, имеющий желтую окраску. Для калибровки использовали стандартные сыворотки [36].

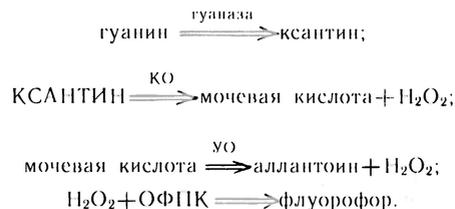


Общую активность кислой фосфатазы (КФ 3.1.3.2) определяли по ее способности катализировать гидролиз α -нафтилфосфата при pH 5,3, сопряженный с реакцией освобождающегося α -нафтола с красителем, образующим желтое диазосоединение. В ручном варианте время инкубации составляет не менее 30 мин. Авторы адаптировали проточно-инъекционную систему для подобных анализов, требующих относительно долгого времени инкубации. Ими сконструирован автоматический распределительный клапан, который направляет образец в одну из четырех реакционных спиралей на заданное время. Таким образом в 4 раза увеличивается производительность по сравнению с одноканальной системой. Корреляция с ручным методом составляет 98% [41].

Активность креатинфосфокиназы (КФ 2.7.3.2) определяли по ее способности переносить фосфат с креатинфосфата на АДФ. Образующийся АТФ регистрировали по биолюминесценции в системе люциферин/люцифераза. Авторы использовали иммобилизованную люциферазу из светляков [66].

В ряде случаев, например при определении активности ферроксидазы (КФ 1.16.3.1) и гуа-

назы (КФ 3.5.4.3), включающих стадии осаждения, проточно-инъекционные системы используются на заключительном этапе при тестировании продукта реакции. Для ферроксидазы метод основан на определении Fe^{3+} в присутствии Fe^{2+} по образованию железотиоцианатного комплекса [58]. Для гуаназы — фермента, катализирующего дезаминирование гуанина с образованием ксантина, тестирование ксантина проводили в проточной системе, включающей реакторы с иммобилизованными ксантиноксидазой (КО), уратоксидазой (УО) и пероксидазой. Перекись водорода, образующаяся в результате ферментативного превращения по приведенной ниже схеме, регистрировали флуориметрически по реакции с 3-(пара-оксифенил)пропионой кислотой (ОФПК) [14].



Четвертую группу составляют методы ИХА, основанные на взаимодействии антиген — антитело (табл. 4). Привлекательность ИХА обусловлена двумя особенностями антител как специфических аналитических реагентов: во-первых, в определенных условиях они реагируют с высоким сродством только с тем антигеном, против которого они получены, во-вторых, возможно получение антител практически против любого органического соединения. В ИХА широко распространенным является подход, основанный на введении метки в одну из молекул взаимодействующей пары антиген — антитело. Природа метки (радио-, энзимо-, флюоро-) существенно влияет на процедуру ИХА, определяя как способ разделения свободных и связанных фракций, так и аппаратное оформление. Наиболее широко используются ферментные метки, в основе действия которых лежит способность некоторых относительно стабильных ферментов эффективно катализировать химические реакции, давая при этом легко тестируемые продукты, а также способность этих ферментов образовывать конъюгаты с антителами и антигенами. Одним из недостатков ИХА является длительное время его проведения, обусловленное многостадийностью и необходимостью достижения на каждой стадии равно-

Таблица 4

Использование ПИА в иммунохимическом анализе

Определяемое вещество	Способ детекции	Объем пробы, мкл	Диапазон измерений	Коэффициент вариации, %	Производительность, число образцов за 1 ч	Источник
Альбумин	Флуориметрия	36	0—10 ⁻⁷ М	2,5	10	[21]
IgG	»	25	1,4—25 мг/мл	9,8	60	[18]
IgM	Фотометрия	20—50	0,16—3 мг/мл	3,2	30	[11]
IgG	Турбидиметрия	30	1—1778 мг/мл	2—15	40	[65]
Инсулин	Фотометрия	100	4—1000 мкг/мл	10	4—6	[20]
Теофиллин	Потенциометрия	100	0,1—1,0 мкМ	10	4—6	[20]
»	Фотометрия	9	2,5—40 мг/мл	10	100	[40]

весия. ПИА позволяет реализовать этот метод в кинетическом режиме.

Впервые в области ИХА проточно-инжекционная система была использована для флюороиммуноанализа сывороточного альбумина: молекулы антигена (альбумин) и антитела были помечены различными флюоресцирующими красителями с перекрывающимися спектрами (флуоресцен-ин- и родамин-изотиоцианатом соответственно). Присутствие немеченых антигенов в инъектируемом образце за счет конкуренции уменьшило интенсивность сигнала, связанного с взаимопереносом энергии от ковалентного связанного с антигеном донора к акцептору, присоединенному к антителу [21].

Сывороточный IgG определяли с помощью ферментативной метки — пероксидазы хрена, соединенной с антителом (анти-IgG человека). Фермент катализирует индикаторную реакцию, в которой при окислении лейкодиацетилдихлорфлюоресцеина перекисью водорода в присутствии пероксидазы образуется сильно флюоресцирующий дихлорфлюоресцеин. Связывание меченого антитела с антигеном частично ингибирует ферментативную активность, приводя к уменьшению интенсивности флюоресценции продукта индикаторной реакции [18]. Предложен также твердофазный (гетерогенный) вариант энзимоиммуноанализа IgG человека с помощью кроличьих антител против IgG, меченых пероксидазой хрена. В этом случае имеет место конкуренция между антигенами инъектируемой сыворотки и антигенами, иммобилизованными на ВrCN-сефарозе. Анализ основан на связывании частично освобождающихся из комплекса с иммуносорбентом меченых антител с определяемым IgG и последующей регистрации образующегося комплекса по измерению активности пероксидазы [1]. Описано определение человеческого IgG с помощью козьей антисыворотки, использованной в качестве антител к человеческому белку, турбидиметрически в остановленном потоке в сочетании с методом перекрывающихся зон [65].

Пероксидаза была также использована в качестве ферментной метки при иммуноанализе сывороточного инсулина [20]. Особенностью этой системы является использование иммобилизованных вторичных антител к инсулину для разделения фракций свободных антигенов и антигенов, связанных с первичными антителами (антиинсулином морской свинки). Реактор с иммобилизованными вторичными антителами является частью проточно-инжекционной системы. Такой же подход предложен для определения содержания в крови лекарственного препарата теофиллина. В качестве ферментной метки использована аденозиндезаминиаза. Известен также гомогенный вариант энзимоиммуноанализа теофиллина [40].

По нашему мнению, ПИА представляет большой интерес для клинической биохимии. Использование проточной системы существенно сокращает удельный расход биопробы и реагентов на один анализ за счет возможности вести измерения в кинетическом режиме, обеспечивает высокую производительность системы при га-

рантированном повышении точности анализа. Кроме того, ПИА, являясь закрытой системой, минимизирует возможность контакта персонала с токсичными веществами, освобождает обслуживающий персонал от рутинной работы и существенно сокращает количество используемой стеклянной посуды, так как смешивание, разбавление и другие типичные аналитические процедуры проводятся автоматически внутри системы. Благодаря разнообразию конструкций, способов детектирования, используемых в проточно-инжекционных анализаторах, можно адаптировать к режиму ПИА практически любую методику гомогенного анализа.

ЛИТЕРАТУРА

1. *Осунов А. П., Арфьев А. А., Егоров А. М.* // Журн. Всесоюз. хим. о-ва им. Д. И. Менделеева.— 1989.— Т. 24.— С. 119—120.
2. *Шнигун Л. К., Золотов Ю. А.* // Завод. лабор.— 1987.— № 3, С. 12—24.
3. *Alexander P. W., Finlayson R. J., Smythe L. E., Thalib A.* // *Analyst.*— 1982.— Vol. 107.— P. 1335—1342.
4. *Belleridge D.* // *Analyt. Chem.*— 1978.— Vol. 50.— P. 832A—846A.
5. *Braithwaite J. I., Miller J. N.* // *Analyt. chim. Acta.*— 1979.— Vol. 106.— P. 395—399.
6. *Burns T. D., Chimpalee N., Harriott M.* // *Ibid.*— 1989.— Vol. 225.— P. 241—246.
7. *Fernandez A. G., Ruz P. J., Luque de Castro M. D., Valcarcel M.* // *Clin. chim. Acta.*— 1985.— Vol. 148.— P. 131—137.
8. *Fernandez-Romero J. M., Luque de Castro M. D., Valcarcel M. J.* // *Pharm. Biomed. Analyt.*— 1989.— Vol. 7.— P. 295—302.
9. *Fernandez-Romero J. M., Luque de Castro M. D., Valcarcel M.* // *Analyt. chim. Acta.*— 1989.— Vol. 219.— P. 191—199.
10. *Hansen E. H.* // *Ibid.*— Vol. 216.— P. 257—273.
11. *Hansen E. H., Ruzicka J.* // *Ibid.*— 1976.— Vol. 87.— P. 353—363.
12. *Hansen E. H., Ruzicka J., Rietz B.* // *Ibid.*— 1977.— Vol. 89.— P. 241—254.
13. *Hansen E. H., Ruzicka J., Chose A. K.* // *Ibid.*— 1978.— Vol. 100.— P. 151—165.
14. *Hayashi Y., Zaitu K., Ohkura Y.* // *Ibid.*— 1987.— Vol. 197.— P. 51—56.
15. *Huck H., Scheller-Graf A., Schmidt H. L.* // *Bioelectrochem. Bioenerg.*— 1984.— Vol. 174.— P. 199—209.
16. *Johansson G., Ogren I., Olsson B.* // *Analyt. chim. Acta.*— 1983.— Vol. 145.— P. 71—85.
17. *Kelly T. A., Christian G. D.* // *Analyt. Chem.*— 1982.— Vol. 54.— P. 1444—1455.
18. *Kelly T. A., Christian G. D.* // *Talanta.*— 1982.— Vol. 29.— P. 1109—1112.
19. *Lazaro F., Luque de Castro M. D., Valcarcel M.* // *Analyt. chim. Acta.*— 1984.— Vol. 165.— P. 177—185.
20. *Lee I. H., Meyerhoff M. E.* // *Microchim. Acta.*— 1988.— Vol. 3.— P. 207—221.
21. *Lim C. S., Miller J. N.* // *Analyt. chem. Acta.*— 1980.— Vol. 114.— P. 183—189.
22. *Linares P., Luque de Castro M. D., Valcarcel M.* // *Rev. analyt. Chem.*— 1985.— Vol. 8.— P. 229—257.
23. *Masoom M., Townshend A.* // *Analyt. chim. Acta.*— 1985.— Vol. 174.— P. 293—297.
24. *Masoom M., Worsfold P. J.* // *Ibid.*— 1986.— Vol. 179.— P. 217—223.
25. *Masoom M., Worsfold P. J.* // *Ibid.*— Vol. 188.— P. 281—283.
26. *McLeod C. W., Worsfold P. J., Cox A. G.* // *Analyst.*— 1984.— Vol. 109.— P. 327—332.
27. *Mindegaard J.* // *Analyt. chim. Acta.*— 1979.— Vol. 104.— P. 185—289.
28. *Muller V., Muller H.* // *Z. Chem.*— 1987.— Bd 27.— S. 333—334.
29. *Nicoteles D. P., Mottola H. A.* // *Analyt. Chem.*— 1978.— Vol. 50.— P. 1665—1670.
30. *Nygren O., Nilsson C. A., Gustavsson A.* // *Analyst.*— 1988.— Vol. 113.— P. 591—594.

31. Olsen S., Ruzicka J., Hansen E. H. // *Analyt. chim. Acta.*— 1982.— Vol. 136.— P. 101—112.
32. Petersson B. A. // *Ibid.*— 1988.— Vol. 209.— P. 239—248.
33. Ramsing A., Ruzicka J., Hansen E. H. // *Ibid.*— 1980.— Vol. 114.— P. 165—181.
34. Ramasamy S. M., Mottola H. A. // *Ibid.*— 1981.— Vol. 127.— P. 39—46.
35. Renoe B. W., Stewart K. K., Beecher G. R. et al. // *Clin. Chem.*— 1980.— Vol. 26.— P. 331—334.
36. Riley C., Aslett L. H., Rocks B. F. et al. // *Ibid.*— 1983.— Vol. 29.— P. 332—335.
37. Riley C., Rocks B. F., Sherwood R. A. et al. // *J. Autom. Chem.*— 1983.— Vol. 5.— P. 32—35.
38. Riley C., Rocks B. F., Sherwood R. A. // *Talanta.*— 1984.— Vol. 31.— P. 879—888.
39. Riley C., Rocks B. F., Sherwood R. A. // *Analyt. chim. Acta.*— 1986.— Vol. 179.— P. 69—80.
40. Rocks B. F., Sherwood R. A., Riley C. // *Analyst.*— 1984.— Vol. 109.— P. 847—850.
41. Rocks B. F., Sherwood R. A., Hosseinmardi M. M., Riley C. // *Analyt. chim. Acta.*— 1986.— Vol. 179.— P. 225—231.
42. Rocks B. F., Wartel S. M., Sherwood R. A., Riley C. // *Analyst.*— 1985.— Vol. 110.— P. 669—671.
43. Roehrig P., Wolff C. M., Schwing J. P. // *Analyt. chim. Acta.*— 1983.— Vol. 153.— P. 181—190.
44. Ruz J., Luque de Castro M. D., Valcarcel M. // *Analyst.*— 1987.— Vol. 112.— P. 259—261.
45. Ruzicka J., Hansen E. H. // *Analyt. chim. Acta.*— 1975.— Vol. 78.— P. 145—157.
46. Ruzicka J., Hansen E. H., Zagatto E. A. G. // *Ibid.*— 1977.— Vol. 88.— P. 1—16.
47. Ruzicka J., Hansen E. H. // *Ibid.*— 1979.— Vol. 106.— P. 207—224.
48. Ruzicka J., Hansen E. H. // *Ibid.*— 1983.— Vol. 145.— P. 1—15.
49. Ruzicka J., Hansen E. H. // *Ibid.*— 1986.— Vol. 179.— P. 1—58.
50. Ruzicka J., Hansen E. H. // *Flow Injection Analysis.*— 2-nd Ed.— 1988.— P. 52—53.
51. Ruzicka J., Hansen E. H. // *Analyt. chim. Acta.*— 1988.— Vol. 214.— P. 1—27.
52. Salerno R. A., Odell C., Cyanovich N. et al. // *Analyt. Biochem.*— 1985.— Vol. 151.— P. 309—314.
53. Shideler C. E., Stewart K. K., Crump J. et al. // *Clin. Chem.*— 1980.— Vol. 26.— P. 1454—1458.
54. Skeggs L. T. // *Amer. J. clin. Path.*— 1957.— Vol. 28.— P. 311—322.
55. Stewart K. K. // *Analyt. Chem.*— 1983.— Vol. 55.— P. 931A—940A.
56. Stewart K. K., Beecher G. R., Hare P. E. // *Analyt. Biochem.*— 1976.— Vol. 70.— P. 167—173.
57. Takashu Toyoda, Kuan S. S., Guilhaull G. G. // *Analyt. Lett.*— 1985.— Vol. 18.— P. 345—355.
58. Tanabe S., Shioiri T., Murakami K., Imanari T. // *Chem. pharm. Bull.*— 1984.— Vol. 32.— P. 4029—4035.
59. Toei J. // *Analyst.*— 1988.— Vol. 113.— P. 475—478.
60. Toei J. // *Analyt. Lett.*— 1988.— Vol. 21.— P. 1633—1651.
61. Toei J. // *Fresenius Z. analyt. Chem.*— 1988.— Bd 332.— S. 167—170.
62. Toth K., Fucsko J., Lindner E. et al. // *Analyt. chim. Acta.*— 1986.— Vol. 179.— P. 359—370.
63. Wolff C. M., Mottola H. A. // *Analyt. Chem.*— 1978.— Vol. 50.— P. 94—98.
64. Worsfold P. J., Ruzicka J., Hansen E. H. // *Analyst.*— 1981.— Vol. 106.— P. 1309—1317.
65. Worsfold P. J., Hughes A., Mowthorpe D. J. // *Ibid.*— 1985.— Vol. 110.— P. 1303—1305.
66. Worsfold P. J., Nabi A. // *Analyt. chim. Acta.*— 1986.— Vol. 179.— P. 307—313.
67. Yao T. // *Ibid.*— 1983.— Vol. 153.— P. 175—180.
68. Yao T. // *Ibid.*— P. 169—174.
69. Yao T., Sato M., Kobayashi Y., Wasa T. // *Ibid.*— 1984.— Vol. 165.— P. 291—296.
70. Yerian T. D., Christian G. D., Ruzicka J. // *Analyst.*— 1986.— Vol. 111.— P. 865—873.
71. Yerian T. D., Christian G. D., Ruzicka J. // *Analyt. chim. Acta.*— 1988.— Vol. 204.— P. 7—28.

Поступила 15.03.89

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 1991

УДК 612.465.1.015.348.008.1:543.545

Г. Ш. Хасанбаева, П. З. Хасигов, П. Г. Рубачев,
С. С. Шишкин

ЭЛЕКТРОФОРЕТИЧЕСКИЙ АНАЛИЗ БЕЛКОВ БАЗАЛЬНОЙ МЕМБРАНЫ КЛУБОЧКОВ ПОЧЕК КРЫС

Г Московский медицинский институт им. И. М. Сеченова

Базальные мембраны (БМ) представляют собой специализированный класс внеклеточного матрикса. Они важны для сохранения целостности тканей, служат субстратом для прикрепления и ориентации клеток, выполняют роль фильтрационного барьера, а также участвуют в процессах эмбрионального развития и тканевой репарации. Особый интерес представляет базальная мембрана клубочков почек (БМК), выполняющая функцию селективного барьера при образовании первичной мочи. Она находится между двумя слоями клеток — эндотелием кровеносных сосудов и эпителиально-подобными клетками (подоцитами) и имеет трехслойную структуру. БМК состоит из толстого электронно-плотного слоя lamina densa (диаметр 50—100 нм) и двух электронно-прозрачных слоев lamina rara interna et externa (диаметр 20—50 нм) [2, 7].

В последнее время большое внимание уделяется изучению биохимического состава БМ. Было показано, что БМ состоят из уникального набора белков, которые образуют высокоинтегрированные надмолекулярные структуры. Основными компонентами БМ являются коллаген IV типа, ламинин, пидоген, энтактин, а также гепарансульфатсодержащие протеогликаны [2, 7]. Вероятно, существуют и другие компоненты, которые еще не идентифицированы.

До настоящего времени для изучения структуры и состава БМ использовали в основном электронно-микроскопические и иммуногистохимические методы. Они позволяют достаточно точно определить локализацию и время появления в онтогенезе уже известных белков, но не дают полной картины белкового состава БМ и, следовательно, ограничивают возможность поиска ее новых компонентов. Выяснение неизвестных до сих пор компонентов БМ позволит изучить ее надмолекулярную архитектуру и помочь лучшему пониманию ее функций и патологических изменений. Поэтому разработка методических подходов для изучения биохимического состава БМК представляет большой теоретический и практический интерес.

Появление метода двухмерного электрофореза по О'Фарреллу позволило эффективно решать задачу разделения смесей, состоящих из сотен и тысяч белков. Этот метод объединяет в себе преимущества 2 методов фракционирования: изоэлектрическое фокусирование (ИЭФ) и электрофорез в градиенте плотности полиакриламидного геля (ПААГ) в присутствии додецилсульфата натрия (DS-Na) [5]. На этой методической базе возможно проведение систематической каталогизации белков с характеристикой полипептидных цепей по изоэлектрической точке и молекулярной массе. Данная работа посвящена разработке мето-

дических подходов для анализа белков БМК методом двухмерного электрофореза по О'Фарреллу.

Методика. Изолированные клубочки получали из почек 6-месячных крыс-самцов. Для исключения загрязнения препарата БМК компонентами крови проводили ретроградную перфузию почек охлажденным 0,85 % раствором NaCl. Корковое вещество почек разрезали на мелкие кусочки и продавливали через стальное сито с диаметром пор 120 мкм. Просеянный материал, состоящий в основном из клубочков, пропускали через сито с диаметром пор 60 мкм для удаления мелких тканевых фрагментов. Материал, оставшийся на сите, промывали 0,85 % раствором NaCl и собирали в пластиковую центрифужную пробирку. Полученную суспензию центрифугировали 15 мин при 400 g для осаждения клубочков. Все процедуры по выделению клубочков проводили при 4 °С, используемый 0,85 % раствор NaCl содержал 0,1 % азид натрия и ингибиторы протеолитических ферментов: 10 мМ ЭДТА и 1 мМ фенилметилсульфонилфлюорид (ФМСФ). Полученная суспензия изолированных клубочков анализировалась иод фазово-контрастным микроскопом.

БМ из изолированных клубочков получали детергентным методом [4]. Метод основан на избирательном растворении клеточных мембран, внутриклеточных белков и белков плазмы крови сериями детергентов в условиях, при которых БМ сохраняются в нерастворенном состоянии. Клубочки подвергали осмотическому лизису в большом объеме дистиллированной воды (1:100), а затем последовательно обрабатывали 3 % раствором тритона X-100, раствором, содержащим 2000 ед. ДНКазы-1 и 4 % раствором дезоксихолата натрия. Все растворы содержали 0,1 % азид натрия, 10 мМ ЭДТА и 1 мМ ФМСФ. Полученная суспензия БМК анализировалась под фазово-контрастным микроскопом для контроля загрязнения препарата клеточными элементами.

Препарат БМК растворяли в DS-Na-буфере (2 % DS-Na, 5 % 2-меркаптоэтанол) или в лизис-буфере (8 М мочевины, 0,4 % тритон X-100 или тритон X-305, 5 % 2-меркаптоэтанол и 2 % амфолины pH 3,3–10,0) из расчета 1 мг лиофилизированного препарата БМК на 1 мл буфера. Далее лизат подвергали обработке ультразвуком в ультразвуковом дезинтеграторе MSE (Англия) в режиме high-4, 4 раза по 5 с. Полученные лизаты использовали для фракционирования одномерным и двухмерным электрофорезом в ПААГ.

Одномерный электрофорез в ПААГ с DS-Na проводили по методу Лэммли [3] в пластинах-геля (160×160×1 мм), приготовленных с линейным градиентом концентрации акриламида 5–20 %. Анализируемый образец содержал 20–30 мг лиофилизированного препарата БМК. После электрофореза гели окрашивали кумасси R-250 или азотнокислым серебром.

Двухмерный электрофорез проводили по методу О'Фаррелла [5]. Анализируемый образец, содержащий 150–200 мкг сухого препарата БМК, наносили с катодного конца геля для ИЭФ. ИЭФ (фракционирование в первом направлении) проводили в 4 % ПААГ, содержащем 8 М мочевины, 2 % тритон X-100 и 2 % амфолины (смесь амфолинов pH 5,0–7,0 и pH 3,5–10,0 в соотношении 4:1). Режим ИЭФ 5400 В×ч. Гели, полученные после ИЭФ, использовали в качестве стартовой зоны для фракционирования во втором направлении, которое проводили по методу Лэммли, как описано выше.

В работе использовали амфолины pH 3,5–10, pH 5–7, персульфат аммония — фирмы LKB (Швеция); акриламид, метилбензисакриламид, амберлит, трис, DS-Na, кумасси R-250, азид натрия, дезоксихолат натрия, ЭДТА, ДНКазы I — фирмы «Serva» (ФРГ); мочевины, NaCl — фирмы «Merck» (ФРГ); фенилметилсульфонилфлюорид — фирмы «Sigma» (США); тритон X-100 — фирмы «Fera» (Зап. Берлин); 2-меркаптоэтанол — фирмы «Fluka» (Швейцария); агароза — фирмы «Bio-Rad» (США); ТЕМЕД — фирмы «Reanal» (Венгрия); другие реактивы отечественного производства марки о. ч.

Результаты и обсуждение. Изучение БМ из естественных источников имеет ряд трудностей, так как БМ представляют небольшую фракцию внеклеточного матрикса и их выделение из тканей является сложной задачей. В данной работе БМ получали из изолированных клубочков почек крыс. При исследовании под фазово-контрастным микроскопом была показана высокая степень чистоты выделения клубочков почек (рис. 1). Загрязнение канальцевыми элементами составило 2–3 %, количество клубочков, имеющих

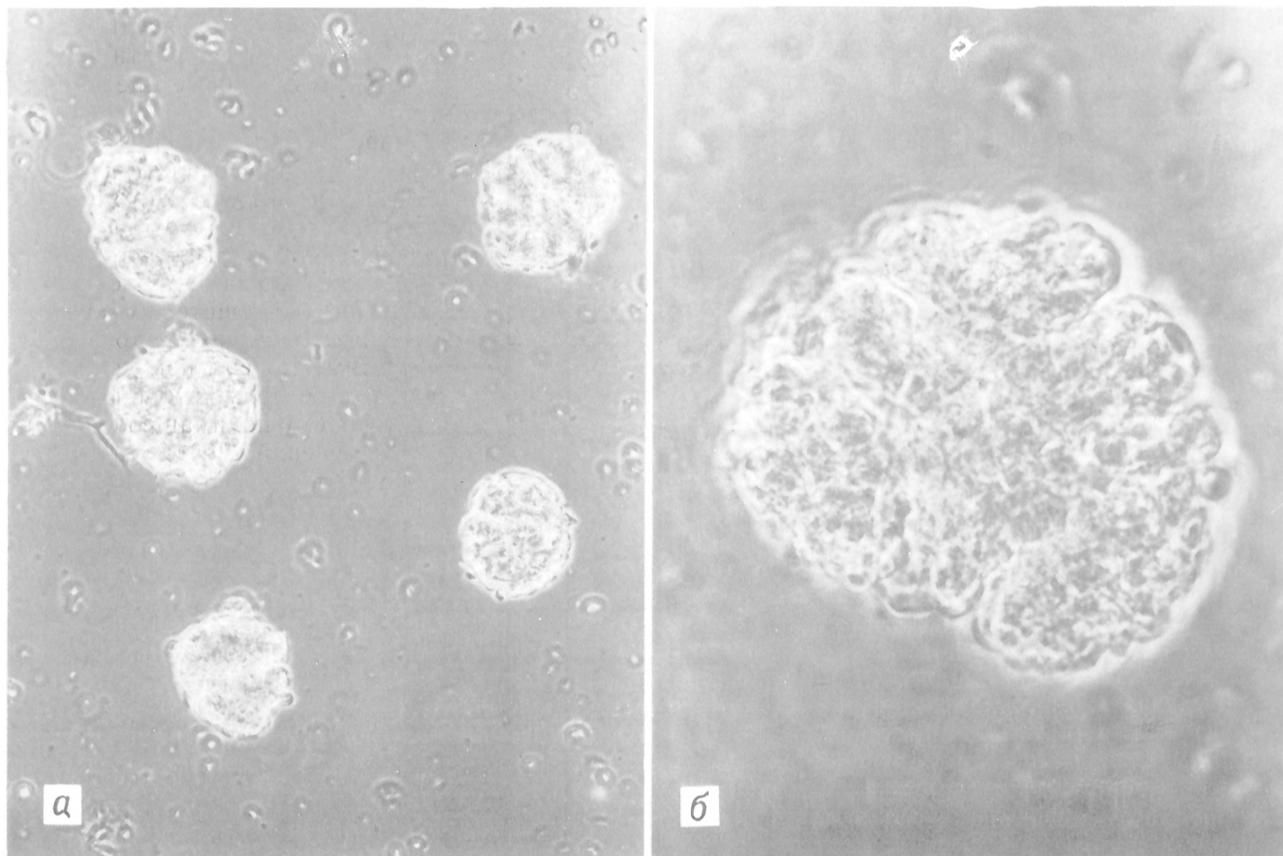


Рис. 1. Изолированные клубочки почек крыс под фазово-контрастным микроскопом.

а — ув. × 200; б — ув. × 400.

сохраненную париетальную капсулу, было меньше 5%. Препарат БМ, полученный из изолированных клубочков детергентным методом, также анализировался под фазово-контрастным микроскопом и был свободен от загрязнения клеточным материалом. Средний выход составлял 1 мг лиофилизированной БМК на 10 почек, или 0,07 мг БМК на 1 г массы органа.

Существенной особенностью строения БМК является высокое содержание в ней малорастворимых и относительно прочно связанных друг с другом белков. Эта особенность требует решения проблемы солиubilизации белков БМК как первой стадии в электрофоретическом анализе. В литературе описаны методы солиubilизации БМК в растворителе, содержащем DS-Na и 2-меркаптоэтанол, при этом растворяется до 70–80% базальной мембраны [6]. Однако растворители, содержащие ионные детергенты, нежелательно использовать при проведении ИЭФ, так как они искажают картину фокусирования. Поэтому мы проводили сравнение солиubilизации БМК в DS-Na-буфере и лизис-буфере, обычно используемом при проведении ИЭФ. Также изучали влияние на растворимость БМК температуры и времени инкубации в буфере.

Полученные образцы анализировали с помощью одномерного ЭФ в ПААГ с линейным градиентом концентрации 5–20% в присутствии DS-Na. Было показано, что более качественная картина фракционирования достигается при солиubilизации

БМК в DS-Na-буфере в условиях инкубирования в течение 6 ч при 37 °С или 15 мин при 100 °С, а также при солиubilизации БМК в лизис-буфере при 22 °С в течение 30 мин. В этих условиях при окраске гелей азотнокислым серебром выявлено 25 главных белковых фракций в диапазоне молекулярных масс от 25 до 330 кД (рис. 2), что согласуется с данными литературы [6]. Среди них можно выделить ряд высокомолекулярных белков с M_r от 100 до 330 кД (основные полосы 230, 210, 135, 110 кД) и ряд низкомолекулярных белков с M_r от 30 до 70 кД (основные полосы 68, 60, 43 кД).

Далее проводили анализ белков БМК с помощью двухмерного электрофореза по О'Фарреллу. Так как этот метод впервые используется для фракционирования белков БМК, подбирали условия, оптимальные для проведения электрофореза. В качестве растворителей БМК использовали DS-Na-буфер, лизис-буфер с тритоном X-100 или тритоном X-305. Наилучшее качество фракционирования достигалось при солиubilизации БМК в лизис-буфере с тритоном X-305 и дополнительной ультразвуковой обработке образцов. Оптимальным являлось использование при ИЭФ смеси амфолинов с pH 3,5–10 и pH 5–7, а при электрофорезе во втором направлении линейного градиента концентрации акриламида 5–20%.

На рис. 3 представлены результаты фракционирования белков БМК методом двухмерного электрофореза по О'Фарреллу после окраски гелей азотнокислым серебром. Для определения моле-

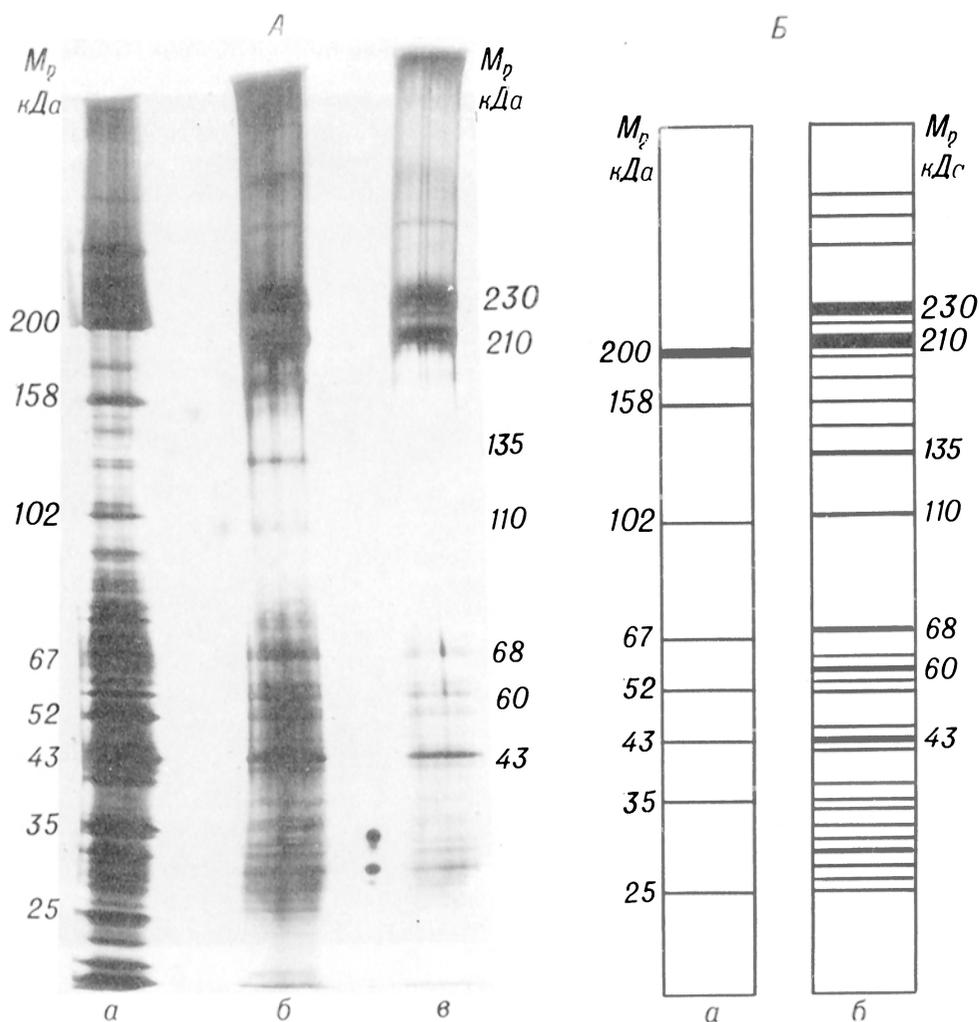


Рис. 2. Фракционирование белков базальной мембраны клубочков почек крыс одномерным электрофорезом в ПААГ 5–20% в присутствии DS-Na.

А — электрофореграммы после окраски гелей азотнокислым серебром; а — белки суммарного лизата сердца мыши, используемые в качестве маркеров молекулярной массы, б — белки БМК крысы, 30 мкг, в — белки БМК крысы, 20 мкг; Б — схема распределения белковых фракций: а — белки суммарного лизата сердца мыши, б — белки БМК крысы.

кулярной массы использовали белки суммарного лизата сердца мышцы, маркированные ранее [1]. В качестве маркера изоэлектрических точек использовали ряд карбамаилированной карбоангидразы (The Pharmacia 2-D Electrophoresis Calibration Kit), который дает серию пятен с мол. массой 30 кД в интервале рН 4,8—6,7. Таким образом, создается внутренняя система координат, которая

может быть использована для стандартизации двухмерных электрофореграмм.

При окрашивании гелей кумасси R-250 выявлялось только около 10 белковых пятен, однако дополнительная окраска азотнокислым серебром позволила обнаружить около 50 полипептидных фракций с молекулярными массами от 25 до 250 кД и изоэлектрическими точками в диапазоне рН 5—7.

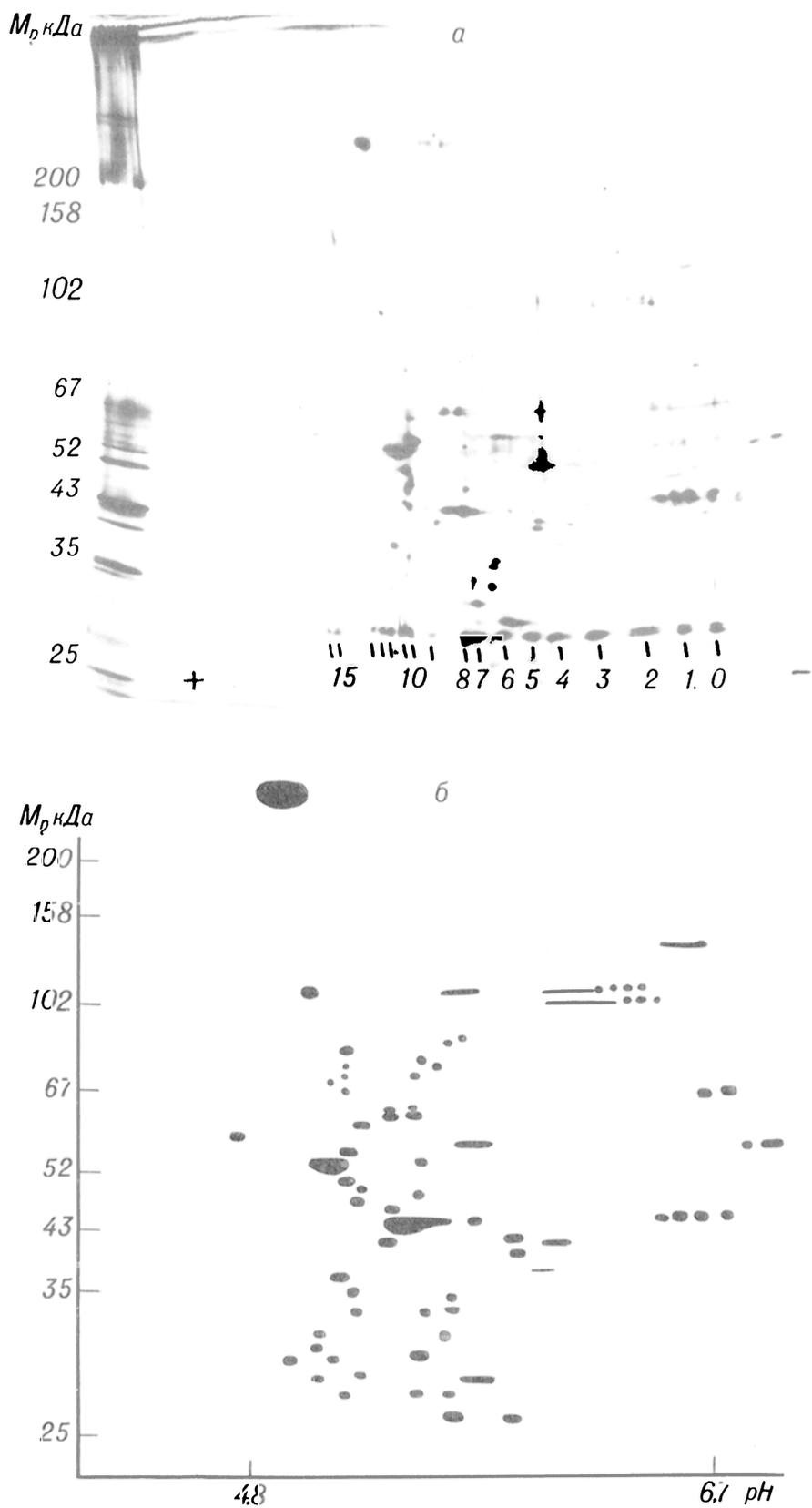


Рис. 3. Фракционирование белков базальной мембраны клубочков почек крысы методом двухмерного электрофореза по О'Фарреллу.

a — электрофореграммы после окраски гелей азотнокислым серебром. Дорожка слева — электрофореграмма белков суммарного лизата сердца мышцы, используемых в качестве маркеров молекулярной массы. Цифрами (0—15) обозначены фракции ряда карбамаилированной карбоангидразы, используемые в качестве маркеров изоэлектрических точек; *б* — обобщенная схема распределения белковых фракций БМК на двухмерных электрофореграммах.

Таким образом фракционирование БМК двухмерным электрофорезом позволяет выявить вдвое больше белковых фракций по сравнению с одномерным электрофорезом, а также охарактеризовать их по изоэлектрической точке и молекулярной массе. Однако следует отметить, что ряд высокомолекулярных белков с M_r больше 200 кД, которые имеются на одномерных электрофореграммах, не обнаруживаются при двухмерном электрофорезе. Вероятно, при проведении ИЭФ часть высокомолекулярных белков агрегирует на старте и не входит в гель первого направления. Так как большинство известных белков БМК являются высокомолекулярными, необходима дальнейшая разработка методических подходов, позволяющих достичь разделения высокомолекулярных белков методом двухмерного электрофореза. Также представляет интерес проведение работы по идентификации и определению природы полученных белковых фракций. Эти исследования позволяют картировать уже известные белки базальной мембраны, а также создадут предпосылки для выявления новых, ранее не описанных белков данной структуры.

ЛИТЕРАТУРА

1. Ковалев Л. И., Шишкин С. С., Иволгина Г. Л. и др. // Биохимия. — 1986. — Т. 51. — С. 896–908.

2. Abrahamson D. R. // Path.— 1986.— Vol. 149, N 4.— P. 257—278.
3. Laemmli U. K. // Nature.— 1979.— Vol. 227.— P. 680—685.
4. Meezan E., Hjelle H. T., Brendel K., Carlson E. S. // Life Sci.— 1975.— Vol. 17, N 11.— P. 1721—1732.
5. O'Farrell P. Z., Goodman H. M., O'Farrell P. H. // Cell.— 1977.— Vol. 12.— P. 1133—1139.
6. Price R. G., Taylor S. A., Khall-Manesh F. // Renal. Physiol.— 1980.— Vol. 3.— P. 41—48.
7. Timpl R. // Kidney int.— 1986.— Vol. 30, N 3.— P. 293—298.

Поступила 15.08.90

ELECTROPHORETIC ANALYSIS OF PROTEINS FROM BASAL MEMBRANE OF RAT KIDNEY GLOMERULUS

G. Sh. Khasanbaeva, P. Z. Khasigov, P. G. Rubachev, S. S. Shishkin

Chair of Biochemistry, I. M. Sechenov I Medical School, Moscow

A technique was developed for analysis of basal membrane proteins from rat kidney glomerulus using two-dimensional electrophoresis by O'Farrell. Basal membranes were isolated from the glomerulus by means of detergent treatment. Various procedures of basal membrane solubilization were studied. About 25 protein fractions with molecular mass from 25 kDa to 330 kDa were detected in the basal membrane after single-dimensional electrophoresis in presence of sodium dodecyl-sulfate. Two-dimensional electrophoresis of the basal membrane proteins and staining of gels with silver nitrate enabled to detect approximately 50 polypeptide fractions with molecular mass from 25 kDa up to 250 kDa at pH 5-7.

ФИРМА «ЭББОТТ ЛЭБОРАТОРИЗ» СООБЩАЕТ:

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 1991

УДК 615.471.03:616-078:658.52-011.56

А. И. Гладштейн, А. А. Петраков, В. М. Мельникова,
А. А. Аругчева

ОЦЕНКА РАБОТЫ АВТОМАТИЗИРОВАННОЙ МИКРОБИОЛОГИЧЕСКОЙ СИСТЕМЫ MS-2 ФИРМЫ «ЭББОТТ ЛЭБОРАТОРИЗ» (США) В УСЛОВИЯХ КЛИНИЧЕСКОЙ МИКРОБИОЛОГИЧЕСКОЙ ЛАБОРАТОРИИ

ЦНИИ травматологии и ортопедии им. Н. Н. Приорова, Москва

Автоматизированная система MS-2 фирмы «Эбботт Лэбораториз» (США) для определения чувствительности к антибиотикам и идентификации микроорганизмов кишечной группы применяется в микробиологической лаборатории ЦИТО с октября 1985 г. За этот период исследована чувствительность 2868 штаммов стафилококка и 2485 штаммов грамотрицательных микроорганизмов, идентифицирован 2351 микроорганизм кишечной группы.

Работа на автоматизированной системе, несомненно, имеет ряд преимуществ по сравнению с рутинными методами. Значительно сокращается время проведения анализа и выдачи ответа. Особенно наглядно это прослеживается в тех случаях, когда из первичного материала высевается

монокультура стафилококка или грамотрицательной палочки. Фактически в тот же день после получения роста (в среднем через 4 ч) можно иметь информацию о чувствительности исследуемого микроорганизма к антибиотикам.

При наличии ассоциации микроорганизмов на следующий день проводят выделение чистой культуры, а через 18–20 ч — определение чувствительности ассоциантов.

В любом случае экономия времени получения результатов составляет в среднем 18–24 ч. Для определения чувствительности микроорганизмов к антибиотикам используют 3 батареи: батарея + с подбором антибиотиков для стафилококков, батарея — для грамотрицательной микрофлоры и батарея А с антибиотиками для обеих групп микроорганизмов при устойчивости их к антибиотикам батарей + и —.

Обычно в батареи вкладываются антибиотики, имеющиеся в арсенале клиники.

В настоящее время батарея + включает в себя следующие антибиотики: ванкомицин, цефалотин, клиндамицин, эритромицин, гентамицин, оксациллин, тетрациклин, канамицин, метициллин и цефазолин. Метициллин включен в батарею + для выявления циркулирующих в стационаре метициллиноустойчивых штаммов стафилококка. Батарея — состоит из амикацина, тобрамицина, гентамицина, цефтазида, цефалотина, цефотаксима, азлоциллина, карбенициллина и хлорамфеникола. Батарея А содержит амикацин, цефокси-

тин, колистин, гентамицин, нитрофурантоин, сульфаметоприм, хлорамфеникол, палидиксовую кислоту, азлоциллин и карбенициллин.

Использование автоматизированной системы MS-2 значительно облегчает работу микробиолога, эпидемиолога и химиотерапевта.

Автоматизированная система повышает интенсивность труда микробиолога, позволяет за счет экономии времени просматривать значительное количество анализов, уделять больше времени первичному посеву, выделению чистых культур из ассоциаций. Наглядно сокращение времени на регистрацию результатов антибиотикограммы с замером зон задержки роста вокруг каждого диска.

Также заметно сокращается время работы лаборанта за счет времени, потраченного на заготовку сред, чашек Петри, раскладывание дисков; экономно расходуются среды.

В среднем на подготовку катриджей для определения чувствительности микроорганизмов лаборант затрачивает 40 мин (на 10 анализов), причем вся работа проводится в наиболее продуктивные утренние часы. Обслуживание прибора во время анализа, замена туб с дисками, бумаги не требует сколько-нибудь существенной затраты времени.

Следует также отметить, что если при работе по методу Бауэр — Керби могут иметь место ошибки субъективного характера, то использование автоматизированной системы исключает их и позволяет стандартизировать метод определения чувствительности микроорганизмов к антибиотикам. Это обстоятельство имеет особенно важное значение для эпидемиолога.

Часто при сравнении штаммов, выделенных из внешней среды и патологического очага, большую помощь оказывает антибиотикограмма выделенных штаммов одного и того же вида.

Методом антибиотикомаркирования была установлена идентичность штаммов, выделенных из окружающей среды и патологического очага, в отделениях института и особенно в отделении интенсивной терапии. Отмечены находки идентичных штаммов *Pseudomonas aeruginosa*, *Acinetobacter calcoaceticus*, *Staph. epidermidis*.

Большое значение имеют методы, запрограммированные в автоматизированной системе, и для выявления источников инфекции. В этом плане показателен клинический случай, когда у больной из кала и из раны высевалась синегнойная палочка с одинаковой антибиотикограммой. В другом случае установлена идентичность штаммов *Staph. epidermidis* с высокой резистентностью к антибиотикам (чувствительность только в ванкомицину), выделенных из зева, трахеи и крови. Как видно из приведенных примеров, в первом случае источником инфекции был кишечник, а во втором — носоглотка.

Интересно клиническое наблюдение за больным Д., у которого после эндопротезирования тазобедренного сустава в течение 9 мес из послеоперационной раны выделялась *Salmonella enteritidis* с одинаковой чувствительностью к амикацину, хлорамфениколу, гентамицину, тобрамицину, цефотаксиму, карбенициллину и канамицину. У больного в анамнезе отмечена сальмонеллезная диарея (к сожалению, антибиотикограмма неизвестна), что дает возможность констатировать факт

персистенции одного и того же штамма на протяжении долгого времени.

Антибиотикограмма позволила сделать заключение об идентичности штаммов *Pseudomonas aeruginosa* при поступлении больных из Армении после землетрясения в декабре 1989 г. У преобладающего числа больных из ран высевались штаммы *Pseudomonas aeruginosa* с достаточно высокой чувствительностью к антибиотикам (амикацину, гентамицину, тобрамицину, канамицину, цефотаксиму, карбенициллину и мезлоциллину). По мере пребывания больных в стационаре они были заменены штаммами, имеющими чувствительность только к амикацину, гентамицину и тобрамицину, что характерно для синегнойной палочки, циркулирующей в стационаре.

Результаты, полученные на автоматизированной системе MS-2, имеют большое значение для наблюдения за лекарственной устойчивостью микроорганизмов по годам.

Так, наблюдение за резистентностью стафилококка за период 1986—1989 гг. показало, что наибольшим колебаниям подверглась резистентность к цефалотину, которая к 1986 г. составляла 7,7 %, а к 1989 г. уже достигла 27,6 %. Резистентность к гентамицину возросла с 18,8 до 32,7 % к 1987 г., а затем стабилизировалась на значениях 24,8 и 24,7 % (1988—1989 гг.). Устойчивость к сульфаметоприму за 1 год (1988—1989) возросла на 14,8 %. Значения резистентности остальных антибиотиков за исследуемый период не подвергались сколько-нибудь значительным колебаниям (см. таблицу).

Идентификация грамотрицательной микрофлоры кишечной группы способствовала значительному повышению качества работы лабораторий.

В настоящее время несомненно этиологическая роль грамотрицательной микрофлоры в развитии раневой инфекции. С помощью системы MS-2 для идентификации было выделено из ран 24 вида энтеробактерий и *Acinetobacter calcoaceticus* v. *anitratus*. Среди энтеробактерий преобладали *Proteus mirabilis* (18,6 %), *E. coli* (16,5 %), *Enterobacter cloacea* (14,3 %), *Proteus vulgaris*, *Klebsiella pneumonia*, *Citrobacter freundii*, *Providencia stuarti*, *Morganella morganii*, *Serratia marcescens*

Устойчивость стафилококка к антибиотикам по данным автоматизированной системы MS-2

Антибиотик	Количество устойчивых штаммов, %			
	1986 г.	1987 г.	1988 г.	1989 г.
Ампициллин	71,5	79,0	86,6	75,4
Цефалотин	7,7	19,9	18,5	27,6
Клиндамицин	31,3	32,8	27,0	28,9
Эритромицин	43,4	37,7	35,8	39,9
Гентамицин	18,8	32,7	24,8	24,7
Оксациллин	29,1	36,1	32,8	48,5
Цефуроксим	26,9	31,0	22,1	—
Азлоциллин	—	73,6	70,3	60,3
Мезлоциллин	—	—	70,4	43,9
Канамицин	29,6	—	42,3	32,8
Цефамандол	—	—	16,4	20,6
Офлоксацин	—	—	28,6	—
Порфлоксацин	—	—	25,0	38,0
Сульфаметоприм	—	—	59,2	74,0
Цефазолин	—	—	35,1	33,5
Ванкомицин	—	—	10,1	10,7
Ципрофлоксацин	—	—	—	27,6
Пенициллин	75,9	—	—	84,1

(10 %), остальные виды выделены в единичных случаях.

Здесь также следует подчеркнуть 2 неопровержимых достоинства автоматизированной системы MS-2 — экономия времени на производство анализа, регистрацию результатов и диагностическое осмысление полученных данных и экономия средств.

Велико значение системы MS-2 для эффективной работы химиотерапевта. Быстрое получение результатов дает возможность вовремя начать соответствующую антибактериальную терапию, следить за динамикой антибиотикограммы. Доступность и быстрота получения антибиотикограммы дает возможность химиотерапевту без привлечения врача-микробиолога оценить результаты и решить вопрос об антибактериальной терапии.

Наряду с многочисленными достоинствами система MS-2 имеет ряд недостатков. Программа системы не учитывает уже внедренные в практику новые антибиотики, диски с которыми уже выпускаются фирмой «Эбботт Лэбораториз». Кроме того, отсутствие компьютера вынуждает вести регистрационный журнал для дальнейшей обработки данных. Известно, что система MS-2 на сегодняшний день несколько устарела, после нее фирмой «Эбботт Лэбораториз» созданы автоматизированные системы следующих поколений, такие как «Avantage» и ARX, где учтены указанные недостатки, расширен спектр идентифицируемой микрофлоры, включая грамположительные кокки и анаэробы.

В целом следует подчеркнуть, что работа с автоматизированной системой MS-2 обогащает кругозор микробиолога и повышает качество работы.

К большому сожалению многих микробиологов, автоматизированные системы доступны лишь ведущим учреждениям страны, а в большинстве лабораторий используются рутинные методы. Ссылка органов здравоохранения на плохое финансовое обеспечение может быть и необоснованной, так как неизвестно, что выгоднее для лаборатории — приобретение автоматизированной системы или огромные затраты труда сотрудников лаборатории на подготовку посуды, автоклавирование, а также ежедневный расход большого количества средств.

© Н. А. БОЧКОВА, 1991

УДК 615.471.03:616-008.8-074:543.42.062

Н. А. Бочкова

МЕТОДИЧЕСКОЕ БИОХИМИЧЕСКОЕ ОБЕСПЕЧЕНИЕ МНОГОКАНАЛЬНЫХ БИОХИМИЧЕСКИХ АНАЛИЗАТОРОВ ФИРМЫ «ЭББОТТ ЛЭБОРАТОРИЗ»

Институт клинической кардиологии им. А. Л. Мясникова, ВКНЦ АМН СССР, Москва

Фирма «Эбботт Лэбораториз» располагает достаточно широким набором биохимических одноканальных и многоканальных анализаторов, выбор которых определяет объем и характер пред-

стоящей работы. «Spectrum» и «EPx» являются многоканальными автоматическими биохимическими анализаторами, рассчитаны на достаточно большой и разнообразный объем работы, позволяют определять многие биохимические параметры (метаболиты, активность ферментов, концентрация ионов), в основе измерения которых лежит принцип спектрофотометрии. Исследуемым материалом может быть любая биологическая жидкость: плазма или сыворотка крови, моча, спинномозговая жидкость, экссудат, трансудат и т. д. Наличие ионселективного модуля позволяет определять электролиты Na, K, Cl, поэтому биохимические анализаторы служат для выполнения широкого диапазона тестов и дифференциальной диагностики заболеваний различных органов и нарушений обмена.

Математическое обеспечение анализаторов такого типа записано на магнитных дисках; это могут быть 2 гибких диска, как, например, у «Прогресса» фирмы «Копе», жесткий диск и гибкие диски («EPx», «Синхрон» фирмы «Бекман»), пузырьковая память («Спектрум»).

«Спектрум» и «EPx» являются анализаторами типа «RANDOM ACCESS», т. е. свободного или произвольного доступа, а это значит, что во время работы анализатора оператор имеет возможность общаться с компьютером, например продолжать заказ требуемых тестов, просматривать результаты готовых исследований, добавить или заказать переделать произвольный тест, оценивать калибровку и т. д. Наличие сенсорного экрана в значительной степени облегчает и убыстряет работу с компьютером. Так, например, все манипуляции с программированием образцов (заказ, добавление и стирание тестов, просмотр и распечатка результатов и т. д.) можно производить из одного экрана.

Однако одним из самых крупных достоинств этих анализаторов является то, что они представляют собой открытые системы, т. е. оператор имеет возможность внести в компьютер все необходимые параметры биохимической реакции и таким образом осуществлять самостоятельное программирование. Открытая система дает возможность адаптации реагентов других фирм, самостоятельно приготовленных субстратных смесей. Возможность эксплуатации прибора с реактивами других фирм является серьезным вопросом, так как покупка многоканального биохимического анализатора в условиях его оптимальной эксплуатации потребует в последующие 5 лет приобретения реактивов на сумму, равную его стоимости. Известно, что стоимость одного биохимического исследования на 50 % определена использованными реактивами, на 30 % — стоимостью анализатора и на 20 % — всеми остальными затратами. Наиболее распространенным вариантом обеспечения многоканальных анализаторов в лабораториях мира является приобретение коммерческих диагностических наборов. Это, конечно, самый удобный, но с экономической точки зрения не всегда оптимальный вариант.

В открытых системах использование тех или иных диагностических наборов продиктовано особенностями технологического процесса, заложенного в системе. Важными технологическими параметрами являются число используемых реакти-

вов и число реагентов, которое анализатор способен внести в измерительную кювету. Хотя большинство биохимических реакций, используемых для автоматического анализатора, может протекать с одним реагентом, возможность использования двух реагентов расширяет выбор применяемой реакции при адаптации. Версия 3.3 «Спектрума» позволяет использовать любые монотесты, а версия 3.7 и «ЕРх» работают уже с двумя реагентами, что дает возможность автоматизировать определение МБ-КК, билирубина по Ендрашику, полуавтоматическое определение мочевины. Использование двух реагентов имеет еще одно преимущество — растворы реактивов каждый по отдельности имеют более длительный срок годности по сравнению со смесью. Инициировать реакцию субстратом более желательно, поскольку преинкубация сыворотки с первым компонентом убирает эндогенные субстраты и кофакторы реакции.

К другим важным технологическим параметрам следует отнести диапазон возможности дозирования сыворотки и реагента, поскольку некоторые диагностические наборы требуют сравнительно большого объема сыворотки (например, ГЛДГ) или, наоборот, маленького по сравнению с объемом реагента (UV-мочевина), при этом надо учитывать конечный объем инкубационной смеси. На «Спектруме» и на «ЕРх» возможна адаптация этих тестов с использованием реактивов как своих, так и других фирм.

При адаптации следует обратить внимание на существующий спектр длин волн и на тип измерения; оно является би- или монохроматическим, поскольку реагенты, рассчитанные на бихроматическое измерение, имеют несколько более высокую начальную абсорбцию. «Спектрум» и «ЕРх» могут работать и в том, и в другом режиме, однако использование бихромата более оправдано, так как аннулируется интерферирующее поглощение.

Свободное программирование времени инкубации, числа и интервала считывания «Спектрума» и «ЕРх» значительно облегчает адаптацию реагентов других фирм.

Возможный диапазон изменения абсорбции за период протекания реакции программируется с помощью начальной и максимальной абсорбции (IA и MA), причем начальная абсорбция определяется абсорбцией реагента и может служить тестом на его пригодность. Если какой-либо из этих параметров выходит за пределы запрограммированной величины, система сигнализирует об этом оператору; проблема решается индивидуально в каждом конкретном случае: либо заменяется реактив, либо перекалибровывается тест, либо разводится сыворотка с высокой активностью фермента или концентрации субстрата. Возможность просмотра промежуточных значений любой протекающей реакции у «ЕРх» помогает интерпретации результата измерения (насколько изменилась абсорбция за период инкубации, удовлетворительна ли линейность и т. д.), облегчает адаптацию реагентов других фирм.

Диапазон линейности теста зависит от метода, заложенного в основе определения биохимического параметра, и обычно дается в инструкции по использованию данного коммерческого набора. При программировании следует обратить внимание, что диапазон линейности имеет ту же размер-

ность, что и нормальные значения определяемого теста.

«Спектрум» и «ЕРх» имеет 2 возможности измерения контроля (запуление абсорбции): по образцу и по реагенту. В тестах, измерение которых проходит при 340 нм, рекомендуется использовать контроль по образцу, при использовании цветного реагента — по реагенту. Наличие контроля и бихроматическое измерение облегчают определение биохимических параметров в гемолизированных и липимеческих сыворотках. Частота выполнения калибровки также закладывается в биохимическую программу оператором и определяется способом измерения (кинетический, по конечной точке и т. д.) и качеством используемого реактива. Принятие калибровки может производиться автоматически, если она удовлетворяет запрограммированным величинам, либо вручную пользователем. Программа автокалибровки через заданный интервал времени и постоянный удовлетворительный контроль качества практически полностью исключают возможность ошибки измерения.

Математическое обеспечение «Спектрума» и «ЕРх» позволяет производить статистическую обработку контроля качества; у «ЕРх» эта программа более расширена.

Следует отметить, что оба биохимических анализатора имеют большой объем памяти для программирования биохимических реакций. У «Спектрума» — 126 тестов, у «ЕРх» — 150, причем нет жесткого разграничения для записи программ на свои реагенты и наборы других фирм. Также не детерминировано количество каналов для записи программ кинетических, многоточечных, по конечной точке, расчетных и т. д.

Наличие у «ЕРх» программы нелинейной калибровки дает возможность выполнения исследования, основанные на турбидиметрии. Это расширяет диапазон использования анализатора и позволяет применять иммунохимические турбидиметрические наборы для определения специфических белков сыворотки крови.

Современная технология иммунохимических исследований позволяет с помощью многоканального биохимического анализатора исследовать активность изоферментов. Это в полной мере относится к МВ-КК, ЛДГ-1, панкреатической амилазе. Преинкубация с соответствующей антисывороткой или другим ингибирующим определенную субъединицу фермента веществом дает возможность определить активность индивидуального изофермента.

«Спектрум» и «ЕРх» имеют программу, позволяющую им работать как автономные программируемые спектрофотометры. Эта программа называется AD READ. С ее помощью можно зафиксировать значение абсорбции любого раствора одновременно по 16 длинам волн. 16-Канальное измерение достигается с помощью диодной решетки в оптической системе анализаторов. Таким образом, данная программа позволяет полностью проследить ход реакции в течение любого заданного интервала времени, облегчает выбор оптимальной первичной и вторичной длины волны, т. е. помогает в адаптации, учитывая оптические характеристики анализатора.

Наличие нескольких режимов работы анализатора (RANDOM, TANDEM, BATCH, FLEX-B) да-

ет возможность оператору в зависимости от потребности и характера работы более рационально использовать рабочее время, а возможность выполнения срочных заказов без нарушения рутинных исследований позволяет использовать эти анализаторы и для плановой биохими, и для обслуживания отделений интенсивной терапии и реанимации.

Математическое обеспечение «ЕРх» позволяет создавать краткую запись истории болезни и формировать архив данных результатов биохимического исследования, что дает возможность проследить изменение биохимических показателей в процессе лечения больного. Работа с архивом данных упорядочивает ведение документации, позволяет использовать получаемую информацию и для научно-исследовательской работы.

В заключение следует отметить, что на «Спектрум» адаптированы реагенты фирм МАЙЛС, БЕРИНГЕР МАННХАЙМ, ЛАБСИСТЕМ, КОНЕ,

БЕКМАН, ХОФМАН ЛЯ РОШ, а также самостоятельно приготовленные субстратные смеси для определения глюкозы (глюкозооксидазным методом), белка, АСТ, АЛТ, ЛДГ, щелочной фосфатазы, γ -ГТ. Растворы для работы ионселективного блока также легко приготовить самостоятельно. Однако как при изготовлении ингредиентов должны быть предъявлены повышенные требования степени очистки. Таким образом, «Спектрум» практически полностью адаптирован к условиям работы клиничко-диагностических лабораторий нашей страны, хорошо зарекомендовал себя при эксплуатации. «ЕРх» только начинает поступать на советский рынок, и, поскольку он является следствием разработкой «Спектрума» и имеет улучшенное математическое обеспечение, а значит, и большие возможности, можно надеяться, что он станет надежным помощником в клиничко-диагностической службе нашей страны.

Поступила 25.05.90

СПИСОК СТАТЕЙ, НАПРАВЛЕННЫХ НА ДЕПОНИРОВАНИЕ В ВИНТИ

УДК 577.11:615.03.001.8

Ацетанилид как модельный препарат для изучения процессов метаболизма чужеродных веществ. Пентюк А. А., Луцок Н. Б., Гуцол В. И., Лычик Г. З., Хадур Р., Яковлева О. А., Станиславчук Н. А. (Рукопись деп. в ВИНТИ 07.06.90, № 3165-В)

УДК 616.36-008.931]-02:614.715]-07

Исследование экспериментального воздействия комплекса атмосферных загрязнителей на активность ферментных систем печени. Мухамбетова Л. Х., Авалиани С. Л., Воитков А. В., Додинска С. И., Салыкина А. А. (Рукопись деп. в ВИНТИ 07.06.90, № 3160-В)

УДК 577.121: [615.3+632.95+547] 2.1

Изменения в микросомах печени крыс, индуцируемые препаратом амниоцен. Божков А. И., Длубовская В. Л., Шерешевская Ц. М., (Рукопись деп. в ВИНТИ 07.06.90, № 3156-В)

УДК 612.123(571.6)

Особенности жирнокислотного состава плазмы и мембран эритроцитов периферической крови у лип, адаптирующихся к Дальневосточному экологическому региону. Луценко М. Т., Целуйко С. С., Бородина Г. П. (Рукопись деп. в ВИНТИ 07.06.90, № 3155-В)

УДК 618.3-092.9-003.725

Влияние некомфортных условий антенатального развития на уровень биогенных аминов и прогестерона у крыс во время беременности. Учакина Р. В., Липатова Т. Ю., Рыжавский Б. Я., Широкова Н. Н. (Рукопись деп. в ВИНТИ 07.06.90, № 3158-В)

УДК 611.78.1:547.1.262.426.1

Влияние растворов формальдегида и алифатических спиртов на свойства кератина волос человека. Дубинская В. А., Николаева С. С. (Рукопись деп. в ВИНТИ 07.06.90, № 3157-В).

УДК 615.224.015.4.07

Сравнительное исследование противоишемической эффективности ряда фармакологических препаратов. Урюпов О. Ю., Томчин А. Б., Виноградов В. М., Козлов С. А., Киселев Е. Н., Зиновьев Ю. В. (Рукопись деп. в ВИНТИ 07.06.90, № 3162-В).

УДК 615.832.8:612.015+612.017:616-092.4.692.46

Влияние гипертермии на состояние антиоксидантной и иммунологических систем организма в эксперименте и клинике. Баллюзек Ф. В., Баскович Г. А., Гончарова Л. Л., Джагилин А. И., Киселева Н. П., Макарова И. Н., Соколовский В. В. (Рукопись деп. в ВИНТИ 07.06.90, № 3161-В).

УДК 616.127:577.161.3

Влияние интала и α -токоферола на течение адреналенового повреждения миокарда. Аматапи В. Г., Матовосян Р. Ш. (Рукопись деп. в ВИНТИ 07.06.90, № 3163-В)

УДК 616.153.922-02:615.38.015.2:615.246.2

Зависимость сорбции холестерина на сиклохроме от скорости перфузии плазмы крови. Шматков Б. А., Андрианова И. П., Цыбульская М. В. (Рукопись деп. в ВИНТИ 07.06.90, № 3159-В)

УДК 612.089:577.175.53+612.766.1

Прямой радиоиммунный анализ глюкокортикоидов и влияние физической нагрузки на их содержание в крови людей и крыс. Морозов В. И., Константинова Т. А., Зорина А. Д., Прияткин С. А., Тимофеева Л. А., Рогозкин В. А. (Рукопись деп. в ВИНТИ 07.06.90, № 3164-В).