

ТОМ 39

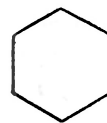
ВЫПУСК 2

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. АРЧАКОВ, И. П. АШМАРИН, Т. Т. БЕ-
РЕЗОВ, 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. СПИ-
РИЧЕВ, 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)

ТУРАКУЛОВ Я. Х. (Ташкент)

ТЯХЕПЫЛД Л. Я. (Тарту)

ЯСАЙТИС А. А. (Вильнюс)



© И. М. Рослый, 1993

УДК 616.98:578.861.1]-031.81-092:577.1

И. М. Рослый

**БИОХИМИЧЕСКИЕ АСПЕКТЫ ПАТОГЕНЕЗА
ГЕНЕРАЛИЗОВАННОЙ МЕНИНГОКОККОВОЙ
ИНФЕКЦИИ**

ЦНИИ эпидемиологии ГКСЭН, Москва

Уникальность менингококковой инфекции в патогенетическом смысле объясняется рядом обстоятельств: во-первых, мощным бактериально-токсическим воздействием на все органы и системы после ее генерализации, т. е. перехода локализованной формы в клинически многообразные варианты поражения организма [23, 27, 38], во-вторых, поражением сердечно-сосудистой системы на всем ее протяжении и особенно в области микроциркуляции, где располагается стратегическая зона при шоке и отмечаются важнейшие расстройства [5, 29, 30, 48], в-третьих, поражением ЦНС, которая лишается способности регулирующего влияния на организм у крайне тяжелых больных [7, 14, 35], в-четвертых, всеми вариантами гипоксии, которые развиваются одномоментно, молниеносно и сохраняются длительное время [4, 24, 31], в-пятых, самыми разнообразными механизмами токсикоза, который дополняется применением мегадоз лекарств и антибиотиков из-за низкой эффективности лекарственной терапии [22, 26, 31], в-шестых, массивным поражением форменных элементов крови [23, 27, 62].

Такое многообразное сочетание клинически явных и скрытых нарушений создает крайне многоликую картину инфекции [28], а главное, формирует самые разные механизмы поражения, адаптации и компенсации [25, 47]. Летальность при менингококковой инфекции высока в силу массивных и сочетанных изменений в жизненно важных органах, где биохимическая адаптация является ответом на различные нарушения и «последним резервом» организма [53]. Биохимическая характеристика ликвора и крови у больных менингококковой инфекцией обычно документирует поражение органов [33, 34, 41], но очень ярко иллюстрирует проявление основных синдромов (тромбогеморрагического, цереброкardiaльного, почечного и т. д.). Однако следует иметь в виду, что при отеке мозга, который развивается у всех тяжелых больных [34, 59, 60], биохимические параметры амбивалентны по природе: они либо участвуют в развитии отека мозга, либо являются следствием его формирования.

Существует две стороны анализа биохимических (в первую очередь энзимологических) показателей с первых часов заболевания: молекулярная (причина изменения показателя) и клиническая

(объяснение клинической картины заболевания). В крови это выглядит следующим образом: раннее обязательное повышение содержания креатинфосфокиназы (КФК) сочетается с высокой ликворной гипертензией [34], повышением удельного периферического сопротивления [30], изменением реологических свойств крови [31], а главное (что свойственно гнойным менингитам любой этиологии) весьма интенсивной работой сердца, которая и детерминирует гигантскую КФК — гиперферментемию [40] как один из характернейших биохимических признаков менингококковой инфекции. Физиологическим фоном этого феномена является кислородно-субстратный блок [24], который типичен для миокардиальной недостаточности [20], однако ее, за исключением тяжелых шоков, и не наблюдают, т. е. все механизмы компенсации обеспечивают работу сердца. Нарушение барьерной функции мембран [8] с повышением стабильности характерных изоформ и удлинением срока их полужизни объясняет длительное повышение уровня активности КФК в крови. Только сочетание этих молекулярных механизмов способно обеспечить длительную (7—10 сут) и гигантскую (в 5—35 раз выше нормы) гиперферментемию.

Именно при менингококковой инфекции напрямую затрагивается креатинфосфокиназная система сердца, что на электрофизиологическом уровне проявляется синдромом Хеглина (различие времени электрической и механической систол) и регистрируется изменением ЭКГ [36]. Укорочение механической систолы по сравнению с электрической является следствием расстройства реполяризации с возрастанием активности АТФаз (за исключением шока) и является результатом не гиподинамии, а увеличения мощности сердечных сокращений. Функционирование сердца происходит длительное время на пределе компенсации, и формируется гиподинамический тип кровообращения, который имеет биохимические признаки у самой разной категории больных [40]. Важно также, что клиницисты рассматривают это состояние как гиперфункцию миокарда по изометрическому типу [28]. Ранее биохимики они зарегистрировали синдром снижения сократимости миокарда [18], точно обозначив смысл биохимических параметров (снижение сократимости равно повышению уровня активности КФК в крови). Таким образом, ранняя и гигантская КФК-гиперферментемия [34, 40] на фоне гиперлипотеинемии с повышенным содержанием длинноцепочечных жирных кислот в крови [42] дополняет клинико-электрофизиологическую картину острого периода менингококковой инфекции и является ее характерной особенностью. Неясен механизм гиперферментемии, но он является следствием всех перечисленных патогенетических нарушений. Волемические нарушения обязательно связаны и с пептидами сердца [2], интерес к кото-

рым возник в последнее время после установления состава гранул предсердия.

Гиперлиппротеинемия сопровождается накоплением в крови жирных кислот (основной энергетический субстрат сердца), но без адекватного обеспечения кислородом [24, 40, 43, 44], что может приводить к усилению цитолиза клеток сердца и эндотелия [64, 65]. Крайних значений этот показатель достигает при шоке, когда одновременно нарушено окисление и других субстратов, в частности лактата и пирувата [39, 55]. Длительное и стойкое нарушение микроциркуляции [48] и выявляет одно из слабых мест всеолярного пути [56] и служит объяснением повышения уровня субстратов. В генезе органических поражений при шоке [41] одной из основных причин являются микроциркуляторные расстройства, которые при полном блоке приводят к централизации кровообращения, артериовенозному шунтированию при совершенно нормальном уровне ферментов в крови. Если при шоках неинфекционной природы можно зафиксировать классическую последовательность событий, приводящих к цитолизу (гипоксия→гликолиз→ацидоз→гидролиз), распад лизосом и лизис клеток [56], то бактериально-токсический компонент при менингококковой инфекции является не только инициирующим, но и ведущим. Цитолиз подтверждается гиперферментемией [34, 39], и она лишь усиливается гипоксическими повреждениями.

Уровень β -липопротеинов в крови при несложном течении менингококковой инфекции и отсутствии энзимологических признаков поражения органов [5, 40] коррелирует с содержанием фибриногена; их суммарный уровень составляет около 1000 мг% при нормальном состоянии сосудистой системы и эффективности общего регулятора — гепарина [4, 40], который является активатором липопротеинлипазы и антагонистом свертывающей системы. Содержание триглицеридов и жирных кислот у тяжелых больных повышено, что свидетельствует о метаболическом блоке и неспособности сердца усваивать жирные кислоты [20, 42, 44]. В этом случае они выступают в качестве энергетического субстрата, что крайне важно при менингококковой инфекции, так как характерной ее особенностью является нарушение транскапиллярного газообмена [24] с нарушением трофической функции рыхлой соединительной ткани [5], т. е. капиллярно-межклеточного пространства. В остром периоде максимум сердечной КФК соответствует максимуму β -липопротеинов, как бы указывая основную метаболическую причину физиологического феномена — снижения сократительной способности миокарда [18]. Повышение содержания β -липопротеинов, жирных кислот, инсулина сопровождается метаболической иммунодепрессией [21], которая отмечается у больных менингококковой инфекцией.

Неоднозначно толкование динамики лактатдегидрогеназы (ЛДГ), которая обычно появляется вслед за КФК и связана с внутрисосудистым цитолизом форменных элементов крови при тромбеморрагическом синдроме [27, 48]. Попытка выявления изоформ ЛДГ в ранние сроки заболевания позволила установить быстрое изменение их процентного соотношения, что указывает на

роль адаптивных изменений. Истинно сердечные ЛДГ (ЛДГ₁ и ЛДГ₂) свидетельствуют о незначительном характере поражения сердца [34, 41] и также указывают на адаптивный характер раннего повышения КФК. Несовпадение динамики сердечных ферментов свидетельствует о сложных биохимических процессах в сердце как следствии полисиндромальной сущности менингококковой инфекции (основная причина ее тяжести) со всеми вариантами цитолитических процессов [8, 44].

Установлено, что аспартаттрансаминаза (АСТ) является маркером перекисного окисления липидов (ПОЛ). В динамике АСТ появляется позже КФК и ЛДГ [34, 40] с максимумом на 5—7-е сутки, что можно рассматривать как признак восстановления кровообращения [37, 44] в тканях. Поступление кислорода в пораженные области приводит к усилению ПОЛ и требует медикаментозной коррекции антиоксидантами. Есть основания считать, что повышение содержания КФК связано с фосфолипазным механизмом цитолиза [8], а при шоках — и с иммунокомплексным повреждением [8, 10], а повышение АСТ — с механизмом ПОЛ биомембран [43, 44].

Пируват и лактат являются теми биохимическими компонентами внутренней среды организма, которые могут детерминировать характер ферментемии. Между уровнем активности ЛДГ и содержанием лактата и пирувата выявляется взаимосвязь, отмечаемая в различных по тяжести группах больных при менингококковой инфекции [55].

Результаты определения содержания β -липопротеинов и триглицеридов крови можно использовать для оценки тяжести состояния больных, а также регулируемости липолиза и свертывания при участии гепарина. Данные об уровне малонового диальдегида (МДА), способного превращаться в ацетат и «сгорать» в цикле трикарбоновых кислот [1, 3], можно использовать для оценки эффективности применения гипербарической оксигенации (ГБО) у больных. Выраженный длительный гипоксический статус требует быстрой коррекции; и уровень МДА указывает на эффективность удаления недоокисленных продуктов. Клинически ГБО сопровождается [32] исчезновением головной боли, улучшением гемодинамических показателей. При этом [12] угнетение сократительной способности миокарда и синдром низкого сердечного выброса отмечаются вследствие повреждения систем транспорта Ca^{2+} и митохондрий продуктами ПОЛ, содержание которых резко повышено при менингококковой инфекции [37, 43, 44]. Целесообразность проведения ГБО подтверждается не только улучшением клинического состояния, но и подавлением ранее установленного механизма цитолиза за счет усиления ПОЛ [37, 43, 44]. Для получения благоприятного эффекта процедуру ГБО следует проводить на фоне нормально функционирующей антиоксидантной системы и при отсутствии повышения АСТ в динамике; в противном случае возможно усиление цитолиза [37, 43, 44]. Правомочность осуществления антигипоксических мер после завершения острого периода подтверждается и длительным присутствием аденилаткиназы (АК) в ликворе больных на 7—10-е сутки [35, 54], когда другие ферменты в нем не определяются.

Это явление служит сигналом угнетения энергетических процессов в мозге [19], а быстрое восстановление всех его функций крайне необходимо. Не случайно больные отмечают быстрое исчезновение головной боли после сеансов ГБО [32]. Среди других ферментов именно АК является истинным сигналом способности клетки к восстановлению энергетических потребностей, т. е. признаком компенсаторных явлений, в отличие от пирувата и лактата, которые свидетельствуют лишь о блоке путей окисления [19, 54].

Роль печени в глюконеогенезе (а значит, и в удалении избытка энергетических субстратов) известна давно [15]. Печеночная недостаточность присуща необратимым шокам, и энзимологические показатели это хорошо регистрируют [39]. При неосложненных формах менингококковой инфекции поражение печени имеет характер перенесенного бактериально-токсического и медикаментозного токсикоза [22, 38]. Из всех печеночных ферментов чаще регистрируется аланин-трансаминаза (АЛТ), а щелочная фосфатаза (ЩФ) и γ -глутамилтрансфераза (ГГТ) имеют своеобразную динамику и определяются гораздо реже [33, 40, 41]. Характер динамики ГГТ связан с участием фермента в обмене биогенных аминов, которые появляются в крови рано и определяются длительное время [46, 47]. Все стрессорные реакции также характеризуются угнетением ГГТ [13]. В монотонном и невысоком уровне ЩФ с учетом длительности микроциркуляторных нарушений [48] скорее угадываются признаки нарушения в эндотелии сосудов, содержание которого в организме составляет около 3 кг [52]. В целом резервные возможности печени вполне обеспечивают метаболические изменения при инфекции.

Ранее описанная нами гиперлипопротеинемия острого периода [42—44] несет в себе черты биохимических механизмов стресса [21, 25, 47]. Причем стрессорный ответ также является одной из уникальных особенностей менингококковой инфекции [47]. Синтез гормонов адреналового звена прерывается у выживших больных [25, 38, 47] на уровне предшественников, что имеет свой защитный (самогенетический) смысл как предупреждение нежелательных гипергормональных эффектов. Такая особенность биохимического ответа как бы предопределяет два варианта исхода заболевания; печени при этом принадлежит антиоксидантная роль в обмене и обезвреживании избытка гормонов и их предшественников.

Почки являются критическим органом при шоке; первопричиной их поражения являются гемодинамические нарушения [26]. Креатинин относится к тем метаболитам, поступление которых в ликвор блокируется [60]; при менингитах содержание его в крови и ликворе выравнивается, что является не только свидетельством нарушения барьера кровь — ликвор, но и возможной причины коматозного состояния как результата многочисленных воздействий ряда компонентов крови на мозг. Восстановление барьера означает и восстановление концентрационных различий (в частности, уровня креатинина) в крови и ликворе.

Проблема эндотоксикоза многогранна при любом патологическом состоянии [38], а блок метаболического пути с накоплением промежуточных

продуктов часто объясняет клиническую симптоматику наследственного заболевания [50]. При менингококковой инфекции имеет место не только блок путей энергетического обмена, но и временное нарушение других метаболических путей, так как окисление затруднено за счет всех видов гипоксии, а артериовенозное шунтирование изначально может стать ведущим [45]. Превращения же в дальнейшем нарушены повреждениями клеток различного генеза [8, 37, 44]. Косвенным свидетельством такого эндотоксикоза является накопление в крови среднемолекулярных пептидов, уровень которых сильно нарастает за счет мощного протеолиза компонентов свертывающей системы [27, 48]. Проблема протеолиза является неразработанной областью молекулярной биологии [11]. В большинстве работ отмечается лишь ускорение метаболизма белков (особенно при воспалении [63]), а роль образующихся продуктов сводится лишь к «загрязнению» внутренней среды. В последнее время появились сообщения о протекторной роли продуктов распада белков при усилении ПОЛ [1, 6, 51] и нейтрализации эндотоксина в фибриновых сгустках. Существующая связь между усилением ПОЛ и накоплением среднемолекулярных пептидов в крови при менингококковой инфекции [27, 30] и после восстановления кровообращения (реперфузия тканей) требует значительных количеств протекторов от возможной деструкции кислородными радикалами [40, 41, 44]. Пептиды при менингококковой инфекции могут играть роль важных защитных компонентов. Это еще одна особенность инфекции, требующая правильной клинической трактовки и адекватной патогенетической терапии. Фактически улучшение гемодинамики и клинического состояния сопровождается ухудшением биохимических показателей (повышение содержания пептидов и АСТ).

Внутрисосудистый цитоллиз приводит к значительной деградации форменных элементов, и сохранение гемоглобина в организме обеспечивается гаптоглобином, содержание которого резко повышается к 15—20-м суткам, как было установлено с помощью двухмерного электрофореза [23, 27, 40].

Большинство патологических процессов сопровождается поражением клеток за счет 4 известных механизмов [8]. При менингококковой инфекции участвуют все эти механизмы, но для каждой клинической формы характерно различное их сочетание. Шоки, особенно необратимые, характеризуются иммунокомплексным поражением, что и формирует гигантскую гиперферментемию, и отличается необратимые шоки от обратимых [39, 41]. Эта особенность отмечается как морфологами, так и иммунологами [57]. Генерализованный характер цитолитических явлений проявляется и в резком нарушении состава аминокислот в крови [58], а классические исследования показывают, что трансмембранный перенос аминокислот осуществляется против градиента концентрации и требует значительного энергопотребления. Накопление аминокислот при этом есть следствие 3 механизмов: воспаления, ускоренного протеолиза [27, 63] и нарушения барьерной функции мембран. Этому способствует угнетение энергетического обмена [8, 37, 44], а также усиление катаболизма

белков за счет острой гипоксии. Отсюда понятно накопление не только пептидов, но и аминокислот с увеличением уровня недоокисленных субстратов и гиперферментемией [8, 41].

Проблема эндотоксикоза при менингококковой инфекции крайне сложна. Усилия клиницистов по внедрению методов сорбционной детоксикации [26] скорее мотивированы желанием помочь больному, нежели пониманием смысла развивающихся процессов. Гипоксия с нарушением процессов окисления эндогенных субстратов способна усиливать картину эндотоксикоза, развившегося под действием эндотоксина возбудителя на клетки с накоплением продуктов их распада. Повышение активности лизосомальной β -глюкуронидазы (БГ), которое в свое время рассматривалось как патогномоничное для шоков [61], отмечается не у всех больных и является следствием токсического и гипоксического поражения клеток. Фермент появляется в крови как в остром периоде, так и в последующие сутки [33] и не только свидетельствует о глубине тканевых повреждений, но и является признаком еще одного механизма токсикоза в силу способности разрушать глюкурониды разных соединений и создавать фонд необезвреженных метаболитов, нарушая один из путей удаления чужеродных соединений [9, 49]. Повышение активности БГ может и не совпадать с повышением уровня других ферментов цитолиза, что также подтверждает мысль об адаптивном, а не токсическом характере ферментемии. Отношение исследователей к указанному ферменту в последние годы неоднозначно; его используют как показатель интенсивности воспаления, регулятор деградации и утилизации белков, признак усиления деструкции клеток при гипоксии, фактор прогноза при шоке, а также индикатор гипоксических повреждений сердца [17, 60], что имеет место и при менингококковой инфекции. Нерегулируемый цитолиз с накоплением в крови продуктов деградированных клеток (например, лейкоцитов) также является существенным механизмом токсикоза в условиях гипоксии.

По силе деструктивных процессов с менингококковой инфекцией может сравниться ожоговая болезнь, при которой накопление продуктов распада белков способно давать картину явной энцефалопатии при высоком уровне пептидов не только в крови, но и в ликворе [16, 51]. При менингококковой инфекции накопление пептидных продуктов способно быть дополнительным патогенетическим фактором у коматозных больных с поражением ЦНС [51].

Менингококковая инфекция характеризуется одновременностью выхода ферментов в кровь на протяжении длительного периода заболевания [33, 34, 41, 44], что свидетельствует не только о поражении клеток, но и о дополнительных причинах гиперферментемии. Так, нарушение кровообращения при менингококковых менингоэнцефалитах с формированием гипоксического типа [30, 31] является результатом вазопрессорного эффекта за счет высокого внутричерепного давления, а отсутствие выраженных изменений на ЭКГ связано не только с диффузным характером поражения сердца, но и с адаптивными явлениями в нем. Причинно-следственные отношения при инфекции крайне осложнены много-

численными патогенетическими расстройствами, когда ведущими становятся сосудистые изменения [5, 30, 31, 48]. Конечное звено сосудистой системы — зона микроциркуляции — характеризуется способностью отбирать кислород в ткани при крайне низком его давлении, и именно здесь достигается предел его диффузии за счет нарушения также функции рыхлой соединительной ткани [5] и поражения эндотелия [27, 48]. Поэтому необычные сроки и уровни изменения показателей можно рассматривать только с учетом этих событий.

ЛИТЕРАТУРА

1. Александрович А. Г., Ананьева А. Г., Дмитриева А. И. // *Вопр. мед. химии.*— 1983.— № 5.— С. 620—624.
2. Алексеенко Л. П., Орехович В. // *Там же.*— 1988.— № 3.— С. 2—15.
3. Банкова В. В., Никанорова Т. И., Полякова С. Д. // *Там же.*— 1980.— № 6.— С. 27—30.
4. Булычев В. В., Давыдовский В. И., Серегин И. И. // *Клин. мед.*— 1986.— № 11.— С. 23—31.
5. Булычев В. В., Рослый И. М., Титов В. В. // *Там же.*— 1988.— № 3.— С. 111—118.
6. Вальдман Б. М., Волчегорский И. А., Пужевский А. С. // *Вопр. мед. химии.*— 1990.— № 1.— С. 23—26.
7. Венгеров Ю. Я., Белобородов В. Б., Бронякин Ю. В. // *Сов. мед.*— 1989.— № 11.— С. 104—110.
8. Владимиров Ю. В. Роль нарушений барьерной и матричной функции липидного слоя мембран в патологии: Актовая речь.— М., 1985.
9. Голиков С. Н., Саноцкий И. В., Тиунов Л. Л. Общие механизмы токсического действия.— М., 1986.
10. Гуревич П. С., Барсуков В. С. // *Всесоюзная конф. по иммунологическим аспектам инфекционной патологии.*— Таллинн, 1981.— С. 119—121.
11. Долгих В. Т. // *Вопр. мед. химии.*— 1987.— № 6.— С. 31—36.
12. Дин Р. Процессы распада в клетке.— М., 1981.
13. Колесниченко Л. С., Манторова Н. С., Шапиро Л. А. // *Вопр. мед. химии.*— 1987.— № 3.— С. 85—88.
14. Макарова Г. В. Закономерности изменения функционального состояния мозга при острых инфекционных заболеваниях: Автореф. дис. ... д-ра мед. наук.— М., 1989.
15. Мак-Мюррей У. Обмен веществ у человека.— М., 1980.
16. Маркелов К. М., Вихриев Е. Б., Тушикова З. А. // *Вопр. мед. химии.*— 1983.— № 3.— С. 105—109.
17. Материалы 3-го Всесоюзного симпозиума «Структура и функции лизосом».— Тбилиси; М., 1986.
18. Мелиник Г. В. Нарушение сократительности миокарда и периферического кровообращения у больных генерализованной менингококковой инфекцией: Автореф. дис. ... канд. мед. наук.— М., 1978.
19. Нисхолом Э., Старт К. Регуляция метаболизма.— М., 1977.
20. Ольбинская Л. И., Литвицкий П. Ф. Коронарная и миокардиальная недостаточность.— М., 1986.
21. Панин Л. Е. Биохимические механизмы стресса.— Новосибирск, 1983.
22. Покровский В. И. Гнойные менингиты: Автореф. дис. ... д-ра мед. наук.— М., 1965.
23. Покровский В. И., Булычев В. В., Ломазова К. Д. // *Бюл. экспер. биол.*— 1982.— № 3.— С. 92—94.
24. Покровский В. И., Булычев В. В., Серегин Г. И. // *Анест. и реаниматол.*— 1978.— № 6.— С. 68—73.
25. Покровский В. И., Змызгова А. В., Сирина Л. К. // *Сов. мед.*— 1976.— № 5.— С. 13—16.
26. Покровский В. И., Радзивиц Г. Г., Белобородов В. Б. // *Тер. арх.*— 1986.— № 9.— С. 117—122.
27. Покровский В. И., Ломазова К. Д., Полякова А. М. // *Всесоюзная конф. «Менингококковая инфекция и гнойные менингиты».*— Архангельск, 1986.— С. 170—172.
28. Покровский В. И., Фаворова Н. А., Костюкова Н. Н. Менингококковая инфекция.— М., 1986.
29. Радзивиц Г. Г., Бронякин Ю. В., Белобородов В. Б. // *Кардиология.*— 1989.— № 6.— С. 115—118.
30. Радзивиц Г. Г., Белобородов В. Б., Бронякин Ю. В. // *Сов. мед.*— 1990.— № 6.— С. 7—10.
31. Радзивиц Г. Г., Белобородов В. Б., Бронякин Ю. В. // *Анест. и реаниматол.*— 1987.— № 2.— С. 46—51.

32. Радзивил Г. Г., Макарова Г. В., Рослый И. М. // Всесоюзная конф. «Менингококковая инфекция и гнойные менингиты». — Новосибирск, 1990. — Т. 2. — С. 75—78.
33. Радзивил Г. Г., Рослый И. М. // Тер. арх. — 1988. — № 2. — С. 59—65.
34. Радзивил Г. Г., Рослый И. М. // Там же. — № 11. — С. 53—58.
35. Радзивил Г. Г., Рослый И. М. // Там же. — 1989. — № 11. — С. 18—24.
36. Розенман В. М., Гоман Г. П., Мальковец Г. И. // Всесоюзная конф. «Менингококковая инфекция и гнойные менингиты». — Архангельск, 1986. — С. 183—185.
37. Ромм А. Р., Рослый И. М., Козлов А. В. // Бюл. exper. биол. — 1987. — № 6. — С. 672—675.
38. Рослый И. М. // Тер. арх. — 1989. — № 11. — С. 149—151.
39. Рослый И. М. // Сов. мед. — 1989. — № 12. — С. 100—105.
40. Рослый И. М., Радзивил Г. Г. // Клин. мед. — 1989. — № 4. — С. 54—59.
41. Рослый И. М., Радзивил Г. Г. // Казан. мед. журн. — 1990. — № 5. — С. 346—352.
42. Рослый И. М., Миримский А. С., Ремизова И. Р. // Вопр. мед. химии. — 1990. — № 6. — С. 69—71.
43. Рослый И. М., Ромм А. Р., Козлов А. В. // Бюл. exper. биол. — 1987. — № 6. — С. 672—675.
44. Рослый И. М., Ромм А. Р., Азизова О. А. // Пат. физиол. — 1990. — № 4. — С. 40—41.
45. Серегин Г. И. // Съезд инфекционистов ГССР, 1-й: Материалы. — Тбилиси, 1978. — С. 145—148.
46. Сирина Л. К., Смирнова В. К. // Всесоюзная конф. «Актуальные вопросы эпидемиологии и инфекционных болезней». — М., 1978. — С. 120—122.
47. Сирина Л. К. Функциональное состояние систем адаптации у больных менингококковой инфекцией: Автореф. дис. ... д-ра мед. наук. — М., 1980.
48. Титов В. В. Микрогемоциркуляция у больных менингококковой и пневмококковой инфекций и возможности коррекции ее нарушений: Автореф. дис. ... д-ра мед. наук. — М., 1990.
49. Тиунов Л. А. // Вестн. АН СССР. — 1991. — № 1. — С. 8—12.
50. Тосиоки Я., Кадзунори С., Сусуму С. Биохимия наследственности. — М., 1979.
51. Тупикова З. А., Осипович В. К. // Вопр. мед. химии. — 1990. — № 3. — С. 24—26.
52. Хашек Р., Шейх Д. Очерки по патологической биохимии. — М., 1981.
53. Хочачка П., Самеро Дж. Стратегия биохимической адаптации. — М., 1977.
54. Шадия Абдалла А. М. // Симпозиум по медицинской энзимологии: Материалы. — М., 1986. — С. 237.
55. Шевченко В. П., Шевченко В. П. Изменение содержания лактата и пирувата и активность лактатдегидрогеназы в крови и ликворе у больных менингококковой инфекцией: Автореф. дис. ... канд. мед. наук. — М., 1976.
56. Шугей Ю., Бендилье Т. Шок. — Бухарест, 1981.
57. Яковлев М. Ю. Функциональная морфология миокарда при экспериментальном инфекционно-токсическом шоке: Дис. ... канд. мед. наук. — М., 1980.
58. Яснецова Л. Ф. Клиническое значение изменений спектра свободных аминокислот в спинномозговой жидкости у детей: Автореф. дис. ... канд. мед. наук. — Саратов, 1981.
59. Dawson H. J. // Advanc. Neurol. — 1978. — Vol. 20. — P. 189—197.
60. Dawson H. J. // J. Physiol. (Lond.). — 1976. — Vol. 255. — P. 1—28.
61. Demling R. H., Proctor R. // J. surg. Res. — 1981. — Vol. 30. — P. 135—141.
62. Morrison D. C. // Amer. J. Path. — 1978. — Vol. 93. — P. 527—534.
63. Tongren S. // Scand J. infect. Dis. — 1980. — Vol. 12. — P. 55—60.
64. Wenzel T. G. // Toxicology. — 1978. — Vol. 14, N 11. — P. 109—117.
65. Wenzel T. G. // Ibid. — P. 119—125.

Поступила 27.02.91

ОРИГИНАЛЬНЫЕ СТАТЬИ

© Ф. З. МЕЕРСОН, Ю. Н. КОПЫЛОВ, 1993

УДК 612.014.49.06:613.8631.08

Ф. З. Меерсон, Ю. Н. Копылов

РОЛЬ ИНОЗИТОЛФОСФАТНОГО ЦИКЛА В КАРДИОПРОТЕКТОРНОМ ЭФФЕКТЕ АДАПТАЦИИ К ПОВТОРНЫМ СТРЕССОРНЫМ ВОЗДЕЙСТВИЯМ

НИИ общей патологии и патологической физиологии РАМН, Москва

Адаптация к повторным кратковременным стрессорным воздействиям обладает выраженным кардиопротекторным эффектом. Этот эффект состоит в том, что адаптированные животные имеют повышенную резистентность к ишемическим и реперфузионным аритмиям, нарушению сократительной функции сердца при инфаркте миокарда. Под влиянием адаптации у них исчезали нарушения электрической стабильности при постинфарктном кардиосклерозе. Эта адаптационная защита была объяснена активацией нейроэндокринных стресс-лимитирующих систем, блокирующих стресс, который обычно сопровождается острой ишемией миокарда [18]. Но кардиопротекторный эффект адаптации к стрессу в полной мере сохра-

няется на изолированных сердцах адаптированных животных. Эти сердца обладали резко повышенной устойчивостью к реперфузионному и Ca^{2+} -парадоксу, а также к термическому повреждению [1, 5, 18]. Элементы саркоплазматического ретикулума (СПР) [21] и митохондрии [1], изолированные из сердца адаптированных животных, обладают повышенной резистентностью к аутолизу [19], а ядра отличаются высокой резистентностью к действию одноцепочечной ДНК, которая активирует нуклеопротеазы [4]. Комплекс этих адаптационных сдвигов был обозначен как феномен адаптационной стабилизации структур (ФАСС). При изучении молекулярного механизма ФАСС было установлено, что существенную роль в его развитии играет многократное увеличение содержания в миокарде хит-шок белков (HSP) с мол. м. 71—72 кД [20].

При объяснении механизма накопления HSP и формирования ФАСС было высказано предположение [17], что при многократном повторении стрессорной ситуации стресс-гормоны действуют на α_1 -адренорецепторы и другие Ca^{2+} -мобилизующие рецепторы, которые через фосфолипазу С (ФЛ-С) активируют фосфоинозитидный обмен [7]. Избыток образующегося инозитолтрифосфата (ИТФ), действуя на рецепторы СПР, вызывает выход Ca^{2+} в саркоплазму, а диацилглицерол

(ДАГ), действуя через протеинкиназу С (ПК-С), активирует фосфорилирование белков и как следствие может вызывать активацию различных генов, и в частности генов, детерминирующих образование HSP [23].

До недавнего времени для проверки этого предположения могли быть использованы лишь биохимические методы, а именно анализ состояния Ca^{2+} -мобилизующих рецепторов, активности ФЛ-С и других звеньев ИТФ — ДАГ регуляторного каскада. Однако недавно был обоснован физиологический метод [24], который позволяет оценить активность ИТФ — ДАГ регуляторного каскада по реакции пиллярной мышцы левого желудочка на действие селективного агониста α_1 -адренорецепторов фенилэфрина. В процессе этой реакции величина первоначального кратковременного положительного инотропного эффекта отражает увеличение содержания ИТФ в саркоплазме, а отставленная во времени фаза стойкого положительного инотропного эффекта отражает ДАГ-индуцированную активацию ПК-С, которая в свою очередь приводит к фосфорилированию транссарколеммальных белков медленных Ca^{2+} -каналов и увеличивает содержание внутриклеточного Ca^{2+} .

Эти данные позволяют использовать для оценки состояния ИТФ — ДАГ регуляторного каскада при адаптации к стрессорным воздействиям как физиологические, так и биохимические методы.

Цель работы состояла в том, чтобы оценить состояние ИТФ — ДАГ регуляторного контура при развитии адаптации к кратковременным стрессорным воздействиям на основе данных о реакции изолированного сердца на фенилэфрин, состоянии α_1 -адренорецепторов и активности ФЛ-С, а затем сопоставить динамику этих параметров в ходе адаптации с развитием ФАСС.

Методика. Исследования были проведены на крысах-самцах линии Вистар. Адаптацию к кратковременным стрессорным воздействиям производили с помощью иммобилизации животных на спине через день с увеличением длительности от 15 мин в первый раз до 1 ч к четвертому разу. Общая длительность адаптации составляла 8 или 15 сеансов иммобилизации (соответственно 15 или 30 дней). Животных брали в эксперимент или забивали на следующий день после завершения курса адаптации.

На первом этапе работы мы изучали α_1 -адренореактивность изолированного сердца адаптированных к кратковременным стрессорным воздействиям животных, на втором этапе биохимическими методами оценивали состояние α_1 -адренорецепторов и активность ФЛ-С в миокарде, на третьем этапе изучали сократительную функцию сердца и его резистентность к острой аноксии в условиях целого организма, а также резистентность изолированного сердца к реперфузионному парадоксу на обоих указанных этапах адаптации.

Определение α_1 -адренореактивности изолированного сердца. Для изучения ответа изолированного сердца на стимуляцию селективным α_1 -агонистом фенилэфрином животным вводили внутривенно 2000 ЕД/кг гепарина, под нембуталовым наркозом (50 мг/кг внутривенно) вскрывали грудную клетку, сердце быстро извлекали и помещали в перфузионную систему по Лангендорфу. Время от момента вскрытия грудной клетки до подключения сердца в перфузионную систему составляло не более 1 мин. Для перфузии использовали стандартный раствор Кребса — Хензелья следующего состава (в мМ): NaCl 120, NaHCO_3 20, KCl 4,8, CaCl_2 2,5, MgSO_4 1,2, KH_2PO_4 1,2, глюкоза 11. Использовали реактивы объединения «Союзреактив» (СНГ) квалификации х. ч. Раствор аэрировали газовой смесью 95 % O_2 и 5 % CO_2 при температуре 37 °С. При этом pH устанавливался в диапазоне 7,3—7,4. Перфузионное давление составляло 95 кПа (97 см вод. ст.). После 20-минутного периода стабилизации изолированного сердца в условиях ретроградной перфузии изме-

ряли частоту сердечных сокращений и регистрировали основные параметры механической и электрической активности: амплитуду, скорость сокращения и скорость расслабления и ЭКГ. Механическую активность изолированного сердца регистрировали при помощи изотонического датчика TD-112 («Nihon Kohden», Япония), соединенного с верхушкой сердца, что позволяло записывать анико-базальное укорочение сердца с точностью до 0,01 мм. Регистрацию ЭКГ и механической активности производили с помощью специализированных модулей полиграфа RM-6000: ECG amplifier AC-600G, Differentiator ED-600G, $t=0,5$; Isotonic coupler EG-650H; Coupler amplifier AA-600H — и осциллоскопа VC-9 («Nihon Kohden», Япония). Электроды для регистрации ЭКГ размещали на аорте и на левом желудочке.

При определении α_1 -адренореактивности в перфузионный раствор во время периода стабилизации деятельности сердца за 10 мин до введения в концентрацию $1 \cdot 10^{-5}$ М фенилэфрина («Sigma», США) в концентрации 10 мкМ вводили пропранолол («Sigma», США) ($3 \cdot 10^{-7}$ М).

Определение α_1 -адренорецепторов и активности ФЛ-С в плазматических мембранах миокарда. Выделение плазматических мембран сердца проводили по методу [16] с некоторыми модификациями. Измерение связывания ^3H -проazosина с α_1 -адренорецепторами проводили по методу [15, 16]. Реакцию связывания лигандов с рецепторами останавливали быстрым добавлением 15 мл холодного буфера того же состава и pH при 4 °С с последующей фильтрацией через фильтры GF/C («Wathman», Англия). Фильтры помещали во флаконы с диоксидным сцинтиллятором и определяли радиоактивность на сцинтилляционном счетчике «Rack Beta» (LKB, Швеция). Расчет количества рецепторов (B_{max}), а также константы диссоциации лиганда (K_d) — величины обратной степени аффинности рецепторов — проводили на персональном компьютере с использованием программы EBDA/Ligand для IBM-PC (McFerson, 1984).

Определение активности специфичной к фосфоинозитидам ФЛ-С проводили в 50 мкл среды, содержащей 25 мМ трис-малеатный буфер pH 6,0, 1 мМ Mg^{2+} , 1,5 мМ хлорид Na, 200 мкМ ЭГТА и 0—300 мкМ CaCl_2 . Инкубационная среда содержала липосомы, приготовленные из грубой фракции фосфоинозитидов мозга быка («Sigma», США) по 10 мкг на пробу, содержащие ^3H -фосфатидилинозитол-4,5-дифосфат (ФИФ₂) («Amersham», Англия; 16 000—20 000 dpm на пробу). Для определения зависимости ФЛ-С от Ca^{2+} измерения проводили в отсутствие экзогенного кальция и с добавлением возрастающих концентраций CaCl_2 (50, 100, 200, 300 мкМ) на фоне 200 мкМ ЭГТА. Это позволяло варьировать концентрацию свободных ионов Ca^{2+} в среде инкубации от величин ниже 10^{-7} М до уровня порядка 100—200 мкМ, в пределах которых наблюдается Ca^{2+} -зависимость ФЛ-С [26]. Реакцию начинали добавлением взвеси плазматических мембран (50 мкг белка в пробу). Ровно через 5 мин инкубации при 37 °С реакцию останавливали добавлением 188 мкл смеси хлороформ — метанол — HCl (100:200:3), тщательно перемешивали, через 10 мин добавляли 50 мкл хлороформа и 50 мкл 1,8 М KCl и еще раз тщательно перемешивали. После расслоения фаз из верхней фазы отбирали 50 мкл, помещали во флаконы с тритон-толуольным сцинтиллятором и определяли радиоактивность на сцинтилляционном счетчике «Rack Beta» (LKB, Швеция). Активность фосфолипазы С выражали в процентах гидролизованного за 5 мин ^3H -ФИФ₂ на 50 мкг белка. Все эксперименты проводили в трех параллельных пробах. Белок определяли по методу [25].

Оценка сократительной функции сердца и его резистентности к острой аноксии в условиях целого организма. Сократительную функцию сердца *in situ* изучали в острых опытах. Для этого у наркотизированных (нембутал 50 мг/кг) животных производили трахеотомию и интубацию. Животное переводили на искусственное дыхание воздухом, для

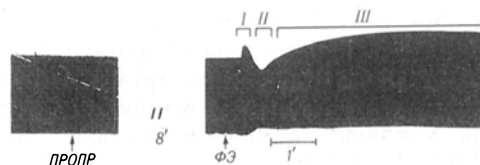


Рис. 1. Инотропный ответ изолированного сердца на стимуляцию селективным α_1 -агонистом фенилэфрином.

Механограмма отражает силу сокращений изолированного сердца. Преднаркотическая перфузия 0,3 мкМ пропранололом (ПРОПР) в течение 10 мин, стимуляция 10 мкМ фенилэфрином (ФЭ). Стрелкой показан момент введения препарата; I, II, III — фазы инотропного ответа.

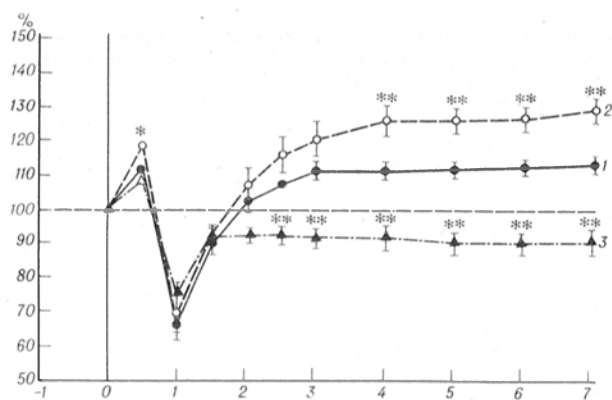


Рис. 2. Инотропный ответ изолированных сердец на стимуляцию фенилэфрином при адаптации к кратковременным стрессорным воздействиям.

По оси абсцисс — время после момента введения фенилэфрина в перфузат, мин; по оси ординат — сила сокращения сердца, % по отношению к исходной. 1 — контроль; 2 — адаптация к стрессу (15 дней); 3 — адаптация к стрессу (30 дней). * — различия с контролем достоверны при $p < 0,05$; ** — различия с контролем достоверны при $p < 0,01$.

чего использовали аппарат искусственного дыхания «Вита-1». Затем производили торакотомию и обнажали сердце. Сократительную функцию сердца оценивали по величине давления, которое регистрировали в полости левого желудочка с помощью электроманометрического датчика EMT-746 («Siemens-Elema», Швеция). Запись кривой давления производили на приборе «Mingograf-34» («Siemens-Elema», Швеция). Оценивали следующие показатели: частоту сердечных сокращений, максимальное систолическое, конечное диастолическое и развиваемое давление (в миллиметрах ртутного столба), максимальную скорость сокращения и расслабления сердца, оцениваемую по скорости нарастания и падения давления в левом желудочке (в миллиметрах ртутного столба в 1 с), интенсивность функционирования структур (ИФС) по формуле:

$$\text{ИФС} = \frac{\text{ЧСС} \times P_{\text{разв}}}{M},$$

где ЧСС — частота сердечных сокращений; $P_{\text{разв}}$ — развиваемое давление ($P_{\text{разв}} = P_{\text{сис}} - P_{\text{диаст}}$), M — масса левого желудочка (в мг).

Сократительную функцию сердца изучали в условиях относительного физиологического покоя в течение 4 мин аноксии после выключения искусственного дыхания и 5 мин последующей реоксигенации после возобновления дыхания.

Оценка резистентности изолированного сердца к реперфузионному парадоксу. Тотальную ишемию на изолированных, перфузируемых по Лангендорфу сердцах крыс воспроизводили путем полного отключения перфузии на 15 мин. В опытах соблюдали условия нормотермической тотальной ишемии. Реперфузию воспроизводили путем возобновления перфузии сердца раствором Кребса — Хенселяйта, насыщенным газовой смесью 95 % O_2 и 5 % CO_2 . Электромеханические параметры сердца регистрировали до 15 мин реперфузии. Статистическую обработку результатов проводили по критерию t Стьюдента.

Результаты и обсуждение. Влияние различной длительности адаптации к стрессу на α_1 -адренореактивность изолированного сердца. Как видно на рис. 1, стимуляция α_1 -адренорецепторов изолированного перфузируемого сердца контрольных крыс проявлялась трехфазной инотропной реакцией, во всех отношениях идентичной той, которую наблюдали авторы данного метода [24].

Кривые на рис. 2 отражают результаты опытов на 15 контрольных сердцах, 10 сердцах, взятых через 15 сут после начала адаптации, и 10 сердцах — через 30 сут. В сердцах контрольных животных первоначальный кратковремен-

ный инотропный ответ, отражающий накопление ИТФ в сердечной мышце, достигал максимума через 30 с и выражался в увеличении амплитуды сокращений на 12,9 %. Отставленный положительный инотропный эффект, обусловленный ДАГ-индуцированной активацией ПК-С и накоплением внутриклеточного Ca^{2+} , достигал максимума к 3—4-й минуте и выражался в увеличении амплитуды сокращений на 26 %, которая сохранялась на таком уровне 15—20 мин.

Через 15 дней предварительной адаптации крыс к стрессу характер инотропного ответа изолированного сердца на стимуляцию фенилэфрином сохранялся, однако эти изменения были значительно более выраженными. Так, амплитуда сокращения в I фазе ответа была на 5,7 % выше, чем в контроле ($p < 0,05$), и уже с 4-й минуты после стимуляции (III фаза) положительный инотропный эффект становился значительно более выраженным, чем в контроле ($p < 0,01$). Через 30 дней адаптации ответ сердца на стимуляцию существенным образом изменялся. Это проявлялось главным образом в том, что положительная, отставленная во времени инотропная реакция на фенилэфрин не просто снижалась по сравнению с контролем ($p < 0,01$), а превращалась в отрицательную (на плато амплитуда сокращения составляла около 90 %) и была достоверно ниже исходной ($p < 0,01$).

Таким образом, на 15-е сутки адаптации наблюдалось значительное увеличение транзиторного, ИТФ-индуцированного и длительного, ДАГ-индуцированного ответов сердечной мышцы на α_1 -агонист. В дальнейшем, при 30-дневной адаптации, эти явления исчезли и, более того, ДАГ-индуцированный ответ из положительного ответа превратился в отрицательный.

Влияние различной длительности адаптации к стрессу на количество и аффинность α_1 -адренорецепторов и активность ФЛ-С в плазматических мембранах миокарда. В системе α_1 -адренорецепторов под влиянием адаптации к повторным стрессорным воздействиям произошел значительный сдвиг — развилось явление десенситизации (рис. 3). Десенситизация α_1 -адренорецепторов выражалась в одновременном уменьшении количества рецепторов на 25 % и увеличении их КД, т. е. снижении их аффинности как на 15-й, так и на 30-й день адаптации.

Таким образом, уже к 15-му дню адаптации к кратковременному стрессу в сердце крыс развивается явление α_1 -десенситизации, которое к концу курса адаптации становится еще более выраженным.

Кривые на рис. 4 отражают зависимость ФЛ-С от концентрации Ca^{2+} в инкубационной среде и

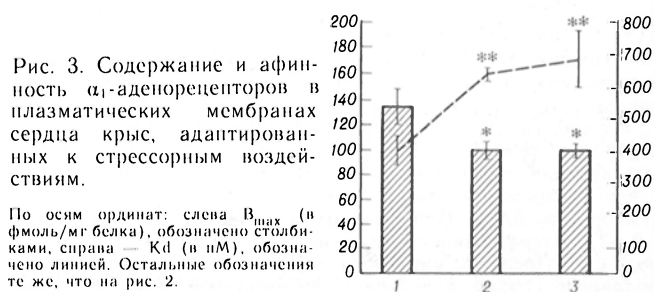


Рис. 3. Содержание и аффинность α_1 -адренорецепторов в плазматических мембранах сердца крыс, адаптированных к стрессорным воздействиям.

По осям ординат: слева B_{max} (нмоль/мг белка), обозначено столбиками, справа — Кд (нМ), обозначено линией. Остальные обозначения те же, что на рис. 2.

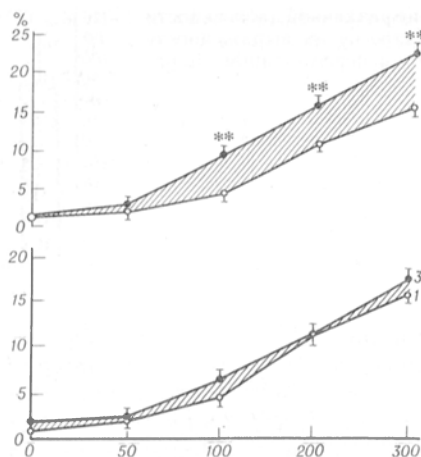


Рис. 4. Активность ФЛ-С в плазматических мембранах сердца крыс, адаптированных к стрессу.

По оси абсцисс — содержание CaCl_2 в инкубационной среде (в мкМ) при 200 мкМ ЭГТА; по оси ординат — активность ФЛ-С, % гидролизованного за 5 мин ^3H -ФИФ $_2$ на 50 мг белка. Остальные обозначения те же, что на рис. 2.

позволяют сравнить эту зависимость на обоих сроках адаптации. Видно, что в плазматических мембранах сердца контрольных животных ФЛ-С проявляет выраженную концентрационную зависимость от Ca^{2+} . Так, при концентрации в среде CaCl_2 100^3 мкМ активность ФЛ-С возрастала более чем в 4 раза по сравнению с таковой без добавления экзогенного кальция, а при концентрации 200 мкМ и более активность увеличивалась более чем на порядок. В мембранах сердца животных, адаптированных к кратковременным стрессорным воздействиям в течение 15 дней, форма этой зависимости сохранялась, однако по мере увеличения концентрации Ca^{2+} в среде активность ФЛ-С растет быстрее, чем в контроле. Так, при концентрации CaCl_2 100 мкМ активность ФЛ-С у адаптированных животных была в 2 раза выше, чем в контроле ($p < 0,01$). Поскольку в условиях нашего эксперимента данная концентрация Ca^{2+} близка к физиологической [11], данный факт представляется существенным. При дальнейшем увеличении концентрации Ca^{2+} активность ФЛ-С продолжала расти быстрее, чем в контроле. Через 30 дней после начала адаптации активность ФЛ-С также нарастала по мере увеличения концентрации Ca^{2+} , но не отличалась от контроля.

Таким образом, через 15 дней после начала адаптации Ca^{2+} -зависимая активность ФЛ-С — ключевого звена ИТФ — ДАГ регуляторного каскада — оказалась существенно повышенной, несмотря на десенситизацию α_1 -адренорецепторов сердца, а к 30-м суткам Ca^{2+} -зависимая активность этого фермента не отличалась от контроля.

Влияние различной длительности адаптации к стрессу на сократительную функцию сердца и его резистентность к острой аноксии в условиях целого организма. Кривые на рис. 5 отражают результаты опытов на 12 контрольных животных, 11 животных через 15 сут после начала адаптации и 8 — через 30 сут. Эксперименты *in situ* показали, что в условиях относительного физиологического покоя большинство показателей сократительной функции сердца в контроле и на 15-й день адаптации существенно не различалось. Однако на 30-й день адаптации к стрессу наблю-

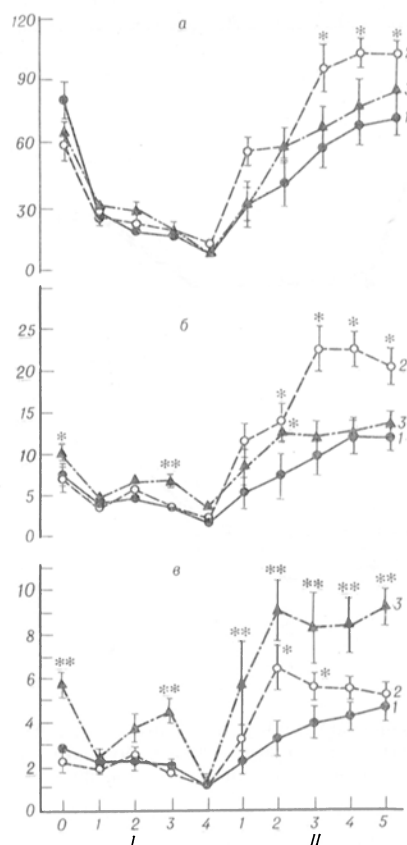


Рис. 5. Влияние различной длительности адаптации к стрессу на сократительную функцию сердца и его резистентность к острой аноксии (I) и последующей реоксигенации (II) в условиях целого организма.

По оси абсцисс — время, мин; по оси ординат: а — ИФС, мм рт. ст/мин·мг; б — скорость сокращения сердца, тыс. мм рт. ст/с, в — скорость расслабления сердца, тыс. мм рт. ст/с. Остальные обозначения те же, что на рис. 2.

далось увеличение скорости расслабления миокарда (рис. 5, в) более чем в 2 раза ($p < 0,01$) и скорости сокращения (рис. 5, б) на 35 % ($p < 0,05$) по сравнению с величиной этого показателя у контрольных животных.

Острая аноксия вызывала депрессию основных параметров сократительной функции сердца в контроле на 15-й день адаптации примерно до одинакового уровня. На 30-й день адаптации после выраженной депрессии сократительной функции сердца, наблюдавшейся на первой минуте аноксии, возникало существенное возрастание скорости сокращения и скорости расслабления миокарда. В результате величина этих показателей на 3-й минуте аноксии была соответственно в 2 и 2,3 раза выше, чем в контроле.

Далее кривые на рис. 5 показывают, что адаптация существенно увеличивала скорость и степень восстановления сократительной функции в процессе реоксигенации. Действительно, скорость сокращения, скорость расслабления и ИФС у адаптированных животных на 15-й день адаптации восстанавливались быстрее, чем в контроле, и по всем этим показателям эффект супервосстановления выражен достоверно больше, чем в контроле. Максимальная скорость сокращения на 15-й день адаптации к стрессу превысила исходную более чем в 3 раза против 81 % в контроле, скорость расслабления — на 189 % против 39 % в контроле, и, наконец, максимальная величина

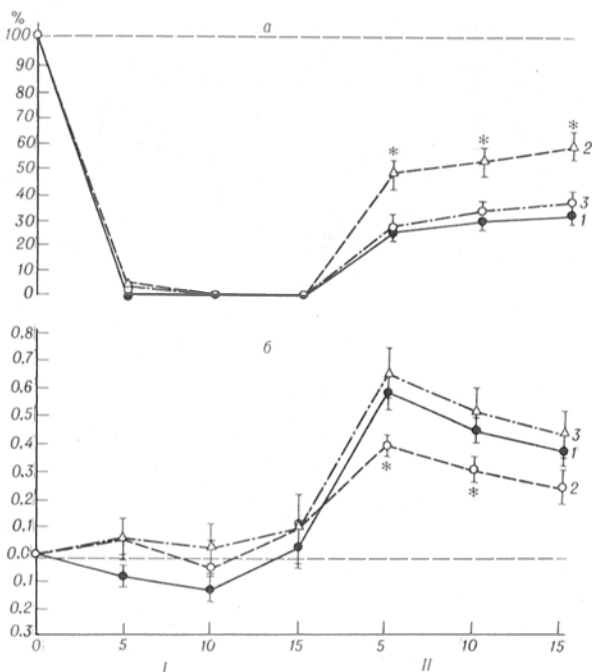


Рис. 6. Влияние различной длительности адаптации к стрессу на резистентность сократительной функции изолированного сердца к тотальной ишемии (I) и реперфузии (II).

По оси абсцисс — время (в мин); по оси ординат: а — амплитуда сокращений сердца (в % от исходной); б — контрактура сердца (в мм анисобазального укорочения). 1 — контроль; 2 — адаптация к стрессу (15 дней); 3 — адаптация к стрессу (30 дней). * — различия с контролем достоверны при $p < 0,05$.

ИФС была увеличена на 73 % при полном отсутствии эффекта супервосстановления в контроле. На 30-й день адаптации при реоксигенации наблюдалось значительно более быстрое восстановление скорости расслабления миокарда, которая уже на 2-й минуте, превышала исходную величину на 58 % и была в 2,8 раза выше, чем у контрольных животных. Скорость сокращения также восстанавливалась быстрее и на 2-й минуте реоксигенации превышала величину этого показателя в контроле на 68 % ($p < 0,05$). Восстановление других показателей сократительной функции сердца у животных этой группы не отличалось от контроля.

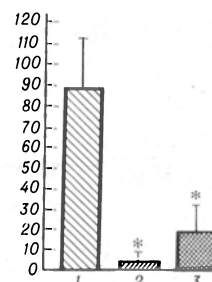
Таким образом, адаптация к кратковременным стрессорным воздействиям существенно активизирует процесс восстановления сократительной функции сердца при реоксигенации после острой аноксии. Это наиболее ярко проявляется на 15-й день адаптации к стрессу и в несколько меньшей степени — на 30-й день. Существенно, что длительная адаптация, продолжавшаяся 30 сут, наиболее резко увеличивает скорость расслабления миокарда в покое, при острой аноксии и реоксигенации.

Влияние различной длительности адаптации к стрессу на резистентность изолированного сердца к реперфузионному парадоксу. Данные, представленные на рис. 6 и 7, отражают влияние адаптации к стрессу на резистентность изолированных сердец животных к реперфузионному парадоксу. При этом в опытах были использованы 18 сердец контрольных животных, 12 — на 15-й день адаптации и 8 сердец животных, адаптировавшихся в течение 30 сут.

Кривые на рис. 6 показывают, что при репер-

Рис. 7. Влияние различной длительности адаптации к стрессу на выраженность аритмий при реперфузионном парадоксе.

По оси ординат — длительность тяжелых форм аритмий, с. Остальные обозначения те же, что на рис. 2.



фузионном парадоксе в период реперфузии амплитуда сокращения (рис. 6, а) уменьшалась пропорционально величине контрактуры (рис. 6, б). Предварительная адаптация к стрессу, длившаяся 15 дней, обладала выраженным антиконтрактурным эффектом и соответственно обеспечивала гораздо более высокий уровень, чем в контроле, амплитуды сокращения на этапе реперфузии. После 30 сут адаптации антиконтрактурный ее эффект и способность сохранения высокой амплитуды сокращения оказались утраченными.

При изучении влияния адаптации различной длительности на выраженность аритмий при реперфузионном парадоксе выяснилось, что в сердцах контрольных животных при реперфузии возникновение фибрилляции желудочков и желудочковой тахикардии наблюдалось в 86 % случаев, тогда как на 15-й день адаптации такие виды аритмий отмечались только в 25 %, а на 30-й день — в 50 % случаев. На рис. 7 показано, что существенные различия наблюдались также и в длительности возникающих тяжелых аритмий. Так, если в контрольных сердцах суммарная длительность фибрилляции желудочков и желудочковой тахикардии за 15 мин реперфузии составляла в среднем 89,5 с, то на 15-й день адаптации эта величина составляла всего лишь 2,4 с ($p < 0,01$), а на 30-й день она несколько увеличивалась и была равна 36,6 с ($p < 0,05$).

Таким образом, антиконтрактурный и антиаритмический эффект адаптации, являющийся важным проявлением ФАСС, ярко выражен на 15-е сутки адаптационного процесса. К 30-му дню адаптационного процесса антиконтрактурный эффект исчезает, а антиаритмический эффект несколько снижается, но остается выраженным.

Три факта, установленные в этой работе при адаптации к повторным стрессорным воздействиям, могут свидетельствовать в пользу предположения о том, что ИТФ — ДАГ контур регуляции действительно играет роль в механизме формирования ФАСС. На 15-е сутки адаптации наблюдается активация ФЛ-С — ключевого звена ИТФ — ДАГ регуляторного каскада. Это неизбежно должно приводить к увеличению образования ИТФ и ДАГ в клетке. Увеличение ИТФ-индуцированного и ДАГ-индуцированного инотропных ответов при стимуляции фенилэфрином также свидетельствует в пользу увеличения образования ИТФ и ДАГ. Оба отмеченных выше явления — увеличение активности ФЛ-С и повышение инотропных эффектов — сопровождается на 15-е сутки адаптации увеличением резистентности сердца к реперфузионному парадоксу, т. е. хорошо известным компонентом ФАСС. Исчезновение к 30-м суткам адаптации активации ФЛ-С и увеличенных ответов на фенилэфрин сопровожда-

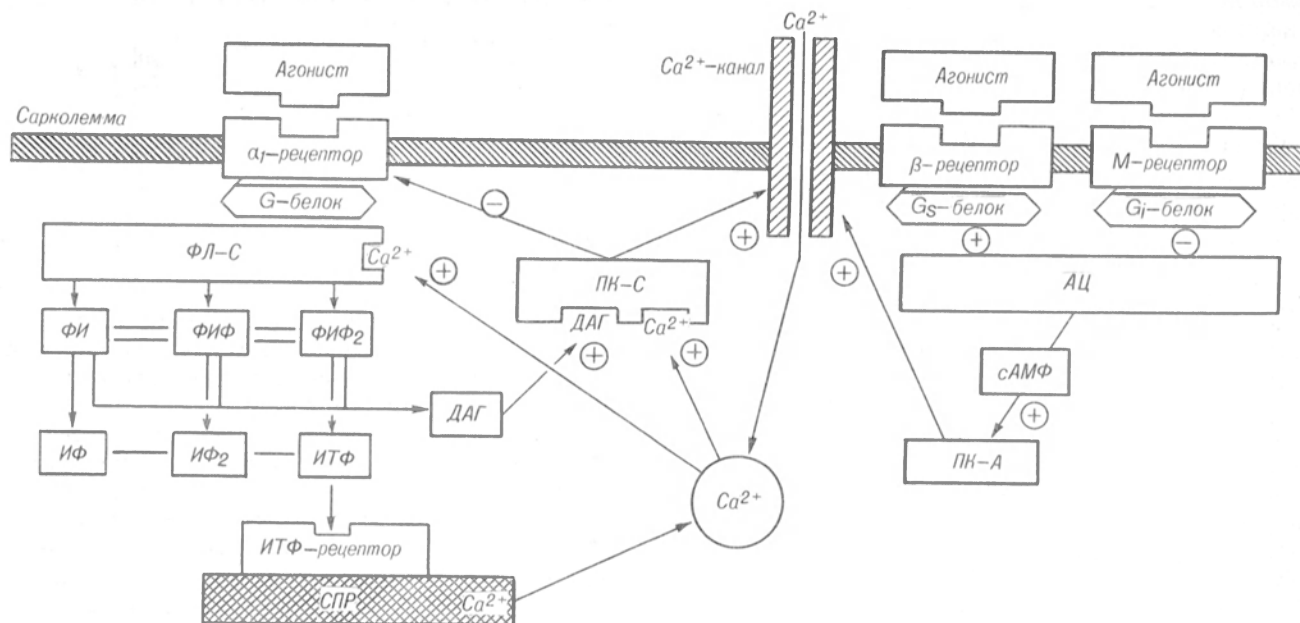


Схема.

ФИФ₂ — фосфатидилинозитолдифосфат, ФИФ — фосфатидилинозитолмонофосфат, ФИ — фосфатидилинозитол, ИФ₂ — инозитолдифосфат, ИФ — инозитолфосфат, ПК-А — сАМФ-зависимая протеинкиназа.

ется исчезновением или уменьшением этого компонента ФАСС.

Представление о роли активации ИТФ — ДАГ регуляторного каскада в механизме развития ФАСС состоит в том, что увеличенное количество ДАГ через активацию ПК-С приводит к активации генов [23]. Действительно, показано, что по такому механизму может происходить активация транскрипции генов, детерминирующих HSP [22]. HSP в свою очередь могут диспергировать аномальные белок-белковые взаимодействия и таким образом обеспечивать ренатурацию поврежденных белков [8]. HSP могут также связывать кальмодулин [28] и ограничивать Ca^{2+} -кальмодулинзависимые процессы протеолиза и фосфолиполиза, а в конечном счете играть роль в стабилизации структур.

В целом приведенные данные соответствуют ранее высказанной гипотезе о том, что ИТФ — ДАГ регуляторный каскад является одним из звеньев механизма ФАСС и вместе с тем позволяют сосредоточить внимание на некоторых открытых вопросах проблемы.

Первый из таких вопросов заключается в том, каким образом на 15-е сутки адаптации к стрессорным воздействиям на фоне выраженной α_1 -десенситизации миокарда развивается активация ФЛ-С, активность которой через G-белки индуцируется раздражением α_1 -рецепторов. Этот парадоксальный на первый взгляд факт целесообразно оценить на основе представления о механизме функционирования ИТФ — ДАГ регуляторного каскада, который представлен на схеме. На ней показано, что после того как ИТФ — ДАГ регуляторный каскад активирован через α_1 -рецепторы, ДАГ активирует ПК-С в свою очередь фосфорилирует многие клеточные белки, и в частности белки α_1 -адренорецепторов. Такое фосфорилирование, по данным [9, 14], может приводить к десенситизации α_1 -рецепторов. Вероятная последовательность событий может сводиться к тому, что вна-

чале катехоламины эффективно действуют на α_1 -рецепторы и активируют ИТФ — ДАГ контур регуляции. В дальнейшем, когда система активирована, избыток ДАГ через ПК-С обеспечивает десенситизацию этих рецепторов, которую мы наблюдали как на 15-е, так и на 30-е сутки адаптации. Если это объяснение справедливо, то требует ответа вопрос, почему на фоне α_1 -десенситизации на 15-е сутки сохранялась высокая активность ФЛ-С и значительное увеличение инотропных ответов на α_1 -агонист. Представленная схема позволяет думать, что при адаптации к стрессу и десенситизации α_1 -рецепторов ФЛ-С может быть активирована избытком Ca^{2+} . Этот избыток возникает в данных условиях по меньшей мере за счет трех представленных на схеме факторов: избыток ИТФ, образующийся в результате активации ИТФ — ДАГ регуляторного каскада, вызывает увеличение выхода Ca^{2+} из СПР [10]; ПК-С, активированная избытком ДАГ, фосфолирует транссарколеммальные белки Ca^{2+} -каналов и таким образом увеличивает входение Ca^{2+} в клетку; на 15-е сутки, как показано ранее [2], закономерно наблюдается увеличение количества β -рецепторов в сарколемме и ответа аденيلاتциклазы (АЦ) на стимуляцию изонотеренолом. Активация АЦ, как известно, в свою очередь активирует медленные Ca^{2+} -каналы [27]. Поскольку ФЛ-С является Ca^{2+} -зависимым ферментом [26], то избыток Ca^{2+} , возникающий при действии этих трех факторов, может оказаться достаточным для стационарной активации ФЛ-С и ИТФ — ДАГ регуляторного каскада.

Таким образом, на определенном этапе адаптации действие внешних гормональных и медиаторных стимулов, активирующих фосфоинозитидный обмен в кардиомиоцитах, оказывается ограниченным из-за развившейся десенситизации, а сам фосфоинозитидный обмен, тем не менее стационарно активирован внутриклеточным механизмом, в котором важную роль играет избыток Ca^{2+} .

Второй вопрос состоит в том, каким образом активация ИТФ — ДАГ регуляторного каскада при адаптации к стрессу может привести к увеличению образования HSP-70. При обсуждении этого вопроса необходимо отметить, что наряду с гидролизом ФИФ_2 Ca^{2+} -активируемая ФЛ-С может расщеплять также ФИФ и ФИ (см. схему), то такая активация приводит к образованию значительно большего количества ДАГ, чем ИТФ [11]. Преимущественное накопление ДАГ происходит также потому, что ДАГ образуется не только при расщеплении инозитолфосфолипидов, но и при расщеплении фосфатидилхолина и, возможно, других фосфолипидов. В итоге накопление ДАГ в клетке оказывается по меньшей мере на один порядок выше, чем образование ИТФ. Значение этого обстоятельства весьма велико, так как ДАГ, активируя ПК-С и синтез белков в клетке, выступает как медиатор долговременной, структурно обеспеченной адаптации, а в нашем конкретном случае как вероятный медиатор накопления HSP и формирования ФАСС. Действительно, многократное накопление HSP и становление всех компонентов ФАСС наиболее ярко выражены именно через 2 нед после начала адаптации к коротким стрессорным воздействиям [20].

Представленные выше данные делают необходимым обсуждение еще одного вопроса, а именно вопроса о причинах, которые к 30-м суткам адаптации приводят к устранению активации ФЛ-С, повышенных инотропных ответов на фенилэфрин и такого важного компонента ФАСС, как повышение резистентности сердца к реперфузионному парадоксу. В соответствии со схемой, наиболее вероятным фактором, который одновременно может отключить Ca^{2+} -активацию ФЛ-С, устранить тем самым активацию ИТФ — ДАГ каскада регуляции и превратить отставленный во времени положительный инотропный эффект α -агониста в отрицательный, является ограничение внутриклеточной концентрации Ca^{2+} при длительной адаптации к повторным стрессорным воздействиям. Это ограничение может быть обеспечено по меньшей мере тремя механизмами. Во-первых, постепенно может развиваться адаптационное увеличение эффективности Ca^{2+} -насосов СПР и сарколеммы, удаляющих Ca^{2+} из саркоплазмы. В пользу такой возможности свидетельствуют прямые данные [21] о том, что элементы СПР, изолированные из миокарда адаптированных животных, обладают повышенной способностью захватывать Ca^{2+} , а также результаты приведенных выше опытов (см. рис. 5), свидетельствующих, что на 30-е сутки скорость расслабления миокарда резко увеличена в покое, при острой аноксии и при реоксигенации. Во-вторых, в процессе адаптации, как показано ранее [2], происходит уменьшение количества медленных Ca^{2+} -каналов, что может ограничивать входение Ca^{2+} в кардиомиоциты. В-третьих, на 30-е сутки адаптации к повторным стрессорным воздействиям было обнаружено увеличение количества мускариновых рецепторов [2], при раздражении которых через G-белок тормозится активность АЦ [12]. Действительно, на этом этапе адаптации базальная активность АЦ и ее активация изопротеренолом снижены по сравнению с величиной этого эффекта на 15-е сутки адаптационного процесса. Понят-

но, что такое изменение активности АЦ может играть свою роль в ограничении входа Ca^{2+} в клетку. Весьма существенно, что такое отключение активации ИТФ — ДАГ регуляторного контура сопровождается исчезновением резистентности к реперфузионному парадоксу. Однако вопрос о том, исчезают ли при этом накоплении HSP и другие компоненты ФАСС, требует дальнейшего исследования.

В плане нашего изложения важно подчеркнуть, что процесс адаптации к многократному или длительному действию стрессорной ситуации позволяет проследить смену регуляторных механизмов, обеспечивающих защиту сердца. Действительно, при изучении адаптации к непрерывному умеренному стрессу было установлено, что на 5-й день процесса у животных резко возрастает тонус блуждающего нерва и этот сдвиг нервной регуляции сердца играет важную роль в предупреждении ишемических и реперфузионных аритмий [3]. В дальнейшем повышенный тонус блуждающего нерва исчезает, но резистентность сердца к ишемическим и реперфузионным повреждениям сохраняется не только в условиях целого организма, но и при изоляции органа. Оно обеспечивается развитием ФАСС и достигает максимума к 15-м суткам адаптации [1]. Именно в это время в наших экспериментах наблюдалась высокая устойчивость к реперфузионному парадоксу, а в других исследованиях — накопление HSP в цитоплазме и ядрах кардиомиоцитов, повышение резистентности ядер и структур СПР к аутолизу [4]. На более позднем этапе адаптации к стрессорным воздействиям, как показано выше, активация ИТФ — ДАГ регуляторного контура исчезает и обнаруживается тенденция к редукции ФАСС. Это, по-видимому, происходит за счет увеличения функционирования Ca^{2+} -насосов, которые не только увеличивают скорость расслабления, но и отключают Ca^{2+} -активацию ФЛ-С и активацию фосфоинозитидного цикла. Существенно, что механизмы, действующие на этапе редукции ФАСС, как показали наши опыты в условиях целого организма, значительно увеличивают резистентность сердца к острой аноксии и последующей реоксигенации (см. рис. 5). Изучение этих механизмов весьма важно, так как процесс долговременной адаптации эволюционно детерминирован отнюдь не на защиту изолированных органов, а на защиту органов, функционирующих в условиях целого организма.

В рамках данного сообщения целесообразно ограничиться заключением, что полученные данные согласуются с представлением о важной роли ИТФ — ДАГ регуляторного каскада в формировании ФАСС.

Авторы признательны за финансовую поддержку этой работы Оренбургскому НПО «Оптимизм».

ЛИТЕРАТУРА

1. Меерсон Ф. З. // Кардиология. — 1990. — № 3. — С. 6—12.
2. Меерсон Ф. З., Копылов Ю. П., Балденков Г. Н. // Физиол. журн. — 1991. — Т. 37, № 1. — С. 3—6.
3. Меерсон Ф. З., Кузнецов В. И. // Бюл. exper. биол. — 1990. — № 5. — С. 423—425.
4. Меерсон Ф. З., Малышев И. Ю., Варфоломеева Е. Ю. и др. // Там же. — 1991. — № 5. — С. 460—462.

5. Меерсон Ф. З., Малышев И. Ю. // Докл. АН СССР.— 1990.— Т. 313, № 3.— С. 750—752.
6. Ткачук В. А., Балденков Г. И. // Биохимия.— 1978.— Т. 43, № 6.— С. 1097—1110.
7. Bocckino S. B., Blackmore P. F., Exton J. H. // J. biol. Chem.— 1985.— Vol. 260.— P. 14201—14207.
8. Contard F., Samuel J. L., Mariotte F., Rappoport I. // J. molec. Cell. Cardiol.— 1989.— Vol. 21, Suppl. 3.— P. 5.
9. Corvera S., Schwartz K. R., Gracham R. M., Garcia-Sainz J. A. // J. biol. Chem.— 1986.— Vol. 261.— P. 520—526.
10. Dawson A. P., Irvine R. F. // Biochem. biophys. Res. Commun.— 1984.— Vol. 120.— P. 858—854.
11. Exton J. H. // Rev. Physiol. Biochem. Pharmacol.— 1988.— Vol. 111.— P. 117—223.
12. Hescheler J., Kameyama M., Trautwein W. // Pflügers Arch.— 1986.— Bd 407.— S. 182—189.
13. Ganong B. R., Loomis C. R., Hannun Y. A., Bell R. M. // Proc. nat. Acad. Sci. USA.— 1986.— Vol. 83.— P. 1184—1188.
14. Garcia-Sainz J. A., Hernandez-Sotomayor S. T. M. // Europ. J. Biochem.— 1987.— Vol. 163.— P. 147—421.
15. Lynch C. J., Charest R., Blackmore P. F., Exton J. H. // J. biol. Chem.— 1985.— Vol. 260, N 3.— P. 1593—1600.
16. Lynch C. J., Charest R., Bocckino S. B. et al. // Ibid.— P. 2844—2851.
17. Meerson F. Z. // J. appl. Cardiol.— 1990.— Vol. 5.— P. 389—403.
18. Meerson F. Z., Adaptive Protection of the Heart: Protecting Against Stress and Ischemic Damage.— Boca Raton, 1991.
19. Meerson F. Z., Malyshev I. Yu., Sazonova T. G. // Basic Res. Cardiol.— 1990.— Vol. 85.— P. 96—103.
20. Meerson F. Z., Malyshev I. Yu., Zamotrinsky A. V. // Ibid.— 1991.— Vol. 86.— P. 87—96.
21. Meerson F. Z., Sazonova T. G., Arkhipenko Yu. V. // Biomed. Sci.— 1990.— Vol. 1.— P. 373—378.
22. Moalic J. M., Baulers C., Himbert D. et al. // J. Hypertens.— 1989.— Vol. 7, N 3.— P. 195—201.
23. Nishizuka Y. // Nature.— 1984.— Vol. 308.— P. 693—698.
24. Otani H., Otani H., Das D. K. // Circulat. Res.— 1988.— Vol. 62.— P. 8—17.
25. Peterson G. L. // Analyt. Biochem.— 1977.— Vol. 83, N 2.— P. 346—356.
26. Renard D., Poggioli J. // J. molec. cell. Cardiol.— 1990.— Vol. 22.— P. 13—22.
27. Rosenthal W., Schultz G. // Trends pharmacol. Sci.— 1987.— Vol. 8.— P. 351—354.
28. Stevenson M. A., Calderwood S. K. // Molec. Cell. Biol.— 1990.— Vol. 10.— P. 1234.

Поступила 21.11.91

ROLE OF THE INOSITOL PHOSPHATE CYCLE IN THE CARDIOPROTECTIVE EFFECT OF ADAPTATION TO REPEATED STRESSOR ACTIONS

F. Z. Meerson, Yu. N. Kopylov

Institute of General Pathology and Pathophysiology, Academy of Medical Sciences of the Russian Federation, Moscow.

As shown by previous studies, adaptation to short-term stress exposure developed the phenomenon of adaptive stabilization of structures (PhASS), including such as elevation in resistance to impairing effects of isolated animal hearts and the heart nuclear fraction of elements of the sarcoplasmic reticulum. Studies of the role of inositol phosphate regulatory cycle in the development of the ASS phenomenon showed that the inositol triphosphate-diacyl glycerol (ITP-DAG) step of regulation was activated at the peak of PhASS development within 15 days after the adaptation onset. The activation observed was accompanied by enhanced activity of phospholipase C as well as by positive inotropic responses of heart tissue to phenylephrine stimulation, which was determined by ITP and DAG accumulation. Within 30 days the inositol phosphate cycle activation was decreased with simultaneous reduction of PhASS. The data obtained suggest that the ITP-DAG step of regulation involved in development of PhASS is of importance in DAG-dependent activation of protein kinase C and in accumulation of heat-shock proteins which are responsible for structures stabilization.

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 1993

УДК 616.438-008.931-02:615.225.2]-07

Г. А. Суханова, Г. В. Потапова, С. А. Нарбутович

АКТИВНОСТЬ 5'-НУКЛЕОТИДАЗЫ ТИМУСА И ОПУХОЛИ ПРИ ВВЕДЕНИИ БРАДИКИНИНА МЫШАМ-ОПУХОЛЕНОСИТЕЛЯМ

Томский медицинский институт

5'-Нуклеотидаза (КФ 3.1.3.5; 5'-рибонуклеотид-фосфогидролаза) является липидзависимым ферментом плазматической мембраны клеток; его каталитическая активность заключается в гидролизе внеклеточного АМФ с образованием внутриклеточного аденозина. Особое значение 5'-нуклеотидазы связано с угнетением пуринового метаболизма при иммунодефицитных состояниях. Недостаточность 5'-нуклеотидазы тимуса и других лимфоидных органов сопровождается значительным снижением содержания аденозина, вызывает нарушение функций Т- и В-лимфоцитов. В растущих эмбриональных и опухолевых тканях активность мембранно-связанной 5'-нуклеотидазы понижена [1, 4].

Брадикинин, известный вазоактивный пептид, способен стимулировать деление клеток тимуса, тормозит перекисное окисление липидов мембран тимоцитов [2, 3, 5]. Влияние брадикинина на состояние опухолевых клеток не исследовано. Предполагалось, что активность 5'-нуклеотидазы как один из чувствительных биохимических тестов позволит оценить пролиферативную реакцию лимфоидных и опухолевых клеток на брадикинин.

С учетом вышеизложенного цель настоящей работы заключалась в изучении активности 5'-нуклеотидазы клеток тимуса и опухоли при введении брадикинина мышам в процессе развития аллогенной и сингенной трансплантируемых опухолей. Эффекты стимуляторов пролиферации в этих условиях могут быть различными.

Методика. В опытах использовали мышей линии BALB/с и беспородных мышей массой 18—22 г. Мышам линии BALB/с перевивали сингенную по H-2D комплекс гистосовместимости мастоцитому Р-815, а беспородным мышам — аллогенную саркому Крокера подкожно ($2-5 \cdot 10^6$ клеток). Через 7 сут после перевивки опухоли мышам обеих групп однократно внутривенно вводили брадикинин-триацетат («Реанал», Венгрия) в дозе 1 мг/кг, способствующей делению тимоцитов [2]. Контрольным животным вводили физиологический раствор. Через 2, 4, 6 ч, 1, 3, 7 сут после введения брадикинина определяли активность 5'-нуклеотидазы клеток опухоли и тимуса. На 14-е сутки после перевивки опухоли (7-е сутки после введения брадикинина) подсчитывали число клеток опухолевого узла.

Активность 5'-нуклеотидазы определяли по образованию неорганического фосфата (Φ_n) в результате гидролиза 5'-АМФ [6]. В инкубационную среду, содержащую 0,5 мл 50 мМ

Таблица 1

Активность 5'-нуклеотидазы (в мкмоль Φ_n /мин/мг) тимуса мышей при введении брадикинина

Группа животных	Контроль	6 ч	1 сут
Беспородные (10)	2,31±0,25	5,62±0,40 <0,05	2,25±0,32 >0,05
Р			
Линии BALB/с (7)	3,47±0,33	8,23±0,52 <0,05	2,74±0,21 >0,05

Примечание. Здесь и в табл. 2 в скобках — число опытов.

Таблица 2

Число клеток опухолевого узла (в млн) при введении брадикинина на стадии сформировавшейся опухоли

Условия опыта	Саркома Крокера	Мастоцитомы Р-815
Контроль (20)	102±9	82±6
Брадикинин (30)	74±10	155±15
<i>p</i>	<0,05	<0,05

трис-НСI-буфера рН 7,4, 0,2 мл 10 мМ раствора $MgCl_2$, 0,2 мл 5 мМ раствора 5'-АМФ, добавляли 0,2 мл суспензии клеток тимуса или опухоли, содержащей $2 \cdot 10^6$ клеток. Пробы инкубировали 30 мин при 37 °С, добавляли 2,5 мл 10 % раствора ТХУ, центрифугировали при 6000 об/мин. В надосадочной жидкости определяли Φ_n по реакции с 2,5 % молибденовым реактивом в присутствии 1 % раствора аскорбиновой кислоты. Активность фермента выражали в микромолях Φ_n в 1 мин на 1 мг белка.

Достоверность различий оценивали с использованием критериев Стьюдента и Вилкинсона — Манна — Уитни.

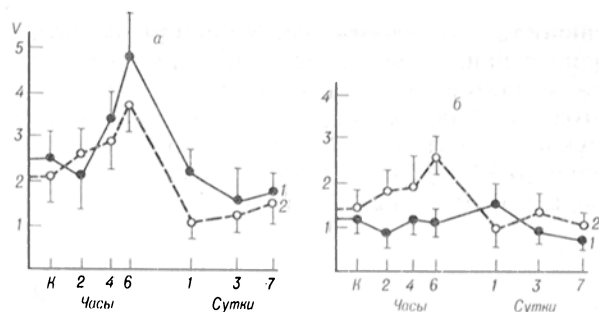
Результаты и обсуждение. При введении брадикинина интактным мышам наблюдали значительное увеличение активности 5'-нуклеотидазы клеток тимуса. Максимальные значения отмечены через 6 ч, когда активность 5'-нуклеотидазы возрастала в 2,8 раза у мышей линии BALB/c и в 2,4 раза у беспородных. Через 1 сут влияние брадикинина на активность 5'-нуклеотидазы не обнаруживали (табл. 1).

Увеличение активности 5'-нуклеотидазы, маркерного фермента мембраны тимоцитов, происходило в те же временные интервалы, что и стимуляция митотической активности тимуса [2].

Влияние брадикинина на рост аллогенной и сингенной опухолей было различным (табл. 2). При введении брадикинина нелинейным мышам с саркомой Крокера наблюдали снижение числа опухолевых клеток на 37 %. У мышей линии BALB/c брадикинин стимулировал рост мастоцитомы Р-815. Число клеток в этом случае увеличивалось в 2 раза. Эти особенности действия брадикинина, вероятно, обусловлены усилением иммунных реакций нелинейных мышей или стимуляцией канцерогенеза в результате неполного иммунного ответа сингенных реципиентов.

У мышей-опухоленосителей на стадии сформировавшейся опухоли (через 7 сут после перевивки) активность 5'-нуклеотидазы клеток опухолей Крокера и Р-815 составляла соответственно $1,38 \pm 0,15$ и $1,26 \pm 0,16$ мкмоль Φ_n /мин/мг. В клетках тимуса беспородных мышей активность 5'-нуклеотидазы была равна $2,12 \pm 0,27$ мкмоль Φ_n /мин/мг, а у мышей линии BALB/c — $2,52 \pm 0,31$ мкмоль Φ_n /мин/мг. Через 14 сут после трансплантации опухоли активность 5'-нуклеотидазы тимоцитов и опухолевых клеток как в аллогенной, так и в сингенной системе была на 26—34 % ниже, чем на стадии сформировавшейся опухоли. Следовательно, в процессе развития опухолей в организме наблюдали угнетение активности 5'-нуклеотидазы тимуса, особенно у мышей линии BALB/c.

Брадикинин, введенный в дозе 1 мг/кг на фоне сформировавшейся опухоли, стимулировал активность 5'-нуклеотидазы тимоцитов аллогенных и сингенных реципиентов с максимумом через 6 ч после введения препарата (см. рисунок). Активность 5'-нуклеотидазы тимуса мышей-опухоленосителей увеличивалась в 2 и 2,2 раза соответ-



Активность 5'-нуклеотидазы (в мкмоль Φ_n /мин/мг белка) тимуса (а) и опухолевых клеток (б) при введении брадикинина мышам-опухоленосителям.

1 — мыши линии BALB/c с опухолью Р-815; 2 — беспородные мыши с опухолью Крокера. К — контроль.

ственно. В клетках саркомы Крокера и мастоцитомы Р-815 наблюдали фазные изменения активности 5'-нуклеотидазы без резкого ее увеличения. Максимальное, в 1,9 раза, повышение активности 5'-нуклеотидазы клеток саркомы Крокера у нелинейных мышей было отмечено через 6 ч; реакцию клеток мастоцитомы Р-815 на введение брадикинина наблюдали лишь через 1 сут, и она была значительно меньше. Через 7 сут после введения брадикинина (14 сут после перевивки опухоли) активность 5'-нуклеотидазы клеток опухоли Р-815 снижалась по сравнению с контролем на 34 %, чего не наблюдали в клетках саркомы Крокера.

Эти данные свидетельствуют о более высокой чувствительности к брадикинину аллогенной опухоли. В условиях сингенной опухоли брадикинин обладал менее существенным влиянием и даже усиливал эффект торможения активности 5'-нуклеотидазы по мере развития мастоцитомы Р-815.

Известно, что опухоль обладает иммунодепрессивным свойством, вызывает деструкцию клеток коры тимуса, следствием чего, вероятно, является угнетение пуринового метаболизма и снижение активности 5'-нуклеотидазы тимоцитов. Однако в опухолевых клетках угнетение или полное отсутствие фермента характеризует степень злокачественности и способность опухолей к метастазированию [4]. В связи с этим стимулирующее влияние брадикинина на активность 5'-нуклеотидазы тимуса можно рассматривать как показатель противоопухолевой реакции.

Особое значение имеет реакция на брадикинин аллогенной и сингенной опухолей, состоящая в угнетении или стимуляции канцерогенеза. Аналогичные эффекты известны для иммуностимуляторов, в связи с чем применение их в противоопухолевой терапии имеет определенные ограничения. Характер изменений активности 5'-нуклеотидазы под влиянием брадикинина свидетельствует о том, что усиление роста сингенной опухоли сопровождается угнетением активности фермента; торможение роста аллогенной опухоли, напротив, вызывает активацию 5'-нуклеотидазы.

На основании этих данных можно сделать вывод, что брадикинин стимулирует активность 5'-нуклеотидазы тимуса мышей-опухоленосителей. Действие брадикинина на активность фермента опухолевых клеток менее выражено, особенно в сингенных условиях. Необходимо отметить, что

активность 5'-нуклеотидазы является достаточно информативным показателем состояния клеток тимуса, характеризует чувствительность опухолевых клеток к брадикинину. Изучение активности 5'-нуклеотидазы может быть использовано для оценки действия противоопухолевых препаратов в экспериментальных условиях.

ЛИТЕРАТУРА

1. Дмитренко П. П. // Успехи соврем. биол.— 1984.— Т. 97, № 1.— С. 20—35.
2. Сальник Б. Ю., Серебров В. Ю., Суханова Г. А. Тимус в системе эндокринной регуляции метаболизма.— Томск, 1987.
3. Суханова Г. А. // Вопр. мед. химии.— 1986.— № 2.— С. 21—24.
4. Уманский В. Ю., Гриневич Ю. А., Никольский И. С., Каменец Л. А. // Укр. биохим. журн.— 1982.— Т. 54, № 2.— С. 154—157.
5. Perris A. D., Whitfield J. F. // Proc. Soc. exp. Biol. (N. Y.).— 1969.— Vol. 130, N 4.— P. 188—1201.
6. Lesko D. M., Marinetti E. V. // Biochim. biophys. Acta.— 1972.— Vol. 266.— P. 511—523.

Поступила 06.06.91

ACTIVITY OF 5'-NUCLEOTIDASE IN THYMUS AND TUMORAL TISSUES AFTER ADMINISTRATION OF BRADYKININ TO TUMOR-BEARING MICE

G. A. Sukhanova, G. V. Potapova, S. A. Narbutovich

Medical Institute, Tomsk

Activity of 5'-nucleotidase was inhibited in thymus tissue of tumor-bearing mice; bradykinin (1 mg/kg body weight) increased the enzymatic activity 2.0-2.2-fold. Administration of bradykinin led to inhibition of allogenic Crocker's sarcoma growth and to stimulation of syngeneic mastocytoma P-815 growth, which was inoculated into noninbred and BALB/c mice, respectively. Hence, bradykinin activated 5'-nucleotidase in Crocker's sarcoma and did not affect the enzymatic activity in tumor P-815. This suggests that activity of 5'-nucleotidase is of importance in evaluation of the thymus tissue state as well as it demonstrates the tumoral tissue sensitivity to bradykinin.

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 1993

УДК 615.844.6.015.4:612.111].07

В. С. Демидова, А. И. Марчук, И. В. Ряполова, Г. И. Козинец, А. А. Карелин

СТИМУЛИРУЕМЫЙ ИНСУЛИНОМ СИНТЕЗ ПЛАЗМОМЕМБРАННОГО «СИГНАЛЬНОГО» АТР В ПЛАЗМАТИЧЕСКИХ МЕМБРАНАХ ЭРИТРОЦИТОВ ЧЕЛОВЕКА КАК КРИТЕРИЙ ЭФФЕКТИВНОСТИ ЛЕЧЕБНОГО ПЛАЗМАФЕРЕЗА

Институт хирургии им. А. В. Вишневского, Москва

Интоксикационный синдром является одной из основных причин гибели больных, находящихся в критическом состоянии. Хотя такие методы детоксикации организма, как парентеральное и энтеральное введение веществ, связывающих токсины, форсированный диурез, перитонеальный диализ, гемодиализ, гемосорбция, лимфосорбция, используют во всем объеме, однако по-прежнему остро стоит вопрос о дальнейшем развитии эффективных, безопасных и доступных для широкого применения методов элиминации токсинов из организма.

Принципиально новым методом удаления токсичных веществ и иммунных комплексов из организма является лечебный плазмаферез, который представляет собой новое направление в медицине — гравитационную хирургию крови. Сущность метода состоит в удалении с плазмой различных патогенных субстанций и избыточных компонентов (последние могут находиться в плазме и в нормальных условиях) с последующими трансфузиями плазмозаменяющих растворов, лечебных препаратов и корригирующих средств для восстановления нормального состава крови [11]. Эффективность лечебного плазмафереза в настоящее время оценивается совокупностью клинико-диагностических, биохимических и иммунологических показателей. Объективным критерием плазмафереза может служить уровень плазмомембранного «сигнального» АТР (псАТР), синтезирующегося в мембранном препарате эритроцитов человека под действием инсулина [5, 10].

Нами проведена работа по изучению действия инсулина на плазматические мембраны эритроцитов человека. В результате исследований удалось обнаружить, что при этом синтезируется псАТР в концентрации 10^{-9} — 10^{-8} М.

Методика. Свежевытая у доноров или больных кровь в объеме 10 мл содержала 1 мл антикоагулянта (2,7 % ЭДТА динатриевая соль). Пробирку с кровью ставили на 30 мин в термостат при 37 °С. После этого плазму удаляли, оставляли только эритроцитную массу. С самого верха эритроцитной массы отбирали и удаляли небольшой слой, содержащий элементы белой крови. Перед гемолизом полученные эритроциты дважды отмывали от белков плазмы физиологическим раствором, содержащим дополнительно 0,01 М цитрат натрия. Эритроциты осаждали центрифугированием при 2500 g в течение 20 мин при 4 °С. Из осажденных эритроцитов делали 3 мазка для микроскопического контроля. Элементы белой крови в используемой эритроцитной массе отсутствовали. Затем проводили гипотонический лизис эритроцитов, для чего 4 мл эритроцитной массы заливали 100 мл холодной дистиллированной воды, быстро переносили в гомогенизатор Даунса (стекло-стекло) с малым зазором и делали 2—3 удара поршнем. Тут же отбирали 1 мл гемолизата, помещали его в 5 мл 1,25 % раствора глутарового альдегида для электронного микроскопирования. Момент гемолиза зафиксирован на электронной микрофотографии (рис. 1, а). Видно, что основная масса гемоглобина выходит через разрыв в плазматической мембране, что согласуется с данными работы [15]. Из гомогенизатора лизат переливали обратно в пробирку и сразу же добавляли 1/4 объема 4-кратного физиологического раствора для восстановления изотоничности. Для осаждения образовавшихся при гемолизе теней мембран эритроцитов лизат центрифугировали при 6000 g в течение 20 мин при 4 °С. Для отмывания оставшегося количества гемоглобина осадки теней эритроцитов промывали 3 раза 0,001 М раствором бикарбоната натрия pH 7,4, так как показано, что нейтральная и слабощелочная среда отмывающего эритроциты раствора способствует более полному выходу гемоглобина из клеток [12]. В супернатанте определяли наличие гемоглобина на ФЭК со светофильтром с максимумом пропускания при длине волны 405 нм. После 3-й отмывки оптическая плотность равнялась 0.

Тени эритроцитов, полученные при осмотическом шоке и свободные от гемоглобина, были просмотрены в сканирующей приставке «Jeol JEMAS1 D-4» к электронному микроскопу JEM-100 C. На рис. 1, б—д представлены микрофотографии мембран эритроцитов, не содержащих гемоглобина. Видно, что при гипотоническом шоке мембрана обратимо повреждается и ее форма восстанавливается. На рис. 1, б, в представлены фотографии мембран, принявших присущую эритроцитам двояковогнутую форму. Это согласуется с данными работы [16] о том, что после осмотического лизиса образовавшиеся поры самопроизвольно закрываются и восстанавливается низкая ионная проницаемость. Наряду с целыми замкнутыми мембранами, имеющими вид неповрежденного эритроцита, видны и мембраны с измененной поверхностью, видимо, вывернутые наизнанку эритроцитарные везикулы, по-

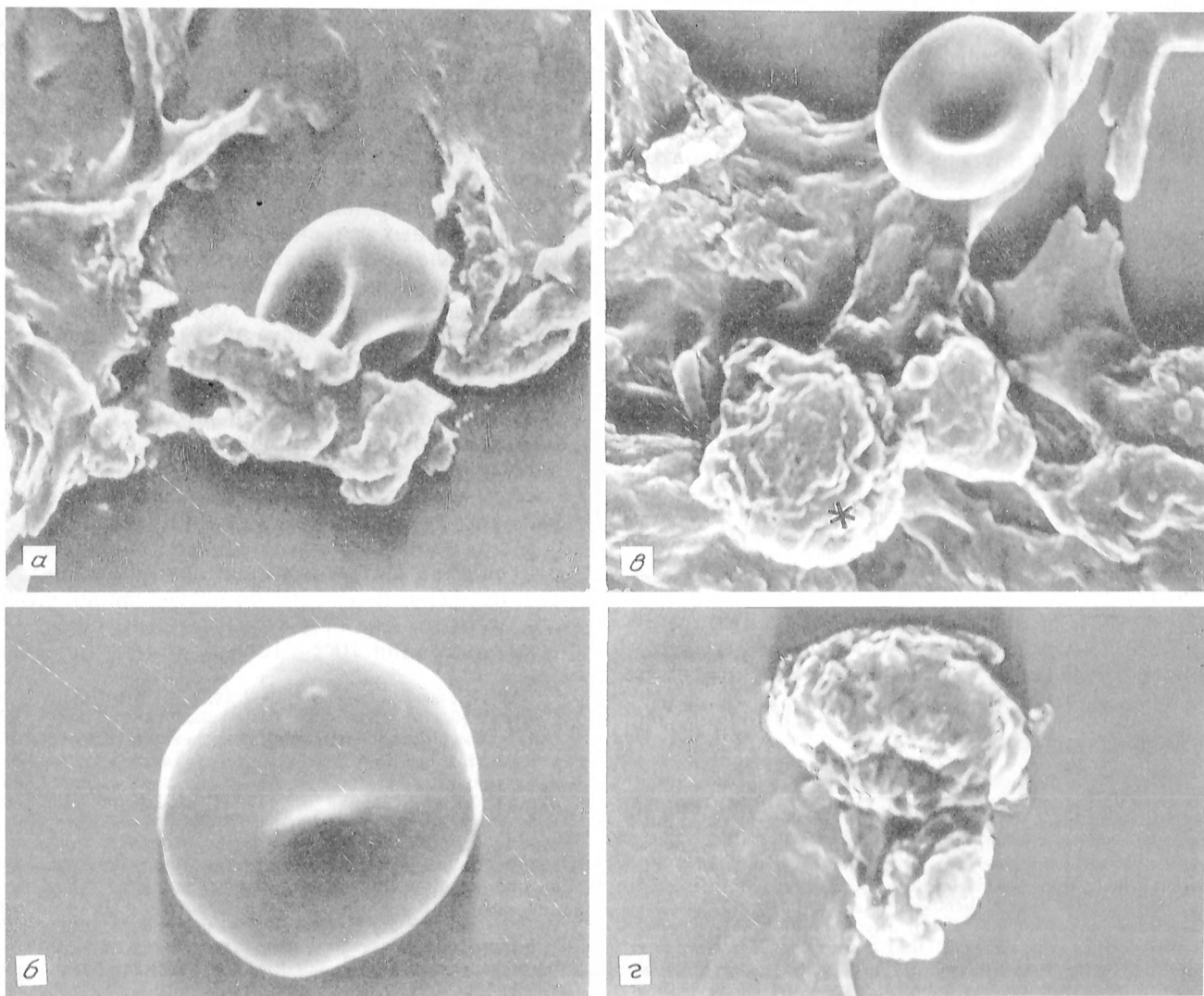


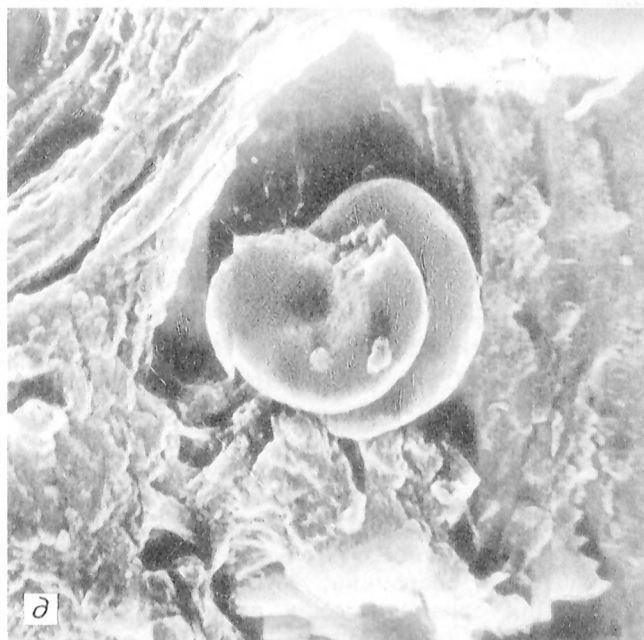
Рис. 1. Мембраны эритроцитов, полученные при гипотоническом лизисе.

Сканирующий электронный микроскоп.
а, в — ув. 3000; б — ув. 6000; г, д — ув. 5000.

лученные после применения гомогенизатора Даунса (см. рис. 1, а*, в), а также встречаются эритроциты с разрушенной поверхностью — мембранные частицы (рис. 1, б, д). Диаметр безгемоглобиновой мембраны 10—12 мкм близок к диаметру цельного эритроцита 7—9 мкм [13]. Все процедуры выделения теней эритроцитов проведены в условиях охлаждения — на льду.

Полученный мембранный препарат из эритроцитов человека был использован в эксперименте по изучению действия инсулина на способность плазматических мембран синтезировать псАТФ из АДФ и неорганического фосфата в ходе аэробного окислительного процесса, сопряженного с окислением NADH в присутствии Mg-АТФ-аналога 5-р-фторсульфоилбензоиладенозина (ФСБА). Для этого была приготовлена модельная инкубационная среда, содержащая в общем объеме 2,4 мл в конечной концентрации следующие вещества: 40 мМ трис-НСl-буфер pH 7,5, 2,5 мМ MgSO₄, 2 мМ АДФ, 5 мМ KН₂РO₄, 2 мкМ ФСБА, 20 мМ NaF, 0,1 мМ NADH, 10 мМ β-оксимасляной кислоты натриевой соли, 277 мкг/мл бычьего сывороточного альбумина, 0,1 мМ цитохрома с, 0,25 М сахарозы, 1 мл суспензии безгемоглобиновых мембран теней эритроцитов (концентрация белка до 1 мг/мл). Концентрация Na⁺ в среде составляла 32,4 мМ, K⁺ — 6 мМ.

Инкубационную среду по 1,4 мл вносили в колбочки Эрленмейера объемом 20 мл, затем добавляли 1 мл суспензии мембранного препарата и реакцию в общем объеме смеси 2,4 мл начинали введением 0,4 мкг/мл инсулина, растворенного в 50 мкл 2 мМ трис-глицинового буфера pH 7,5. Инкубацию осуществляли на гребенке Кребса в водяной бане аппарата Варбурга в условиях продувания инкубационной смеси кислородом под давлением при постоянном встряхива-



нии в течение 1 мин при 30 °С. Реакцию останавливали путем замораживания проб в жидком азоте. Для этого инкубационную смесь быстро переливали из стеклянных сосудов в пластиковые пробирки, которые погружали в жидкий азот. Далее замороженные пробы помещали в кипящую водяную баню на 2 мин. При такой обработке был достигнут максимальный выход мембранно-связанного АТФ. Затем пробирки охлаждали в ледяной воде до 4 °С и денатуриро-

Влияние процедуры лечебного плазмафереза на уровень биосинтеза АТР в препарате плазматических мембран эритроцитов человека

Группа обследованных	Количество синтезированного АТР, нмоль на 1 мг мембранного белка за 1 мин при 30 °С					
	до плазмафереза			после плазмафереза		
	—исс	+исс	Δ	—исс	+исс	Δ
Первая	12,59±0,186 n=7,	20,61±0,292 p<0,001	8,029±0,163 100 %	12,79±0,146 n=7,	21,68±0,166 p<0,001	8,90±0,199 110 %
Вторая	12,71±0,346 n=11,	18,96±0,353 p<0,001	6,25±0,286 77,8 %	12,99±0,280 n=9,	20,54±0,312 p<0,001	7,56±0,336 94,1 %

Примечание. Δ — величина стимулированного инсулином биосинтеза АТР, равная разности уровней опытных (+исс) и контрольных (—исс) данных. Показатель Δ представляет собой количественное выражение псАТР. За 100 % принят уровень псАТР у интактных доноров до плазмафереза.

Ванный материал высаживали центрифугированием при 6000 г в течение 20 мин при 4 °С. После центрифугирования супернатант, содержащий растворенный АТР, отделяли от осадка и проводили фракционирование на колонках со смолой Дауэкс 1×8 (100—200 меш, Cl⁻-форма). Контроль за полнотой выхода АТР с колонки осуществляли путем внесения ¹⁴C-АТР в полученные надосадочные жидкости (20 мкл, 5000 имп/мин). На различных этапах хроматографического разделения нуклеотидов выход ¹⁴C-АТР был следующим: элюция 20 мл 0,01 М трис-НСl-буфером pH 7,5 — 0,07 %, элюция 45 мл 0,03 н. HCl — 1,8 %, конечная элюция 6 мл 0,1 н. HCl — 95,5 %. Неспецифическая сорбция радиоактивного материала на носитель 2,5 %. Подсчет радиоактивности осуществляли в сцинтилляторе Брея на спектрометре SL-4000 («Roche-Bioelectronique», Франция). Более подробное описание всех процедур выделения мембранно-связанного АТР сделано нами ранее [2, 4, 7, 9]. Элюат лиофильно высушивали. Далее лиофилизат растворяли в 1 мл бидистиллированной воды и определяли количество АТР по восстановлению NADP в присутствии гексокиназы, глюкозы и глюкозо-6-фосфатдегидрогеназы по методу [17] в нашей спектрофлуориметрической модификации, описанной ниже. Измерение флуоресценции проводили на спектрофлуориметре MPF-4A («Hitachi», Япония). В кювету прибора помещали 1,4 мл раствора, содержащего 5 мг NADP, 1,8 мг D-глюкозы, 2 мг MgCl₂·6H₂O и 20 мкл стандартной суспензии глюкозо-6-фосфатдегидрогеназы в 100 мл 40 мМ трис-НСl-буфера pH 7,5, и аликвоту исследуемого АТР-содержащего раствора объемом 100 мкл. После быстрого внесения 20 мкл раствора гексокиназы в трис-НСl-буфере pH 7,5 (1 мг/мл) возрастание флуоресценции образца от появления в среде NADPH регистрировали на самописце прибора при длине волны поглощения 360 нм и длине волны флуоресценции 460 нм. О содержании АТР в пробах судили по возрастанию флуоресценции стандартных образцов, содержащих известное количество АТР. Чувствительность метода 10⁻¹³ М.

Результаты и обсуждение. Ранее нами было обнаружено явление синтеза на плазматической мембране клетки «сигналпередающего» АТР под действием ряда пептидных гормонов и полипептидных факторов роста на ткани-мишени [1—3, 5].

Образование псАТР на плазматической мембране животной клетки инициировали главным образом те гормоны и полипептидные факторы роста, рецепторы которых обладали протеин-тирозикиназной активностью (инсулин, фактор роста эпидермиса, соматотропин, гранулоцитарно-макрофагальный колониестимулирующий фактор), либо те полипептидные факторы роста, активация рецепторов которыми на клеточной поверхности вызывает быстрое увеличение активности тирозинкиназы, не являющейся интегральной частью рецепторов, а ассоциируемой с плазматической мембраной в процессе передачи сигнала (интерлейкин-2 [9], формилметиониллейцилфенилаланин [7, 14]).

Доказательства синтеза псАТР именно на плазматической мембране животной клетки представ-

лены ранее [4, 5, 10]. Нами также был проведен соответствующий ингибиторный анализ [5], который показал, что в этом процессе синтеза «сигналпередающего» АТР непосредственно не участвуют сцепленные с плазматическими мембранами гликолитические ферменты или миокиназа, хотя известно, что NADH может быть генерирован на внешней мембране клетки в процессе гликолиза и быть источником окислительно-восстановительных эквивалентов [18].

В данной нашей работе мы поставили задачу исследовать влияние процедуры лечебного плазмафереза на способность мембран эритроцитов синтезировать псАТР.

Первую контрольную группу составили интактные здоровые доноры. Вторая группа доноров была иммунизирована в общей сложности 4 мл очищенного адсорбированного стафилококкового анатоксина. Иммунизацию проводили с целью получения донорской гипериммунной плазмы и изучения полноты удаления иммунных комплексов при плазмаферезе. Третью группу составили больные с различными видами патологических состояний: неспецифическим аортоартериитом, бронхиальной астмой, перитонитом, миастенией.

Кровь для исследования была взята дважды у каждого больного: до и после проведения процедуры плазмафереза. В табл. 1 представлены

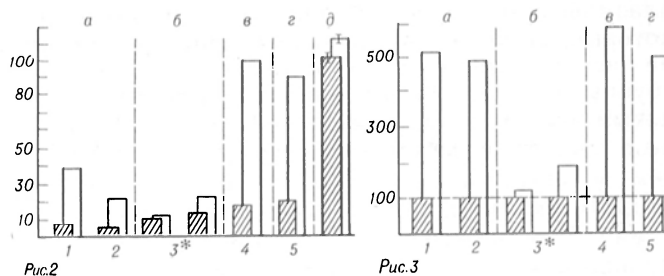


Рис. 2. Влияние плазмафереза на свойство мембран эритроцитов синтезировать псАТР у больных с различными видами патологических состояний и у доноров.

По оси ординат — уровень стимулированного инсулином синтеза псАТР, %. За 100 % принят уровень псАТР у доноров до плазмафереза. Заштрихованные столбики — уровень псАТР до плазмафереза, светлые — после плазмафереза. а — неспецифический аортоартериит — больные 1 и 2; б — бронхиальная астма, киста правого легкого — больной 3* (две процедуры лечебного плазмафереза у одного больного); в — перитонит — больной 4; г — миастения — больной 5; д — доноры; n=7, p<0,001.

Рис. 3. Влияние плазмафереза на уровень биосинтеза псАТР в мембранном препарате эритроцитов у больных с различными видами патологических состояний.

За 100 % принято индивидуальное значение уровня биосинтеза псАТР каждого больного до плазмафереза. Остальные обозначения те же, что и на рис. 2.

Определение уровня биосинтеза АТР в препарате плазматических мембран эритроцитов у больных с различными видами патологических состояний

Патологическое состояние	Количество синтезированного АТР, нмоль на 1 мг мембранного белка за 1 мин при 30 °С					
	до плазмафереза			после плазмафереза		
	—инс	+инс	Δ	—инс	+инс	Δ
Неспецифический аортоартериит:						
больной 1	7,15	7,76	0,60	11,65	14,70	3,05
больной 2	1,72	2,05	0,33	3,24	4,85	1,61
Бронхиальная астма — больной 3*	5,20	5,99	0,79	5,81	6,69	0,89
	4,10	5,00	0,90	7,89	9,53	1,64
Перитонит — больной 4	6,34	7,69	1,35	11,18	19,10	7,92
Миастения — больной 5	3,47	4,90	1,43	3,62	10,77	7,15

Примечание. Приведены результаты индивидуальных исследований больных. Звездочка — больному 3 с бронхиальной астмой, исходя из совокупности клинико-лабораторных показателей, были проведены две процедуры лечебного плазмафереза (повторно через сутки). Δ — величина псАТР, отражающая стимулирующий эффект инсулина.

результаты, полученные при исследовании первой и второй групп доноров. Уровень биосинтеза псАТР был измерен до и после процедуры плазмафереза. В результате работы определены достоверные значения базального уровня АТР без добавления инсулина (—инс) и стимулированного инсулином уровня АТР (+инс). По разности этих значений был определен прирост биосинтеза АТР, который составил $8,029 \pm 0,163$ нмоль на 1 мг мембранного белка за 1 мин. Именно это количество АТР синтезируется в результате действия инсулина и предположительно играет роль мембранного мессенджера в процессе трансмембранной передачи или усиления (амплификации) сигнала от инсулин-рецепторного комплекса на эффекторные системы клетки (киназы) [4, 6]. псАТР выполняет функции некоего интермедиата, объединяющего (сопрягающего) рецепторы клеточной поверхности с их тирозинкиназными доменами на цитоплазматической стороне плазматической мембраны, возможно, по аналогии связывания GTP с G-белками при активации аденيلاتциклазы [19]. После плазмафереза уровень псАТР достоверно возрос на 10,8 % и количественно составил $8,90 \pm 0,199$ нмоль на 1 мг мембранного белка за 1 мин. Это незначительное увеличение можно отнести за счет удаления при плазмаферезе с плазмой избыточных компонентов, которые, по-видимому, каким-то образом влияют на инсулин-рецепторное взаимодействие. У второй группы доноров, иммунизированных стафилококковым анатоксином, уровень псАТР до плазмафереза оказался достоверно ниже — на 22,2 %, чем у интактных доноров, и составил $6,25 \pm 0,286$ нмоль на 1 мг мембранного белка за 1 мин. Это снижение можно объяснить тем, что, по-видимому, анатоксин адсорбировался на поверхности эритроцита и сделал рецепторы менее доступными для инсулина. После плазмафереза уровень псАТР у этой же группы доноров повысился практически до уровня у интактных доноров. Значит, действие анатоксина снималось процедурой лечебного плазмафереза.

Так как базальный уровень мембранно-связанного АТР [показатель (—инс)] не изменился ни до, ни после плазмафереза как у первой, так и у второй группы доноров, мы можем с уверенностью отнести увеличение уровня биосинтеза АТР за счет опосредуемого рецепторами действия инсулина.

При определении уровня биосинтеза псАТР у больных с различными видами патологических состояний удалось выявить его четкую тенденцию к возрастанию после процедуры лечебного плазмафереза. На рис. 2 изображены диаграммы, показывающие изменение уровня биосинтеза псАТР после процедуры лечебного плазмафереза. Хотя следует отметить, что абсолютные значения уровня биосинтеза псАТР у этих больных были значительно ниже, чем у интактных доноров (табл. 2). Однако после плазмафереза эти показатели более близки к норме (см. табл. 1). Влияние же процедуры лечебного плазмафереза на уровень биосинтеза псАТР относительно его уровня до плазмафереза было явно выражено у каждого больного, за исключением больного 3 (летальный исход) (рис. 3). Создается впечатление, что после процедуры лечебного плазмафереза происходит разблокирование мембранных структур, ответственных за биосинтез псАТР.

Определение стимулированного инсулином уровня псАТР может служить достоверным критерием эффективности процедуры лечебного плазмафереза.

ЛИТЕРАТУРА

1. Карелин А. А. // Биол. мембраны. — 1991. — Т. 8, № 11. — С. 1224—1228.
2. Карелин А. А. // Вопр. мед. химии. — 1981. — № 5. — С. 679—685.
3. Карелин А. А. // Вестн. АМН СССР. — 1983. — № 7. — С. 74—85.
4. Карелин А. А. // Там же. — 1986. — № 8. — С. 77—90.
5. Карелин А. А. // Там же. — 1987. — № 7. — С. 35—41.
6. Карелин А. А. // Там же. — 1991. — № 6. — С. 44—47.
7. Карелин А. А., Глоба А. Г., Демидова В. С., Марчук А. И. // Там же. — 1986. — № 5. — С. 93—98.
8. Карелин А. А., Глоба А. Г., Демидова В. С. и др. // Там же. — 1985. — № 2. — С. 111—117.
9. Карелин А. А., Демидова В. С., Глоба А. Г. и др. // Там же. — 1989. — № 3. — С. 120—124.
10. Карелин А. А., Марчук А. И., Рывинский С. С. // Там же. — 1983. — № 6. — С. 99—105.
11. Марчук А. И. Автореф. дис. // Лечебный плазмаферез у хирургических больных // Д-ра мед. наук. — М., 1990.
12. Петрова М. П., Сербинова Т. А., Васильев П. С. // Лаб. дело. — 1978. — № 8. — С. 503.
13. Петрова М. П., Сербинова Т. А., Рыполова И. В. и др. // Гематол. и трансфузиол. — 1987. — № 4. — С. 53—55.
14. Berkow R. L., Dodson R. W., Kraft A. S. // Biochim. biophys. Acta. — 1989. — Vol. 97, N 3. — P. 292—301.
15. Dodge I. I., Mitchell C., Hanahan D. I. // Arch. Biochem. — 1963. — Vol. 100. — P. 119—130.

16. Kinoshita K. Jr., Tsong T. Y. // Ibid.— 1977.— Vol. 268.— P. 438—441.
17. Kornberg A. // J. biol. Chem.— 1950.— Vol. 182.— P. 779—793.
18. Schipfer W., Neophyton B., Trombisch R. et al. // Int. J. Biochem.— 1985.— Vol. 17, N 7.— P. 819—823.
19. Steele R. E. // TIBS.— 1990.— Vol. 15, N 4.— P. 124—125.

Поступила 26.12.91

INSULIN-STIMULATED SYNTHESIS OF PLASMA MEMBRANE "SIGNAL" ATP IN PLASMA MEMBRANES OF HUMAN ERYTHROCYTES AS A CRITERION OF THERAPEUTICAL PLASMAPHERESIS EFFICIENCY

V. S. Demidova, A. I. Marchuk, I. V. Ryapolova, G. I. Kozinets, A. A. Karelin

A. V. Vishnevsky Institute of Surgery, Academy of Medical Science of the Russian Federation, Moscow.

Insulin-stimulated synthesis of plasma membrane "signal" ATP (psATP) from ADP and P_i in oxidation coupled with that of NADH was detected in a preparation of plasma membranes from human erythrocytes; psATP was formed at concentrations of 10^{-8} — 10^{-9} M. Effect of medicinal plasmapheresis on ability of erythrocyte membranes to produce psATP was studied. The rate of psATP biosynthesis was estimated in healthy volunteers and in patients with various diseases: nonspecific aortic arteritis, bronchial asthma, peritonitis, myasthenia before and after plasmapheresis. Distinct values of basal content of ATP (without insulin) and insulin-stimulated biosynthesis of ATP were detected in volunteers. Elevation of ATP biosynthesis, in response to insulin effect, was equal to 8.029 ± 0.163 nmol/mg of membrane protein per min. Estimation of the psATP biosynthesis rate in patients with various pathological states enabled to detect markedly that psATP content tends to increase after plasmapheresis. Absolute values of psATP content were distinctly lower in these patients than those in healthy volunteers, while after plasmapheresis these parameters approached the normal level. Estimation of the insulin-stimulated synthesis of psATP may serve as a valid criterion of plasmapheresis efficiency.

© С. С. Пузач, З. В. Горбач, 1993

УДК 615.355:594.61.07

С. С. Пузач, З. В. Горбач

РОЛЬ КОСУБСТРАТА В КИНЕТИЧЕСКОМ МЕХАНИЗМЕ ДЕЙСТВИЯ ТИАМИНАЗЫ I МОЛЛЮСКОВ

Институт биохимии АН Беларуси, Гродно

Доступность тиамина как кофермента в существенной степени ограничивается широким распространением в органической природе антитиаминовых факторов. Среди них ведущее место занимает фермент, катализирующий деградацию тиамина и его биологически активных производных, — тиаминаза. Высокая удельная активность тиаминазы обнаруживается в тканях некоторых видов животных и растений, а также в микроорганизмах [4—6], что обуславливает интерес к биохимии тиаминаз. Двусубстратная тиаминазная реакция, исходя из данных аналитического метода стационарной кинетики, протекает по механизму двухтактного замещения [3]. Взаимодействие тиамина с ферментом приводит к образованию

замещенной формы фермента и первого продукта реакции — тиазола. Реакция, катализируемая тиаминазой I моллюсков, имеет особенности, связанные с отчетливо выраженной предстационарной фазой синтеза тиазола, после которой наблюдается стационарная стадия процесса.

В предпринятом исследовании рассмотрены механизм активации тиаминазы I моллюсков косубстратом, а также открывающаяся на основе установленного эффекта возможность использования фермента в аналитических целях.

Методика. Тиаминазу I выделяли из внутренних органов двусторчатых моллюсков и эксперименты проводили на препарате фермента, частично очищенном по ранее описанному методу [2]. Активность фермента определяли при 30 °C в 0,05 М фосфатном буферном растворе pH 6,5.

О скорости тиаминазной реакции судили по образованию продукта 14 C-тиазола из меченого тиамина [3]. Часть экспериментальных данных получены при —10 °C. В этом случае для предотвращения замерзания буферной смеси к ней добавляли 30 % глицерина; пробы охлаждали смесью льда с поваренной солью.

Радиометрические определения выполнены с диоксидным сцинтиллятором в счетчике «Марк-11» («Nuclear Chicago», США).

В исследовании использовали тиазол-2- 14 C-тиамин («Amersham», Англия), тиамин («Ferah», меченую никотиновую кислоту с удельной активностью 1,2 мКи/моль (отечественного производства), никотинамид (отечественного производства). 14 C-тиазол соответствует 4-метил-5-(оксизтил)-тиазолу, пириимидин- (2-метил-4-амино-5-оксиметил) — пириимидину. Связывание никотиновой кислоты с тиаминазой проводили по методу [1]. Остальные условия проведения эксперимента указаны в таблице и подписях к рисункам.

Результаты и обсуждение. Тиаминаза I, изолированная в очищенном состоянии из внутренних органов двусторчатых моллюсков, катализирует реакцию расщепления тиамина на пириимидиновый и тиазоловый компоненты. Отмеченная нами особенность кинетического механизма заключается в существовании предстационарной фазы, которая протекает с высокой, недоступной для наблюдений в обычных условиях скоростью.

Экспериментально определяемая величина предстационарного синтеза тиазола снижается при длительном диализе очищенной тиаминазы I моллюсков (рис. 1). Это наблюдение указывало на существование низкомолекулярного соединения — эффиктора, образующего лабильный комплекс с тиаминазой, диссоциирующий при диализе. Дополнительное подтверждение этого предположения получено при преинкубации белка с никотинамидом — акцептором переносимой группы в

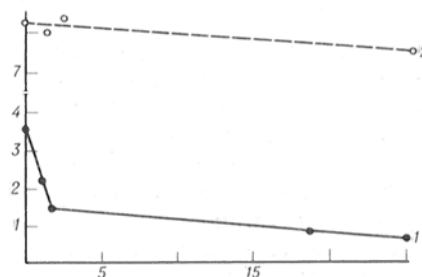


Рис. 1. Влияние никотинамида на амплитуду предстационарного синтеза 14 C-тиазола из 14 C-тиамина в тиаминазной реакции в зависимости от длительности диализа белка.

По оси абсцисс — длительность диализа, ч; по оси ординат — радиоактивность 14 C-тиазола, имп/мин.
1 — предстационарный синтез 14 C-тиазола без никотинамида; 2 — активация предстационарного синтеза 14 C-тиазола никотинамидом.

Данные для построения калибровочной кривой при определении концентрации общего тиамин

Номер эксперимента	Прибавлено нерадиоактивного тиамина в инкубационную среду, мкг/мл	Значение радиоактивности продукта реакции — тиазола, имп/мин (разность повторений)			Среднее значение радиоактивности продукта реакции и ошибка среднего значения, имп/мин	Точность определения, %
		I	II	III		
1 (контроль)	0	3029	3024	2976	3009 ± 29	0,96
2	0,05	1901	2197	2167	2088 ± 163	7,8
3	0,10	1694	1708	1693	1698 ± 8	0,47
4	0,20	1572	1638	1693	1530 ± 134	8,75
5	0,40	1330	1185	1235	1250 ± 74	5,9
6	0,80	869	871	869	877 ± 130	1,48
7	1,20	609	683	602	631 ± 45	7,13

Среднее...

4,67

тиаминазной реакции. Никотинамид оказывает существенное активирующее влияние на предстационарную фазу реакции, увеличивая выход тиазола в несколько раз (см. рис. 1).

Для выяснения механизма активирующего действия кофактора проводили инкубацию тиаминазы I моллюсков с ^{14}C -никотиновой кислотой. Наблюдаемое связывание меченого лиганда с нативным ферментом зависело от концентрации никотиновой кислоты в среде инкубации (рис. 2). Используя Скэтчард-анализ изотермы адсорбции метки на белке, установили константу диссоциации комплекса белок — лиганд, которая составила $1 \cdot 10^{-6}$ М. Линейность графика Скэтчарда указывает на однотипность центров связывания лиганда на белке. Амплитуда предстационарной фазы при условии избытка тиамина определяется концентрацией белка (рис. 3). В присутствии больших количеств тиаминазы I внесенный в реакционную среду тиамин может быть полностью расщеплен на составляющие основания уже в предстационарной стадии реакции. Разведение фермента в 5, 10, 20 и 40 раз позволяет наблюдать как предстационарный всплеск синтеза тиазола, так и последующую стационарную стадию процесса при комнатной температуре. Стационарная скорость реакции при насыщении фермента субстратом тесно согласуется с амплитудой предстационарной фазы. Проведение реакции при пониженной температуре (-10°C) приводит к полному

блокированию стационарной стадии процесса без влияния на предстационарную компоненту (рис. 4). Строгая пропорциональность между величиной всплеска синтеза тиазола в предстационарную фазу и разведением раствора фермента указывает на высокую эффективность начальной стадии взаимодействия тиамина с тиаминазой I. Хорошая воспроизводимость величины всплеска образования тиазола при -10°C в реакции расщепления тиамина активированной никотинамидом тиаминазой I моллюсков открывает возможность для разработки высокоспецифического и чувствительного аналитического метода определения витамина в различных исследуемых образцах, включая экстракты биологических объектов и фармакопейные препараты.

При условии, когда величина предстационарного формирования ^{14}C -тиамина составляет лишь часть общей концентрации ^{14}C -тиамина, внесение в реакционную среду немеченого тиамина приводит к эффекту разведения и снижению выхода меченого тиазола. Радиоактивность ^{14}C -тиазола закономерно снижается при внесении возрастающих количеств немеченого тиамина (см. таблицу). На основе этих данных построен линейный калибровочный график (рис. 5), используя который можно определить содержание тиамина в образце с неизвестной его концентрацией с высокой специфичностью и чувствительностью.

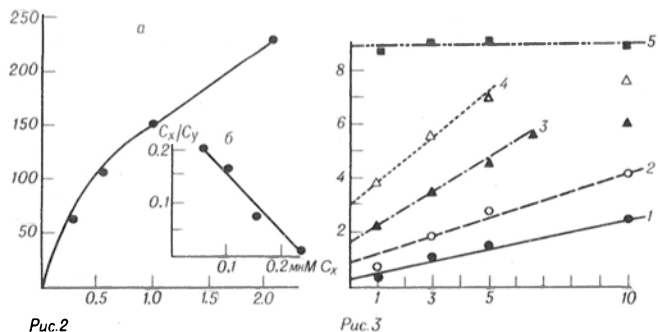


Рис. 2. Связывание ^{14}C -никотиновой кислоты с тиаминазой I моллюсков.

По оси абсцисс — концентрация свободной никотиновой кислоты, мМ; по оси ординат — концентрация связанной никотиновой кислоты, нМ.
а — изотерма связывания; б — график Скэтчарда; C_x — радиоактивность связанной с белком метки; C_y — радиоактивность свободной метки.

Рис. 3. Ход реакции, катализируемой тиаминазой I моллюсков, в зависимости от содержания белка при 20°C .

По оси абсцисс — время, мин; по оси ординат — накопление ^{14}C -тиазола, имп/мин.
Степень разведения раствора фермента: 1 — 1:40; 2 — 1:20; 3 — 1:10; 4 — 1:5; 5 — без разведения.

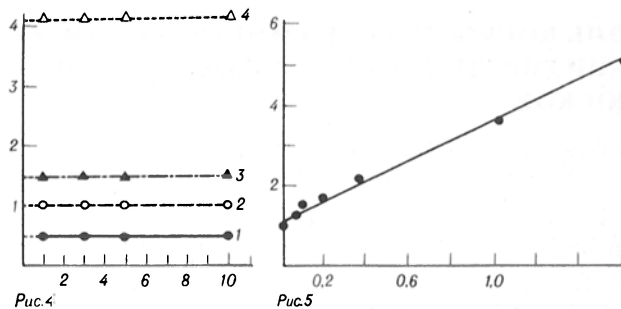


Рис. 4. Изменение амплитуды предстационарного синтеза ^{14}C -тиазола тиаминазой I моллюсков при -10°C .

По оси абсцисс — время, мин; по оси ординат — радиоактивность ^{14}C -тиазола, имп/мин. Разведение раствора белка: 1 — 1:20; 2 — 1:10; 3 — 1:5; 4 — без разведения.

Рис. 5. Калибровочный график для определения содержания тиамина с помощью тиаминазы при -10°C .

По оси абсцисс — количество немеченого тиамина (в мкг), внесенного в реакционную среду; по оси ординат — отношение C_0/C_x , где C_0 — радиоактивность ^{14}C -тиазола без разведения метки; C_x — радиоактивность продукта реакции при добавлении в реакционную среду возрастающих количеств немеченого тиамина.

ЛИТЕРАТУРА

1. Маниатис Т., Фрич Э., Сэмбрук Дж. Молекулярное клонирование: Пер. с англ. — М., 1984. — С. 408.
2. Пузач С. С., Горбач З. В., Островский Ю. М. // Биохимия. — 1984. — Т. 49, № 7. — С. 1178—1183.
3. Edwin E. E., Jackman R. A. // J. Sci. Food Agric. — 1974. — Vol. 25, N 4. — P. 357—368.
4. Ikehata H. // J. gen. Appl. Microbiol. Chem. — 1960. — Vol. 6, N 1. — P. 30—39.
5. McCleary B. V., Chick B. F. // Phytochemistry. — 1977. — Vol. 16, N 2. — P. 207—213.
6. Murata K. // Review of Japanese Literature on Beri-Beri and Thiamine. — Tokyo, 1965. — P. 222—254.

Поступила 24.04.91

IMPORTANCE OF COSUBSTRATE IN KINETICS OF THIAMINASE I FROM MOLLUSCA

S. S. Puzach, Z. V. Gorbach

Institute of Biochemistry, Academy of Sciences of the Byelorussian Republic, Grodno.

Mechanisms of interaction between thiaminase I and cosubstrate were studied using thiazole-2- 14 C-thiamine and 14 C-nicotinic acid. The dissociation constant of nicotinic acid in the presence of the enzyme was of an order of $1 \cdot 10^{-6}$ M. A mechanism of the prestationary phase of a thiaminase reaction at -10° was studied. The low temperature step, which demonstrated specific characteristics, was involved in analytic estimation of total thiamine concentration *in vitro*. Native thiaminase I from the bivalve mollusca *Anodonta cygnea* proved to be choloenzyme.

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 1993

УДК 616.831-008.934.663-092.9-074

А. И. Фоменко, П. К. Пархомец, Г. В. Донченко, С. П. Степаненко

ВЗАИМОДЕЙСТВИЕ NAD С ГАМК-ЕРГИЧЕСКОЙ СИСТЕМОЙ ГОЛОВНОГО МОЗГА КРЫС

Институт биохимии им. А. В. Палладина АН Украины, Киев

Нарушение функционирования ГАМК-ергической системы лежит в основе патогенеза таких неврологических заболеваний, как шизофрения, хорея Гентингтона, эпилепсия [10, 11, 17]. Рецепторы ГАМК являются частью сложного белкового комплекса олигомерной структуры, имеющей на одной субъединице участки узнавания для бензодиазепинов, а на другой — для ГАМК; функционирование комплекса сопряжено с хлорным каналом [8].

Имеются данные, подтверждающие так называемую ГАМК-гипотезу эпилепсии и судорожных пароксизмов. При некоторых видах эпилепсии показано нарушение функции ГАМК-ергических нейронов [12], при котором существенное значение имеют блокада постсинаптических рецепторных участков для ГАМК, изменение свойств постсинаптической мембраны, блокада высвобождения медиатора.

Для лечения эпилепсии наряду со средствами, повышающими чувствительность постсинаптических ГАМК-ергических рецепторов, используется в клинике и никотинамид, нейрофармакологическое и психотропное сходство которого с диазепамом показано при изучении метаболизма нейро-

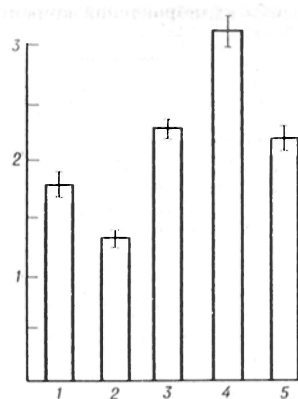


Рис. 1. Содержание ГАМК (в μ моль/г ткани) в мозгу крыс после введения коразола.

1 — контроль; 2 — через 50 с после введения коразола; 3 — через 2 мин; 4 — через 10 мин; 5 — через 3 ч.

медиаторов в условиях стрессового воздействия [15]. Известно, что при судорожных состояниях снижается активность некоторых NAD-зависимых дегидрогеназ [2], снижается содержание никотинамидных коферментов в крови [7].

Ранее нами было показано, что никотинамид, который считают одним из возможных эндогенных лигандов бензодиазепиновых рецепторов, может оказывать действие на ГАМК-бензодиазепиновый рецепторный комплекс опосредованно через NAD [4, 5]. Установлено взаимодействие между рецепторами бензодиазепинов и нейрональными белками, связывающими NAD [3]. Модели судорожных состояний могут быть весьма полезными для выяснения механизма действия NAD в нервной клетке и его связи с ГАМК-ергической системой. Поэтому для исследования механизма противосудорожного действия никотинамида представлялось целесообразным изучить ответ главной тормозной медиаторной системы на действие NAD.

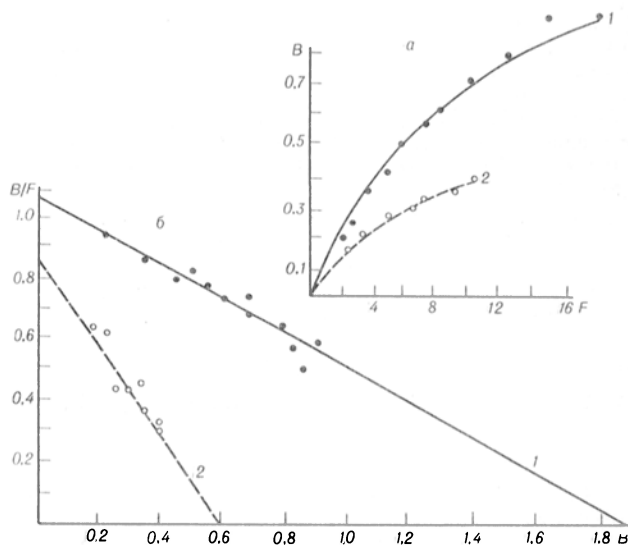


Рис. 2. Специфическое связывание 3 H-мусцимола с синаптическими мембранами.

а — зависимость специфического связывания 3 H-мусцимола от концентрации свободного лиганда: по оси абсцисс — концентрация свободного лиганда (F), μ M, по оси ординат — содержание связанного лиганда (B), μ моль на 1 мг белка; б — та же зависимость в координатах Скэтчарда: по оси абсцисс — содержание связанного лиганда (B), μ моль на 1 мг белка, по оси ординат — отношение концентрации связанного лиганда к концентрации свободного (B/F). 1 — контроль; 2 — через 50 с после введения коразола.

Влияние NAD на специфическое связывание ^3H -мусцимола (в пмоль на 1 мг белка; $n=5$)

Концентрация NAD, М	Контроль	Коразол
10^{-3}	$0,421 \pm 0,018$	$0,292 \pm 0,009$
10^{-6}	$0,436 \pm 0,007$	$0,324 \pm 0,011$
10^{-7}	$0,516 \pm 0,014$	$0,370 \pm 0,017$
	$0,549 \pm 0,022$	$0,365 \pm 0,007$

Методика. Опыты проводили на белых крысах-самцах массой тела 150 г. Коразол вводили животным внутривенно из расчета 30 мг на 1 кг массы тела за 50 с, 2 мин, 10 мин и 3 ч до декапитации.

Содержание ГАМК определяли радиолигандным методом по вытеснению ^3H -мусцимола из ГАМК-рецепторного комплекса синаптических мембран, обработанных тритоном X-100 [18]. Экстракт для определения ГАМК готовили следующим образом: 1 г мозга гомогенизировали с 3 мл холодной дистиллированной воды, затем добавляли 0,4 мл 50 % сульфосалициловой кислоты. Экстракт центрифугировали 15 мин при 20 000 g. В инкубационную смесь для связывания ^3H -мусцимола брали по 10 мкл разведенного в 25 раз экстракта.

Для определения специфического связывания ^3H -мусцимола с рецептором ГАМК суспензию мембран, содержащую 200 мкг белка, инкубировали в среде общим объемом 0,2 мл, содержащей 50 мМ трис-НСl-буфер pH 7,4, различные концентрации ^3H -мусцимола (как указано в тексте), в течение 30 мин при 2 °С. После инкубации смесь фильтровали под вакуумом через фильтры GF/C («Whatman», Англия). Фильтры промывали 3 раза по 3 мл 50 мМ трис-НСl-буфером и измеряли радиоактивность фильтров. Для определения неспецифического связывания использовали мусцимол в концентрации 10^{-5} М. При изучении влияния NAD на связывание ^3H -мусцимола пробы, содержащие белок, преинкубировали с различными концентрациями NAD при 32 °С в течение 20 мин, а затем проводили связывание, как описано.

Захват ^{14}C -ГАМК синаптическими мембранами, выделенными из мозга нормальных животных и животных, которым вводили конвульсант, определяли в среде, содержащей 5 мМ трис-НСl-буфер pH 7,4, 120 мМ NaCl, 5 мМ KCl, 1 мМ CaCl_2 , 1 мМ MgCl_2 , 0,5 мМ Na_2HPO_4 , 10 мМ глюкозу, 1 мМ гидроксиламин, 1 мМ PMSF, 100 мкг белка синапсом, 1,1 мкМ ^{14}C -ГАМК (удельная активность 232 мКи/ммоль, «Amersham»). После 3 мин инкубации при 37 °С пробы фильтровали через фильтры GF/C («Whatman»), промывали 5 мМ трис-НСl-буфером, не содержащим ионов, и подсчитывали радиоактивность фильтров на сцинтилляционном счетчике. Захват ^{14}C -ГАМК синаптическими мембранами выражали в пикомолях на 100 мкг белка за 3 мин. При изучении влияния NAD на захват ^{14}C -ГАМК синаптическими мембранами преинкубировали в течение 5 мин с 10^{-6} М NAD при 32 °С, а затем проводили инкубацию, как описано. Неспецифический захват определяли в среде, не содержащей ионов натрия.

Синапсомы и синаптические мембраны выделяли, используя градиент сахарозы, по методу [6]. Все буферы содержали 0,5 мМ PMSF. NAD определяли по методу [9], белок — по методу [16].

Результаты и обсуждение. Данные о содержании ГАМК в головном мозгу при эпилепсии разноречивы, многие исследователи, вопреки ожидаемому снижению содержания тормозной аминокислоты при введении конвульсантных препаратов, наблюдали ее значительное повышение [13, 14]. Полагают, что концентрация ГАМК не является показателем торможения.

При исследовании нами содержания ГАМК в мозгу нормальных животных и животных с введенным коразолом обнаружено, что при воздействии коразола изменения содержания ГАМК имеют характерные особенности (рис. 1). Так, достоверное увеличение содержания ГАМК наблюдается через 2 и 10 мин после введения коразола соответственно на 28 и 80 % по сравнению с контролем. Через 3 ч содержание ГАМК приближается к норме, но остается повышенным.

Важным представляется тот факт, что в фазе,

предшествующей началу судорог, через 50 с после введения конвульсанта нами обнаружено, что содержание ГАМК в мозгу достоверно снижается на 21 % по сравнению с контролем. Интересно отметить, что в это же время отмечено снижение на 23 % содержания NAD с 215 мкг на 1 г свежей ткани мозга нормальных животных до 167 мкг при введении коразола. Поэтому все последующие эксперименты проведены нами при 50 с экспозиции на фоне сниженного содержания ГАМК.

В проявлении судорожной активности участвуют системы постсинаптического связывания и захвата ГАМК, обеспечивающие реализацию ее нейротропных функций. Для тестирования рецепторов ГАМК использовали ее фармакологически активный аналог ^3H -мусцимол. Как следует из рис. 2, специфическое связывание ^3H -мусцимола заметно снижается через 50 с после введения коразола. К специфического связывания в норме равна 17,5 нМ, а после введения коразола — 8 нМ. Снижение специфического связывания ^3H -мусцимола с рецептором ГАМК происходило не за счет изменения K_d , а за счет изменения емкости рецепторного связывания с 1,9 пмоль на 1 мг мембранного белка до 0,6 пмоль, что может быть связано с торможением ГАМК-ергической передачи.

При изучении влияния NAD на специфическое связывание ^3H -мусцимола с синаптическими мембранами показано, что NAD в концентрации 10^{-6} , 10^{-7} М увеличивал связывание радиолиганда с рецептором ГАМК контрольных животных и животных с введенным конвульсантом. В этих опытах была использована 5 нМ концентрация ^3H -мусцимола (см. таблицу). Эффект NAD наблюдали только с мембранами, отмытыми несколько раз 5 мМ трис-НСl-буфером pH 7,4 при низкой температуре от эндогенной ГАМК. Представленные результаты позволяют предполагать, что при судорожном состоянии животных NAD может восстанавливать постсинаптическое тормозное действие ГАМК вследствие усиления ее рецепторного взаимодействия.

При изучении системы захвата ГАМК, регулирующей уровень нейротрансмиттера, показано, что в условиях наших опытов захват синаптическими мембранами ^{14}C -ГАМК осуществлялся очень быстро в течение первых 3 мин и затем более медленно с увеличением времени инкубации. Практически захват радиометки достигал максимума на 5 мин и составлял 3 % от добавленной в инкубационную среду ^{14}C -ГАМК. В этих исследованиях использовали

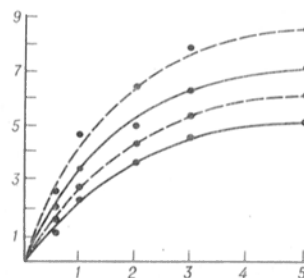


Рис. 3. Динамика (в мин) захвата ^{14}C -ГАМК (в пмоль/100 мкг белка) синаптическими мембранами головного мозга крысы.

2, 4 — контроль; 1, 3 — введение коразола; 3, 4 — то же+NAD.

свежевыделенные (в пределах 3,5 ч) синапсомы.

Известно, что при эпилептогенезе физиологически значимое прекращение тормозного эффекта ГАМК происходит за счет увеличения высокоаффинного захвата нейротрансмиттера. В условиях наших экспериментов уже в предсудорожную фазу (через 50 с после введения коразола) наблюдается увеличение на 30 % захвата ГАМК по сравнению с контролем (рис. 3).

При этом NAD в концентрации 10^{-6} М при добавлении в среду инкубации вызывает торможение на 27 % захвата нейромедиатора синапсомы мозга животных контрольной группы. Полученные нами данные по скорости захвата и степени торможения отличаются от опубликованных ранее [1].

Действие NAD на захват ^{14}C -ГАМК синапсомы, полученными от животных с введенным коразолом, имеет более выраженный эффект (торможение составляет 35 %), чем у контрольных животных (см. рис. 3). Эти данные представляют интерес, в связи с тем что в результате исследований противосудорожной активности ингибиторов захвата ГАМК синапсомы показана их способность проявлять себя в качестве антиконвульсантных агентов.

Таким образом, принимая во внимание полученные нами ранее данные о взаимодействии никотины с ГАМК-бензодиазепиновым рецепторным комплексом [5] и данные настоящей работы, можно полагать, что фармакологический эффект никотины, используемого в клинике для лечения эпилептических припадков, может реализовываться через NAD, который активирует рецепторы ГАМК, облегчая ГАМК-ергическую передачу. При этом NAD, воздействуя на конечный этап постсинаптического действия тормозного нейротрансмиттера, способен тормозить синапсомальный захват ^{14}C -ГАМК подобно ингибиторам захвата, которые являются эффективными антиконвульсантами.

ЛИТЕРАТУРА

1. Арутюнян А. В., Гулян Р. А., Нерсисян Ц. М. и др. // Нейрохимия.— 1988.— Т. 7, № 3.— С. 348—356.
2. Моисеев И. Н. // Бюл. экспер. биол.— 1989.— № 9.— С. 297—299.
3. Фоменко А. И., Пархомец П. К., Степаненко С. П., Донченко Г. В. // Объединенный симпозиум биохимического о-ва СССР—ГДР «Механизмы регуляции клеточной активности», 10-й: Тезисы докладов.— Ташкент, 1989.— С. 84—85.
4. Фоменко А. И., Степаненко С. П., Донченко Г. В., Халмурадов А. Г. // Биохимия.— 1989.— Т. 54, № 3.— С. 381—386.
5. Фоменко А. И., Халмурадов А. Г., Пожарун С. В., Степаненко С. П. // Нейрохимия.— 1988.— Т. 7, № 1.— С. 26—32.
6. Abila J., Chicheportiche R., Sehwezt H., Lozchensri M. // Biochemistry (Wash.).— 1977.— Vol. 16, N 9.— P. 1838—1864.
7. Bonavita V., Guarneri R., Amor G. // J. Neurochem.— 1970.— Vol. 17, N 8.— P. 1613—1614.
8. Chang L.-R., Barnard E. A. // Ibid.— 1982.— Vol. 39, N 6.— P. 1507—1518.
9. Ciotti M. M., Kaplan N. O. // Methods of Enzymatic Analysis / Ed. H. V. Bergmeier.— New York, 1963.— P. 528—538.
10. De Fendit F. V. // Neurochem. int.— 1989.— Vol. 5, N 2.— P. 175—183.
11. Enna S. J. // Biochem. Pharmacol.— 1981.— Vol. 30, N 9.— P. 907—913.
12. Houd K. G., Zivkovic B., Scallan B. et al. // Progr.

Neuro-Psychopharmacol. Biol. Psychiat.— 1989.— Vol. 13, N 3.— P. 341—351.

13. Imaizumi K., Ito S., Kukurare K. et al. // Bull. exp. Anim.— 1959.— Vol. 8, N 10.— P. 32—36.
14. Kambin R. P., Kambin A. A. // J. Neurochem.— 1961.— Vol. 6, N 3.— P. 219—225.
15. Kennedy B., Leonard B. E. // Biochem. Soc. Trans.— 1980.— Vol. 8, N 1.— P. 59—60.
16. Lowry O. H., Rosebrough N. J., Farr A. L., Randall R. J. // J. biol. Chem.— 1951.— Vol. 193, N 1.— P. 265—275.
17. Meldrum B. S. // Neuropharmacology.— 1982.— Vol. 6.— P. 293—316.
18. Mousan A., Goegmin B., Lesne M. // Clin. chim. Acta.— 1987.— Vol. 170, N 1.— P. 151—160.

Поступила 07.03.91

INTERACTION BETWEEN NAD AND GABA-ERGIC SYSTEM OF RAT BRAIN

A. I. Fomenko, P. K. Parkhomets, G. V. Donchenko, S. P. Stepanenko

A. V. Palladin Institute of Biochemistry, Academy of Sciences of the Ukrainian SSR, Kiev.

After administration of corazole content of γ -aminobutyric acid (GABA) was increased in the rat brain within 2 min and 10 min by 28 % and 80 %, respectively. Content of the GABA was distinctly decreased in the prespastic phase. During this period specific binding of ^3H -muscimol to the GABA receptors was decreased. NAD at concentrations 10^{-6} M and 10^{-7} M activated the GABA receptors and inhibited binding of ^{14}C -GABA to the synaptosomes of both intact rats and the animals treated with the convulsant agent. NAD appears to cause an effect as an inhibitory neurotransmitter at the postsynaptic level.

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 1993

УДК 616.714+616.831]-001-092.9-07:[616.831-008.939.15-39+616.831-008.931:577.152.1]

М. Л. Демчук, А. Е. Медведев, М. Ш. Промыслов, В. З. Горкин

ПРОЦЕССЫ ПЕРЕКИСНОГО ОКИСЛЕНИЯ ЛИПИДОВ И АКТИВНОСТЬ СУКЦИНАТ-ДЕГИДРОГЕНАЗЫ МОЗГА ПРИ ЧЕРЕПНО-МОЗГОВОЙ ТРАВМЕ В ЭКСПЕРИМЕНТЕ

Институт нейрохирургии им. Н. Н. Бурденко РАМН, Институт биологической и медицинской химии РАМН, Москва

Среди метаболических расстройств, определяющих патохимические сдвиги обмена веществ в тканях головного мозга при черепно-мозговой травме (ЧМТ), важное значение принадлежит активации процессов перекисного окисления липидов (ПОЛ) [4], сопровождающейся нарушением структуры митохондрий и биоэнергетических процессов в них [9]. Механизм интенсификации ПОЛ и влияние его продуктов на энергетические функции митохондрий мозга при ЧМТ нуждаются в существенном уточнении. Показано, что инъекция психостимуляторов фенамина и пирацетама сразу после нанесения ЧМТ экспериментальным животным ограничивает активацию ПОЛ, способствуя нормализации его уровня [10].

ПОЛ-зависимые изменения каталитических свойств мембранно-связанных ферментов (в том числе и митохондриальных) обычно обуславливаются изменением состояния и (или) состава фосфолипидного компонента мембран, модификацией белковых молекул ферментов за счет окисления тиоловых групп, взаимодействием оксипродуктов ПОЛ (диальдегидов) со свободными аминокислотными группами белков [3, 14, 20, 21]. Для сукцинат-дегидрогеназы (СДГ; КФ 1.3.99.1) — интеграль-

Влияние фенамина на показатели ПОЛ больших полушарий мозга кроликов при ЧМТ

Экспериментальная группа	Показатели ПОЛ			
	диеновые конъюгаты, нмоль/100 г сырой ткани	МДА, нмоль/100 г сырой ткани	основания Шиффа, %	АОА, %
Контроль	17,6±1,4 (8)	5,6±0,8 (7)	95,3±19,2 (5)	50,2±14,5 (4)
Травма	33,8±4,4** (8)	8,3±0,6** (13)	177,2±24,2* (5)	0* (6)
Травма+фенамин	12,9±2,2\$\$\$ (5)	3,0±0,5\$\$\$ (5)	65,0±3,9\$\$\$ (5)	63,0±5,1\$\$\$ (5)

Примечание. Здесь и в табл. 2: в скобках — число опытов; статистическая достоверность различий с контролем: одна звездочка — $p < 0,05$, две — $p < 0,01$; статистическая достоверность различий показателей между экспериментальными группами «травма» и «травма+фенамин» один знак параграфа — $p < 0,05$, два — $p < 0,01$, три — $p < 0,001$.

ного белка внутренней мембраны митохондрий [2] — нельзя исключить также «кинетический конкурентный механизм», включающий окисление одного из продуктов ПОЛ — малонового диальдегида (МДА) — до малоновой кислоты, которая, как известно, конкурентно тормозит активность этого фермента [2]. Вытеснение конкурентных ингибиторов СДГ — оксалоацетата и малоната — из активного центра достигается преинкубацией митохондриальных препаратов с избытком сукцината [1].

Целью настоящей работы была экспериментальная проверка возможной роли «кинетического конкурентного механизма» в ПОЛ-зависимом изменении каталитических свойств СДГ мозга при ЧМТ.

Методика. Работа выполнена на кроликах-самцах породы шиншилла массой 2,5—3 кг. ЧМТ средней степени тяжести наносили стандартным методом [12] посредством свободного падения груза массой 500 г с высоты 2,2 м на голову фиксированного в станке животного. Психостимулятор фенамин вводили подкожно в дозе 0,6 мг/кг через 5 мин после нанесения травмы. Спустя сутки животных забивали воздушной эмболией. Этот период времени характеризуется развитием максимальных нарушений митохондриального дыхания и окислительного фосфорилирования в тканях мозга [8].

Для определения продуктов ПОЛ большие полушария мозга гомогенизировали в фосфатно-солевом буфере (40 мМ $\text{KH}_2\text{PO}_4/\text{K}_2\text{HPO}_4$ в 0,142 М NaCl pH 7,4) при соотношении ткань мозга — буфер 1:9. Содержание МДА определяли по [22]. Экстракцию липидов проводили методом [17]. Содержание диеновых конъюгатов определяли спектрофотометрически по поглощению растворов липидов в системе метанол — гексан (5:1) при $\lambda_{\text{макс}}$ 232 нм [15]. Основания Шиффа регистрировали флюориметрически по интенсивности флюоресценции хлороформенных растворов липидов при длине возбуждающего света 360 нм и максимуме испускания 420—440 нм. Контролем служила флюоресценция сернокислого хиинина (в 0,1 н. серной кислоте), интенсивность которой принимали за 100 % [16]. Суммарную антиоксидантную активность (АОА) определяли по торможению накопления МДА при инкубации модельной системы при 37 °С в течение 60 мин.

В качестве субстрата окисления использовали линоленовую кислоту [11].

Митохондриальную фракцию из больших полушарий выделяли, как описано ранее [19], в среде, содержащей 0,25 М сахарозу, 1 мМ ЭДТА, 10 мМ трис-HCl-буфер pH 7,5. Митохондрии однократно промывали в 10 мМ фосфатном буфере pH 7,4. Активность СДГ (сукцинат-феназинметасульфат-редуктазы) измеряли спектрофотометрически в системе сопряженного восстановления 2,6-дихлорфенолиндифенола [1, 6]. Среда измерения (конечный объем 3 мл) содержала 20 мМ фосфатный буфер, 0,1 мМ ЭДТА, 20 мМ сукцинат калия, 1 мМ NaCN (pH 7,8) и акцепторы электронов: 0,05 мМ 2,6-дихлорфенолиндифенол и 2 мМ феназинметасульфат. Для перевода СДГ в активированное состояние митохондриальные препараты преинкубировали при комнатной температуре 20 мин с 20 мМ сукцинатом в отсутствие акцепторов [1]. Содержание белка измеряли биуретовым методом с использованием бычьего сывороточного альбумина в качестве стандарта [18]. При измерении активности СДГ содержание белка в пробах было 0,2—0,4 мг.

Результаты и обсуждение. В соответствии с нашими предыдущими данными [4] ЧМТ вызывает активацию ПОЛ, которая сопровождается резким подавлением АОА мозга и нарастанием количества перекисных соединений липидов в нем (табл. 1). Базальная активность СДГ в митохондриях больших полушарий головного мозга кролика через сутки после нанесения ЧМТ была снижена на 52 % (табл. 2). Преинкубация препаратов с сукцинатом не влияла на процент торможения активности этого фермента, вызванного ЧМТ.

В норме активацию СДГ после преинкубации с сукцинатом объясняют медленной диссоциацией прочносвязанного оксалоацетата из активного центра фермента [1, 2]. Хотя константа диссоциации комплекса фермент — оксалоацетат на порядок ниже соответствующей величины для комплекса фермент — малонат [2, 6], малонат часто используют для освобождения СДГ от оксалоацетата [6].

Таблица 2

Активность СДГ в митохондриальной фракции из больших полушарий мозга кроликов при ЧМТ

Экспериментальная группа	Активность СДГ		
	без преинкубации с сукцинатом	после преинкубации с сукцинатом	прирост активности, %
Контроль	14,4±1,3 (7)	47,9±6,9 (7)	+229±34
Травма	6,9±0,9** (5)	20,3±3,4** (5)	+186±22
Травма+фенамин	17,1±1,5\$\$\$ (4)	70,5±6,8\$\$\$ (4)	+325±50\$

Примечание. Активность СДГ выражена в наномолях окисленного сукцината за 1 мин на 1 мг белка.

В условиях активации ПОЛ при ЧМТ, когда образуется большое количество МДА и, возможно, малоната, нельзя было исключить, что последний также может взаимодействовать с СДГ, внося вклад в конкурентное торможение этого фермента при ЧМТ. Если торможение СДГ в наших экспериментах было бы обусловлено конкурентным ингибированием одним из двух указанных соединений, преинкубация с сукцинатом должна была бы привести к исчезновению ингибирования активности СДГ. Поскольку активность СДГ и после преинкубации с сукцинатом была существенно (на 58 %) ниже в митохондриях мозга животных с ЧМТ по сравнению с контролем, изменения каталитических свойств СДГ при ЧМТ не представляется возможным в настоящее время объяснить конкурентным ингибированием продуктами, образующимися в ходе ПОЛ. С учетом известных данных о торможении активности СДГ биогенными альдегидами, наблюдаемом и после инкубации с сукцинатом [7, 13], и о ПОЛ-зависимом изменении состава митохондриальных мембран [20] механизм торможения активности СДГ при ЧМТ может быть сведен к одному из трех уже упоминавшихся нами выше механизмов (или их комбинации).

Введение стимулятора фенамина непосредственно после нанесения травмы снижает активацию ПОЛ и нормализует суммарную АОА мозга. Инъекция фенамина травмированным животным предотвращает и нарушения активности СДГ и даже увеличивает степень активации этого фермента после инкубации митохондрий с сукцинатом. Поскольку СДГ придает особо важное значение в интенсивности энергопродукции митохондрий при воздействии разного рода неблагоприятных факторов на организм [5], медикаментозная защита каталитических свойств СДГ (а, возможно, и других ферментов энергетического обмена) от ПОЛ-зависимых нарушений путем направленного изменения функционального состояния ЦНС травмированных животных может играть важную роль в терапии ЧМТ.

ЛИТЕРАТУРА

1. Виноградов А. Д. // Реакции живых систем и состояние энергетического обмена. — Пушкино, 1979. — С. 98—125.
2. Виноградов А. Д. // Успехи биол. химии. — 1985. — Т. 26. — С. 64—82.
3. Горкин В. З. Аминоксидазы и их значение в медицине. — М., 1981.
4. Демчук М. Л., Левченко Л. И., Промыслов М. Ш. // Нейрохимия. — 1990. — Т. 9. — С. 108—110.
5. Кондрашова М. Н., Григоренко Е. В., Бабский А. М., Хазанов В. А. // Молекулярные механизмы клеточного гомеостаза. — Новосибирск, 1987. — С. 40—65.
6. Котляр А. Б., Виноградов А. Д. // Биохимия. — 1984. — Т. 49, № 3. — С. 511—518.
7. Медведев А. Е., Горкин В. З. // Вопр. мед. химии. — 1991. — № 5. — С. 2—6.
8. Промыслов М. Ш. // Вестн. АМН СССР. — 1982. — № 9. — С. 81—86.
9. Промыслов М. Ш. Обмен веществ в мозге и его регуляции при черепно-мозговой травме. — М., 1984.
10. Промыслов М. Ш., Демчук М. Л., Левченко Л. И., Старикова Е. Н. // Вопр. мед. химии. — 1991. — № 4. — С. 57—60.
11. Промыслов М. Ш., Демчук М. Л. // Там же. — 1990. — № 4. — С. 90—92.
12. Промыслов М. Ш., Тигранян Р. А. // Вестн. АМН СССР. — 1971. — № 11. — С. 28—31.
13. Чоудри З. М., Котляр А. Б., Виноградов А. Д. // Биохимия. — 1986. — Т. 51, № 9. — С. 1411—1419.

14. Baker S. P., Hemsworth B. A. // Biochem. Pharmacol. — 1978. — Vol. 27. — P. 805—806.
15. Cardus D., Vallbona C., Vogt F. // Aerospace Med. — 1965. — Vol. 36. — P. 524.
16. Csallani A. S., Agas K. L. // Lipids. — 1976. — Vol. 11. — P. 412.
17. Dillard C., Tappel A. L. // Canad. J. Biochem. Physiol. — 1959. — Vol. 37, N 8. — P. 911.
18. Gornall A. G., Bardawill C. I., David M. M. // J. biol. Chem. — 1949. — Vol. 177, N 3. — P. 751—766.
19. Hajos F. // Brain Res. — 1975. — Vol. 93. — P. 485—489.
20. Kagan V. E. Lipid Peroxidation in Biomembranes. — Boca Raton, 1988.
21. McKnight R. C., Hunter F. E. // J. biol. Chem. — 1966. — Vol. 241, N 12. — P. 2757—2765.
22. Ohkawa H., Ohishi N., Yagi K. // Analyt. Biochem. — 1979. — Vol. 95. — P. 351—358.

Поступила 30.09.91

LIPID PEROXIDATION AND ACTIVITY OF BRAIN SUCCINATE DEHYDROGENASE IN EXPERIMENTAL CRANIOCEREBRAL INJURY

M. L. Demchuk, A. E. Medvedev, M. Sh. Promyslov, V. Z. Gorkin
N. N. Burdenko Institute of Neurosurgery, Institute of Biological and Medical Chemistry, Academy of Medical Sciences of the Russian Federation, Moscow

A statistically significant decrease in the activity of succinate dehydrogenase (SDH) was found in the rabbit brain after craniocerebral injury. The decrease in the activity of brain SDH was not shown to result from "competitive inhibition" by malonate accumulated after activation of lipid peroxidation. The activity of brain SDH was normalized by directed modification of the function of the central nervous system via administration of phenamine (amphetamine) into the injured animals.

© И. А. Платонов, 1993

УДК 616.831-005.98-07:616.153.96

И. А. Платонов

ВЛИЯНИЕ ЭДЕМАТОЗНЫХ ФАКТОРОВ НА СИСТЕМУ БЕЛКОВ КРОВИ ПРИ РАЗВИТИИ ОТЕКА И НАБУХАНИЯ ГОЛОВНОГО МОЗГА

Смоленский медицинский институт

Отек и набухание головного мозга (ОНГМ) являются одной из актуальных проблем современной медицины. Описаны изменения при ОНГМ в нервной ткани [3]. При формировании ОНГМ важную роль отводят нарушениям электролитного баланса [8]. Белкам крови в этой связи внимание практически не уделялось. В этой работе были исследованы белки крови при развитии ОНГМ.

Методика. Опыты проведены на крысах линии Вистар массой 150—190 г. Всех животных разделили на рандомизированные группы по 10 крыс. Токсический и травматический ОНГМ вызывали по [9]. Забой осуществляли путем декапитации через 1 ч после введения никотина или компрессии в течение 7 сут.

Кровь забирали в пробирку, отстаивали 20 мин на водяной бане при 37 °С для образования сгустка и центрифугировали при 3000 об/мин. Сыворотку крови декантировали. Общий белок крови определяли спектрофотометрически при 220 нм [6]. Белковые фракции крови осаждали растворами фосфатов различной концентрации и определяли их количество по оптической плотности при 670 нм [1].

Системный анализ полученных результатов проводили по критериям: средней арифметической вариант ряда и ошибке репрезентативности ($\bar{X} \pm m$), коэффициентам асимметрии (As) и эксцесса (Ex). Достоверность указанных критериев и их

Таблица 1

Показатели количества общего белка крови при развитии ОНГМ

Статистический показатель	Интактные животные	ОНГМ	
		токсический	травматический
\bar{X} , г/л	72,7818	77,5992	76,4553
m	1,2146	2,3636	2,16712
As	0,860809	—0,212231	0,512163
T_{As}	1,40081	0,345366	0,83345
EX	—0,746692	—1,64651	—1,54988
T_{EX}	0,559635	1,23403	1,16161
CV , %	5,2773	9,63199	8,96344
Cs , %	1,6688	3,0459	2,83449

различия оценивали по статистике Стьюдента (T) при пороговом уровне, принятом в медико-биологических исследованиях, $p < 0,05$ [5]. Кроме того, состояние системы оценивали по показателю точности (Cs) и коэффициенту вариации (CV).

Результаты и обсуждение. Моделирование ОНГМ вызывает статистически недостоверное увеличение содержания общего белка крови. Эти показатели у интактных животных и при развитии патологического процесса являются величинами жестко детерминированными и довольно точными (табл. 1). Патологический процесс приводит к нарастанию величины CV .

Проведенный более подробный сравнительный статистический анализ по этому показателю у интактных животных и в условиях изучаемой патологии позволил выявить некоторые особенности, характеризующие развитие процесса.

Рассмотрим вначале As (см. табл. 1). Для интактных животных характерна сильная левосторонняя скошенность вариационного ряда, отражающего количество общего белка в крови.

При травматическом ОНГМ сохраняется левосторонний тип накопления вариант, но скошенность значительно менее сильная. При токсическом ОНГМ наблюдается правостороннее накопление вариант вариационного ряда.

Таким образом, при ОНГМ существует тенденция к увеличению содержания общего белка. При токсическом ОНГМ эти изменения выражены более значительно. При травматическом ОНГМ происходит как бы некоторая компенсация процесса сдвига этого показателя.

Как в норме, так и при развитии ОНГМ наблюдается плосковершинный тип распределения вариант. При ОНГМ Ex увеличивается и более чем в 2 раза превышает этот показатель у интактных животных. При этом, судя по CV и T_{Ex} (см. табл. 1), показатели количества общего белка крови представляют однородный материал и формирования двухвершинной кривой не происходит.

Следовательно, при моделировании ОНГМ имеется явный сдвиг в системе белков крови, хотя такой интегральный показатель, как общее количество белка, остается неизменным.

Определение суммарных белков менее информативно, чем индивидуальных. В связи с этим рассмотрим, как же изменяются фракции белков сыворотки крови при развитии патологического процесса.

В группе интактных животных суммарные белковые фракции сыворотки крови соответствуют приведенным в литературе [2]. Проведенный анализ (CV) и (Cs) позволил установить, что все

Таблица 2

Изменения (в %) фракций белков сыворотки крови при развитии ОНГМ

Статистический показатель	Альбумины	Глобулины		
		α	β	γ
Интактные животные				
\bar{X}	42,4925	24,6825	21,8128	11,0123
m	0,265247	0,214454	0,185024	0,273668
As	0,158876	0,58623	0,456044	— 557525
T_{As}	0,258542	0,953979	0,742127	0,907268
EX	— 0,300939	— 0,671775	— 1,1553	— 1,08935
T_{EX}	0,225549	0,503485	0,864382	0,816455
CV	1,97366	2,74755	2,68237	7,85865
Cs	0,62422	0,868853	0,848238	2,48512
Токсический ОНГМ				
\bar{X}	35,6057	26,3576	24,9293	13,1075
m	0,117805	0,0954987	0,165982	0,213593
As	0,200676	— 0,164898	0,225995	— 0,358928
T_{As}	0,326563	0,268341	0,367765	0,584088
EX	— 0,970904	— 0,957426	— 1,20787	— 1,27779
T_{EX}	0,727679	0,717577	0,905282	0,957682
CV	1,04627	1,14576	2,10548	5,15308
Cs	0,33086	0,36232	0,66581	1,62955
Травматический ОНГМ				
\bar{X}	25,2918	27,83	30,5906	16,2876
m	0,466226	0,6704	0,623044	0,447995
As	0,289027	0,486186	0,0777451	0,605293
T_{As}	0,470338	0,791177	0,126516	0,985001
EX	— 1,06627	— 0,620263	— 1,33301	— 0,784461
T_{EX}	0,799153	0,464878	0,999072	0,587942
CV	5,8293	7,61765	6,44067	8,69791
Cs	1,84339	2,40891	2,03672	2,75052

Примечание. Здесь и в табл. 3 различия между всеми исследуемыми группами животных статистически достоверны.

показатели фракций белков крови (табл. 2) интактных животных и при моделировании ОНГМ являются величинами жестко детерминированными с малой степенью изменчивости. В каждой исследуемой группе материал стохастически однороден, а показатели относятся к категории достаточно точных.

Действие эдематозных факторов вызывает статистически значимое снижение в крови содержания фракции альбуминов. При травматическом ОНГМ выраженность этих изменений достоверно больше, чем при токсическом ($p < 0,001$). Анализ распределения вариант показал практически равноценную, незначительную правостороннюю асимметрию во всех исследуемых группах и более значительное уплощение кривой при действии эдематозных факторов. Следовательно, полученные данные отражают биологически однотипную направленность изменений этого показателя при ОНГМ.

Таким образом, альбумины крови отражают индивидуальную, отличную от наблюдаемой у интактных животных реакцию при действии эдематозного фактора.

Действие эдематозного фактора также приводит к достоверному увеличению содержания фракции глобулинов крови (см. табл. 2). Семидневная травма по сравнению с токсическим фактором вызывает более значительные отклонения этих показателей ($p < 0,001$). Как показал анализ кривой распределения вариант, рост содержания

Таблица 3

Изменения коэффициента альбумины/глобулины для белков сыворотки крови при развитии ОНГМ

Статистический показатель	Интактные животные	ОНГМ	
		токсический	травматический
<i>X</i>	0,739237	0,552979	0,339013
<i>m</i>	0,00803516	0,00283736	0,00840583
<i>As</i>	0,229884	0,218795	0,336736
<i>T_{As}</i>	0,374094	0,356048	0,547974
<i>EX</i>	—0,237968	—0,941922	—1,04103
<i>T_{EX}</i>	0,178353	0,706009	0,780238
<i>CV, %</i>	3,43725	1,62258	7,84086
<i>Cs, %</i>	1,08695	0,513105	2,4795

этих фракций при развитии ОНГМ следует интерпретировать как истинный, а не обусловленный перераспределением процентных отношений.

CV позволяет оценить возможности исследуемой системы белков крови. При развитии травматического ОНГМ нарастает вариабельность показателей фракций крови, а при действии токсического фактора идет уменьшение этого показателя (см. табл. 2).

Полученные результаты анализа позволяют считать, что при токсическом ОНГМ происходит, хотя и незначительное, уменьшение числа степеней свободы, а при семидневной компрессии — их возрастание.

Следовательно, система, оставаясь жестко детерминированной, при травматическом ОНГМ к 7-му дню компрессии активирует адаптогенные механизмы. При действии токсического фактора она менее защищена от разрушения. Более устойчива подсистема γ -глобулинов, где колебания носят менее интенсивный характер.

Одним из важных интегральных показателей системы крови является коэффициент соотношения альбумины/глобулины. При действии эдематозных факторов (табл. 3) происходит достоверное и закономерное снижение указанного соотношения. Этот процесс более значительно выражен при семидневной компрессии.

При практически равновеликой степени асимметрии кривая вариант становится еще более плоской при действии патогенных факторов. Таким образом, коэффициент соотношения альбумины/глобулины характеризует переход системы белков крови в качественно новое состояние.

Развитие токсического ОНГМ сопровождается снижением числа степеней свободы изучаемой системы. В то же время при семидневной компрессии мозга система, оставаясь жестко детерминированной, приобретает большие возможности функционирования.

При развитии ОНГМ отмечается повышение влажности нервной ткани, увеличение в мозге количества натрия [7]. Изменения фракции альбуминов под действием эдематозного фактора могут быть патогенетически важными в процессе формирования ОНГМ.

Уменьшение содержания альбуминов в сыворотке крови ведет к гемодинамическим нарушениям и гипоксии, что нашло подтверждение в ранее проведенных морфологических исследованиях: при ОНГМ на гистологических срезах отмечены характерные изменения в сосудах капиллярного и прекапиллярного типов [4].

На основании проведенных исследований содержания α -глобулинов в сыворотке крови можно считать, что семидневная компрессия вызывает более тяжелый патогенетический процесс, чем токсический ОНГМ. Кроме того, отмечено достоверное нарастание при действии эдематозного фактора фракции глобулинов. Проведенными ранее на этих моделях морфологическими исследованиями показано участие иммунной системы в формировании ОНГМ [4].

Таким образом, белки крови не только отражают состояние патологического процесса, но и участвуют в формировании ОНГМ. При действии эдематозных факторов наблюдается качественно однотипная реакция на патогенный агент. При действии травмирующего фактора выявлены более глубокие нарушения, чем при токсическом ОНГМ.

ЛИТЕРАТУРА

1. Карпюк С. А. // Лаб. дело. — 1962. — № 7. — С. 33—36.
2. Лабораторные животные / Западнюк И. П., Западнюк В. И., Захария Е. А. и др. — Киев, 1983.
3. Отек головного мозга / Под ред. Г. И. Мchedlishvili. — Тбилиси, 1986.
4. Платонов И. А. и др. Морфологические изменения при фармакологической коррекции отека — набухания головного мозга. — М., 1982.
5. Урбах В. Ю. Статистический анализ в биологических и медицинских исследованиях. — М., 1975.
6. Храмов В. А., Пустовойтова О. И. // Лаб. дело. — 1967. — № 12. — С. 711—713.
7. Шеввага В. И. // Врач. дело. — 1981. — № 11. — С. 95—99.
8. Gaab M. et al. // J. Neurol. — 1979. — Vol. 220. — P. 185—197.
9. Laborit H., Weber B. // Agressologie. — 1965. — Vol. 6, N 6. — P. 743—759.
10. Levine S., Torrlu M. // Exp. Neurol. — 1977. — Vol. 56, N 2. — P. 361—369.

Поступила 23.07.91

INFLUENCE OF EDEMATOUS FACTORS ON THE SYSTEM OF BLOOD PROTEINS IN BRAIN EDEMA AND SWELLING

I. A. Platonov

Medical Institute, Smolensk

Initial abnormalities develop in nervous tissue during brain swelling and edema. Toxic and traumatic forms of brain swelling and edema were simulated in rats. The content of total protein as well as albumin and globulin fractions were estimated in blood serum. The alterations in the levels of serum protein fractions in brain swelling and edema were essential in the development of the impairment.

Н. Н. Войтенко

МОНОАМИНОКСИДАЗЫ МОЗГА ПРИ СТАРЕНИИ ДИКИХ СЕРЫХ КРЫС, СЕЛЕКЦИОНИРОВАННЫХ НА ОТСУТСТВИЕ АГРЕССИВНОГО ПОВЕДЕНИЯ ПО ОТНОШЕНИЮ К ЧЕЛОВЕКУ

Институт цитологии и генетики Сибирского отделения РАН, Новосибирск

Влияние старения на моноаминоксидазы [(MAO) амин: кислород оксидоредуктаза (дезаминирующая) (содержащая флаavin) КФ 1.4.3.4] мозга изучалось на лабораторных животных и человеке [19, 24]. Дикie животные, подверженные в природе стабилизирующему отбору, а также дикie животные, подверженные дестабилизирующему отбору в неволе, например при селекции на отсутствие агрессии по отношению к человеку (доместикация) [18], оставались вне внимания исследователей. Влияние селекции по поведению на старение MAO мозга интересно тем, что доместикация животных, как показано ранее [9, 12], сопровождается повышением в определенных областях головного мозга содержания серотонина, субстрата MAO типа А, и понижением уровня дофамина (ДА), общего субстрата MAO типов А и Б [22]. При доместикации у серебристо-черных лисиц наряду с повышением уровня серотонина в гипоталамусе и гиппокампе [12] наблюдалось понижение активности MAO типов А и Б в стволе головного мозга в силу измененного количества активных ее форм [1, 2]. К MAO типа Б особый интерес проявлен геронтологами [6], поскольку с повышением ее активности при старении связывают возникновение ДА-дефицитного состояния, снижение половой активности и продолжительности жизни. Показано, что понижение активности MAO типа Б ее избирательным ингибитором депренилом препятствовало проявлению ДА-дефицитного состояния, способствовало prolongации половой активности и длительности жизни [21].

Повышается ли при старении активность MAO типа Б в мозгу диких серых крыс (пасюков) так же, как и у лабораторных животных и человека, как влияет селекция на доместикацию на возрастные изменения активности MAO типов А и Б мозга, до сих пор не изучалось и поэтому стало предметом настоящего исследования.

Методика. Изучали самцов диких серых крыс двух возрастных групп: относительно молодых в возрасте 4 мес и в начальный период старения в возрасте 7 мес [8, 13, 23]. В каждой возрастной группе были животные, селекционированные на отсутствие агрессии по отношению к человеку (ручные; 35–36 поколений селекции) и животные, у которых агрессивно-оборонительное поведение по отношению к человеку поддерживали отбором такое же число поколений (агрессивные). Кроме того, изучали неселекционированных диких серых крыс, размножавшихся в виварии после отлова их из мест естественного обитания. За 2 дня до опыта животных рассаживали в индивидуальные клетки для снятия зоосоциальных влияний на активность MAO мозга. Животные находились при естественном освещении, свободном доступе к воде и корму.

Таблица 1

Влияние старения на активность MAO типа Б (в нмоль аммиака на 1 мг белка за 1 мин) мозга диких серых крыс, селекционированных по реакции на человека

Группа животных	Возраст животных, мес	
	4	7
<i>Ствол</i>		
Дикие	215±0,29 (6)	8,47±0,60** (8)
Агрессивные	1,88±0,29 (6)	7,35±0,74** (7)
Ручные	1,22±0,17* (5)	9,15±1,68** (8)
<i>Полушария</i>		
Дикие	1,85±0,15 (6)	4,49±0,51** (8)
Агрессивные	1,94±0,24 (6)	4,44±0,23** (8)
Ручные	1,88±0,31 (6)	3,46±0,26** (8)

Примечание. Одна звездочка — $p < 0,05$ по сравнению с дикими, две — $p < 0,05$ по сравнению с 4-месячными животными. Здесь и в табл. 2 в скобках — число животных.

После быстрой декапитации (14 ч) и выделения головного мозга последний делили на ствол и полушария. Методом дифференциального центрифугирования выделяли неразделенную фракцию митохондрий P_2 , содержащую MAO. Инкубировали препараты MAO в калий-натрий-фосфатном буфере pH 8,5 в течение 30 мин при 37 °C, свободном доступе воздуха, встряхивании в водяном термостате [7]. В качестве специфических субстратов использовали серотонин (MAO А) и бензиламин (MAO Б) в концентрации 1 мМ. Для определения содержания аммиака, образованного в процессе деаминации серотонина и бензиламина, применяли изотермическую отгонку [14] с последующей ниселеризацией и измерением оптической плотности при 410 нм. Активность MAO выражали в пикомолях аммиака на 1 мг белка за 1 мин. Белок определяли по Лоури. Данные обрабатывали статистически с применением критерия t Стьюдента.

Результаты и обсуждение. Полученные данные свидетельствуют о том, что у диких серых крыс в возрасте 7 мес активность MAO типа Б существенно выше, чем у 4-месячных, как в стволе, так и в полушариях головного мозга (табл. 1). Причем в стволе мозга у диких серых крыс это повышение было более выражено, чем в полушариях. Активность MAO типа А у 4- и 7-месячных животных существенно не различалась ни в стволе, ни в полушариях мозга (табл. 2). Отношение активности MAO А к активности MAO Б (MAO А/MAO Б) у 4-месячных диких серых крыс в стволе и в полушариях мозга приближалась к 2, т. е. было смещено в сторону MAO типа А (табл. 3). У 7-месячных животных отношение MAO А/MAO Б было уже иным: в полушариях оно приближалось к 1, а в стволе было даже ниже 1 за счет возросшей активности MAO типа Б (см. табл. 3).

Таблица 2

Влияние старения на активность MAO типа А (в нмоль аммиака на 1 мг белка за 1 мин) мозга диких серых крыс, селекционированных по реакции на человека

Группа животных	Возраст животных, мес	
	4	7
<i>Ствол</i>		
Дикие	4,19±0,47 (6)	4,47±0,50
Агрессивные	3,49±0,31 (6)	4,68±0,61 (7)
Ручные	3,76±0,41 (6)	3,64±0,53 (7)
<i>Полушария</i>		
Дикие	3,28±0,24 (6)	4,01±0,32 (8)
Агрессивные	3,44±0,37 (6)	4,39±0,53 (8)
Ручные	3,16±0,30 (6)	3,73±0,19 (8)

Таблица 3

Влияние старения на отношение МАО А/МАО Б в мозгу диких серых крыс, селекционированных по реакции на человека

Возраст, мес	Дикие		Агрессивные		Ручные	
	ствол	полушария	ствол	полушария	ствол	полушария
4	1,95	1,77	1,85	1,77	3,00	1,68
7	0,52	0,89	0,63	0,98	0,39	1,08

У 4- и 7-месячных агрессивных животных по сравнению с дикими соответствующего возраста активность МАО типа Б была сходной как в стволе, так и в полушариях головного мозга (см. табл. 1). У 7-месячных агрессивных крыс, как и у 7-месячных диких крыс, активность МАО типа Б была выше, чем у 4-месячных, в стволе и полушариях головного мозга (см. табл. 1). Активность МАО типа А у агрессивных крыс не отличалась от активности МАО типа А диких крыс ни в одной из возрастных групп ни в стволе, ни в полушариях головного мозга (см. табл. 2). Отношение МАО А/МАО Б у 4-месячных агрессивных крыс было выше 1, приближаясь к 2, как и у диких крыс, в стволе и в полушариях мозга (см. табл. 3). Отношение МАО А/МАО Б у 7-месячных агрессивных крыс по сравнению с таковым у 4-месячных снижалось в стволе почти втрое, а в полушариях почти вдвое за счет повышенной активности МАО типа Б и существенно не отличалось от диких.

Ручные серые крысы в возрасте 4 мес по сравнению с дикими в соответствующем возрасте характеризовались существенным понижением активности МАО типа Б в стволе мозга (см. табл. 1). Но в 7-месячном возрасте активность МАО типа Б повышалась как у ручных, так и у диких серых крыс, и различие в активности МАО типа Б между ручными и дикими животными исчезало (см. табл. 1). Активность МАО типа А у ручных серых крыс не изменялась под влиянием возраста (см. табл. 2) и не отличалась от таковой у диких. Отношение МАО А/МАО Б в стволе мозга у 4-месячных ручных серых крыс достигало 3 за счет сниженной активности МАО типа Б (см. табл. 3). У 7-месячных ручных серых крыс в результате повышения активности МАО типа Б это отношение становилось меньше 1. В полушариях мозга ручных серых крыс таких резких различий в отношении МАО А/МАО Б между 4- и 7-месячными ручными серыми крысами не наблюдалось (см. табл. 3).

В настоящей работе установлено, что у диких серых крыс активность МАО типов А и Б в стволе и полушариях мозга сходна с таковой у описанных ранее лабораторных животных и человека [3, 19, 24]. У диких серых крыс в возрасте 7 мес, т. е. в начальный период старения, в стволе и полушариях мозга наблюдалось повышение активности МАО типа Б, как и у крыс линии Вистар при старении [3]. Можно предположить, что у диких серых крыс наряду с повышением количества фермента за счет роста числа глиальных клеток, содержащих МАО типа Б, при старении происходят изменения в молекулярных механизмах, регулирующих активность МАО типа Б, как это было обнаружено нами у крыс Вистар [3]. Активность МАО типа А у диких серых крыс в на-

чальный период старения оставалась неизменной. Не исключено, что у этих животных в возрасте 7 мес МАО типа А еще не подвергается трансформации под влиянием перекисленных липидов мембран [5] в такой мере, чтобы вносить существенный вклад в понижение ее активности. Поэтому рассогласование в работе МАО мозга, о котором судили по изменению отношения МАО А/МАО Б как в стволе, так и в полушариях мозга стареющих животных, зависит от колебаний активности МАО типа Б. Такая особенность МАО типа Б исследованных крыс даст возможность вычленить влияние изменения активности МАО типа Б на физиологические функции, в частности на репродуктивную, при старении.

Известно, что при старении наряду с повышением активности МАО типа Б в мозгу [24] наблюдается снижение уровня ДА [20], одного из субстратов МАО типа Б, и этим создается состояние дефицита ДА. Появляющийся при старении дефицит ДА, вероятно, может служить одной из причин ослабления половой активности [21]. В этой связи сведения, полученные нами в эксперименте с селекцией серых крыс на домостикационный тип поведения, представляют особый интерес, поскольку у молодых, селекционированных на отсутствие агрессии по отношению к человеку ручных крыс 4-месячного возраста обнаружены пониженная активность МАО типа Б в стволе головного мозга и резкий сдвиг отношения МАО А/МАО Б в сторону МАО А. Одновременно с этим у ручных серых крыс [15—17] в этом возрасте обнаружена реорганизация эндокринной и репродуктивной функций гонад, которая проявлялась в менее выраженном снижении уровня тестостерона в крови и интенсивности размножения в осенне-зимнем сезоне, а также в ускорении полового созревания. Сочетание более выраженной активности половой функции [10, 11] со сдвигом отношения МАО А/МАО Б в полушариях мозга в сторону МАО А наблюдалось также у мышей линии А/Не по сравнению с мышами других генотипов [4]. Можно думать, что сдвиг отношения МАО А/МАО Б в сторону МАО А как у мышей линии А/Не, так и у ручных серых крыс, находится в причинно-следственной связи с более активной половой функцией. Какие молекулярные механизмы регуляции активности МАО типа Б у ручных серых крыс попали под дестабилизирующий отбор на домостикационное поведение, не известно, но в аналогичном эксперименте на серебристо-черных лисицах показано, что домостикация лисиц сопровождалась более низкой $V_{\text{макс}}$ окисления бензиламина МАО типа Б при неизменной K_m [1, 2]. Не исключено, что именно с такой особенностью в регуляции активности МАО типа Б связаны особенности половой функции у домостигированных относительно молодых 4-месячных серых крыс.

В начальном периоде старения, в возрасте 7 мес, у всех серых крыс вне зависимости от характера оборонительного поведения по отношению к человеку активность МАО типа Б повышалась как в стволе, так и в полушариях головного мозга без существенных изменений активности МАО типа А. Причем активность МАО типа Б была сходной с таковой у серых крыс диких, агрессивных, ручных, т. е. различия в активности МАО типа Б

между ручными и дикими животными к началу старения исчезали. Отношение МАО А/МАО Б у 7-месячных ручных и диких серых крыс становилось ниже 1 и было смещено в сторону МАО типа Б. Хотя старение половой функции ручных и агрессивных серых крыс никем не сравнивалось, однако, судя по выровненной активности МАО типа Б в стволе мозга и одинаково низком и смещенном в сторону МАО типа Б отношении МАО А/МАО Б у 7-месячных животных, можно думать, что в этом возрасте различий в репродуктивной и эндокринной функции гонад у ручных, агрессивных и диких серых крыс может уже не быть.

Таким образом, у молодых 4-месячных серых крыс обнаружена пониженная активность МАО типа Б в стволе головного мозга по сравнению с таковой у серых крыс соответствующего возраста. Однако найденное различие в активности МАО типа Б исчезало в 7-месячном возрасте, т. е. в начальном периоде старения. Можно думать, что при старении стираются различия между ручными и дикими серыми крысами в МАО Б-зависимых физиологических функциях, включая половую.

BRAIN MONOAMINE OXIDASE IN OLD NORWAY RATS SELECTED FOR ABSENCE OF AGGRESSIVE BEHAVIOR TOWARDS MEN

N. N. Voitenko

Institute of Cytology and Genetics, Siberian Branch of the Academy of Sciences of the Russian Federation, Novosibirsk

Monoamine oxidase A and B (MAO A; MAO B) activity was studied in the brain stem and hemispheres of young (4 months) and old (7 months) wild Norway rats of S₃₅-S₃₆ bred for absence of aggressive reactions to men (tame), bred for pronounced aggressive reaction for the same number of generations (aggressive), and those not undergoing any breeding (wild). In young tame rats MAO B activity was lower than in wild ones of the same age. As the animals grew older, in 7 months, MAO B activity increased in the brain stem and hemispheres of all the rats, irrespectively of the type of behavior. Difference in MAO B activity found between tame and wild 4-month rats disappeared at the age of 7 months. MAO A activity did not change either with ageing or due to breeding for behavior.

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 1993

УДК 616.13-004.6-092.9-06:616.153.915-39-085.31:547.295].015.2:615.272.4.014.425

А. Г. Сдвигова, О. М. Панасенко,
И. В. Лукьященко, В. И. Сергиенко, Ю. М. Попухин

КОРРЕКЦИЯ ПОЛИНЕНАСЫЩЕННЫМИ ЖИРНЫМИ КИСЛОТАМИ В КОМПЛЕКСЕ С АНТИОКСИДАНТАМИ ПЕРЕКИСНОГО ОКИСЛЕНИЯ ЛИПОПРОТЕИНОВ ПРИ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОМ АТЕРОСКЛЕРОЗЕ

НИИ физико-химической медицины Минздрава РФ, Москва

Перспективным направлением в лечении атеросклероза является создание комбинированных препаратов, в состав которых входят полиненасыщенные жирные кислоты (ПНЖК), содержащиеся в растительных маслах. Показано, что диета, обогащенная ПНЖК, оказывает положительное влияние на липидный состав крови: уменьшается содержание общего холестерина, триглицеридов, апо-В-содержащих липопротеинов (апо-В-ЛП) [4, 16, 20]. Применение ПНЖК оказывает благоприятное влияние на функциональное состояние тромбоцитов при ишемической болезни сердца [4]. Вместе с тем использование диеты, обогащенной ПНЖК, сопровождалось увеличением уровня липоперекисей в печени и сыворотке крови у экспериментальных животных [16]. Этого и следовало ожидать, поскольку именно ПНЖК являются эффективным субстратом перекисного окисления липидов (ПОЛ) [1]. Важно отметить, что ПОЛ, как правило, активируется при атеросклерозе [1, 3, 15] и протекает в присутствии, а возможно, и с участием ЛП, являющихся основной транспортной формой липидов в крови. Существует гипотеза, согласно которой появление в крови ЛП, модифицированных в результате ПОЛ, является фактором риска возникновения атеросклероза, поскольку это приводит к нарушению липид-транспортной функции ЛП и аккумуляции холестерина в клетках сосудистой стенки [2, 9—11]. Механизм появления окисленных ЛП

ЛИТЕРАТУРА

1. Войтенко Н. Н. // Докл. АН СССР.— 1980.— Т. 252, № 1.— С. 245—248.
2. Войтенко Н. Н. // Изв. Сиб. отд. АН СССР. Сер. биол. наук.— 1985.— № 3.— С. 114—119.
3. Войтенко Н. Н., Попова Н. К. // Вопр. мед. химии.— 1991.— № 4.— С. 28—30.
4. Войтенко Н. Н. // Там же.— 1991.— № 3.— С. 21—24.
5. Горкин В. З. Молекулярные и клеточные механизмы старения.— Киев, 1981.— С. 151—158.
6. Горкин В. З. // Пат. физиол.— 1988.— № 2.— С. 89—93.
7. Горкин В. З., Вережкина И. В., Гриндева Л. И. и др. // Современные методы в биохимии.— М., 1968.— Т. 2.— С. 155—172.
8. Козлова А. И. // Зоол. журн. СССР.— 1981.— Т. 60, № 4.— С. 587—594.
9. Никулина Э. М., Бородин П. М., Попова Н. К. // Журн. выпш. нервн. деят.— 1985.— № 4.— С. 703—709.
10. Осадчук А. В., Науменко Е. В. // Докл. АН СССР.— 1981.— Т. 258, № 3.— С. 746—749.
11. Осадчук А. В., Науменко Е. В. // Там же.— Т. 261, № 5.— С. 1238—1241.
12. Попова Н. К., Войтенко Н. Н., Трут Л. Н. // Там же.— 1975.— Т. 223, № 6.— С. 1498—1500.
13. Самарский С. Л., Картель М. В. // Серая крыса.— М., 1986.— Т. 1.— С. 129—139.
14. Силакова А. И., Труш Г. П., Являкова А. // Вопр. мед. химии.— 1962.— № 2.— С. 538—545.
15. Шишкина Г. Т., Бородин П. М. // Журн. эволюц. биохим.— 1986.— Т. 22, № 2.— С. 157—161.
16. Шишкина Г. Т., Бородин П. М. // Физиол. журн. СССР.— 1986.— Т. 72, № 7.— С. 992—995.
17. Шишкина Г. Т., Бородин П. М. // Изв. Сиб. отд. АН СССР.— Сер. биол. наук.— 1989.— № 1.— С. 93—96.
18. Belyaev D. K. // J. Hered.— 1979.— Vol. 70.— P. 301—308.
19. Fowler C. J., Wiberg A., Orelund L. et al. // J. Neurol. Transmiss.— 1980.— Vol. 49.— P. 1—20.
20. Godefroy F., Bossant M. H., Weil-Fugazza J., Lamour Y. // Neurobiol. Aging.— 1989.— Vol. 10, N 2.— P. 187—190.
21. Knoll J. // Strategy in Drug Research.— Amsterdam, 1982.— P. 107—135.
22. Nikulina E. M., Avgustinovich D. F., Popova N. K. // Aggress. Behav.— 1991.— Vol. 304, N 1.— P. 183—187.
23. Matsumoto R. R., Bomen W. D., Walker J. M. // Brain Res.— 1989.— Vol. 504, N 1.— P. 145—148.
24. Strolin Benedetti M., Distert Ph. // Biochem. Pharmacol.— 1989.— Vol. 38, N 4.— P. 555—561.

Поступила 14.11.91

в крови остается до сих пор невыясненным. Есть все основания предполагать, что ПОЛ при атеросклерозе способен вмешиваться в изменение физико-химических свойств ЛП еще на стадии их синтеза в гепатоцитах, так как известно, что экспериментальный атеросклероз сопровождается накоплением липоперекисей в печени [19].

Целью настоящей работы явилось выяснение возможного воздействия ПОЛ на ЛП, секретируемые печенью экспериментальных животных, а также исследование влияния диеты, обогащенной ПНЖК в составе кукурузного масла в комплексе с антиоксидантами, на развитие атеросклеротического поражения аорты, процессов ПОЛ в крови и ЛП, секретируемых клетками печени при экспериментальной гиперхолестеринемии.

В качестве антиоксидантных добавок использовали α -токоферол — известный липидорастворимый природный антиоксидант, а также легко-растворимый в воде тушитель сиглетного кислот — карнозин [12], эффективно применяемый при лечении различных воспалительных заболеваний, которые сопровождаются активацией ПОЛ [13].

Методика. Работа проводилась на 23 кроликах обоего пола массой 3—4 кг в возрасте 9—10 мес. Ежедневно в течение 12 нед животные получали 0,25 г/кг холестерина в смеси с канустой по методике Ся-Жень-И. После отмены атерогенной диеты животных переводили на обычный корм сроком на 4 нед (период регрессии). После окончания периода регрессии у кроликов в сыворотке определяли уровень общего холестерина на автоанализаторе «Centrifichem-400» (США), а также концентрацию продуктов ПОЛ, реагирующих с 2-тиобарбитуровой кислотой (ТБК) в сыворотке, и изолированных из нее апо-В-ЛП. Апо-В-ЛП получали из сыворотки методом седиментации в присутствии гепарина и Mn^{2+} [14].

Далее животных распределяли на три равноценные (по уровню холестерина в сыворотке) группы. Животные 1-й группы (7 кроликов) ежедневно в течение 30 дней получали по 2 мл/кг кукурузного масла, содержащего 123 мг % α -токоферола. Прозрачное кукурузное масло было получено из НПО «Жиры», Санкт-Петербург. Технохимические показатели масла соответствовали ГОСТу и приведены в табл. 1. 2-я группа (7 кроликов) ежедневно в течение 30 дней получала по 2 мл/кг того же масла с добавкой карнозина 50 мг/кг. Кролики 3-й группы (9 животных) находились на обычной диете.

По окончании 30-дневного курса лечения вновь в сыворотке всех кроликов определяли содержание холестерина и ТБК-активных продуктов, а также ТБК-активных продуктов в изолированных апо-В-ЛП. Каждую из групп разбивали на 2 подгруппы. Одну подгруппу использовали для определения содержания в печени продуктов окисления липидов, реагирующих с ТБК, а вторую — для осуществления перфузии печени.

Перфузию печени проводили по следующей методике [6]. Кролику под внутривенным наркозом (калипсол) делали срединную лапаротомию, которую дополняли двумя косыми разрезами в правом и левом подреберьях. Печень из брюшной полости не выделяли. Канюлировали воротную вену выше впадения в нее верхнебрыжеечной вены, последнюю перевя-

зывали. Также перевязывали селезеночную вену. В печеночно-двенадцатиперстной связке выделяли желчевыводящий проток и печеночную артерию, которые перевязывали. Канюлировали нижнюю полую вену выше впадения в нее почечных вен (почечные вены и мелкие вены, впадающие в нижнюю полую вену, лигировали). В месте прохождения нижней полую вену через диафрагму на нее накладывали зажим. Перфузию проводили по замкнутому контуру при температуре 38 °С раствором Хенкса pH 7,4 в течение 30 мин, предварительно осуществляя отмывку печени от крови в аналогичных условиях (5 мин). Общий объем перфузата 150 мл; перфузат постоянно оксигенировался. Скорость подачи перфузата 25—30 мл/мин.

После окончания перфузии в перфузат добавляли ЭДТА и бутилированный гидрокситолуол (ионол) до концентрации $5 \cdot 10^{-4}$ М и 10^{-4} М соответственно с целью предотвратить возможное окисление липидов в дальнейшем. В перфузате определяли содержание белка [18] и продуктов окисления липидов, реагирующих с ТБК. Часть перфузата использовали для выделения из него фракций ЛП. Для этого в перфузате растворяли кристаллический NaBr, повышая его плотность до 1,065 г/см³. Далее смесь центрифугировали при 6 °С в течение 20 ч при 120 000 г. При этом флотировала фракция ЛП с плотностью менее 1,065 г/см³ [17]. Сверху из пробирки отбирали 1 мл этой фракции и определяли в ней белок [18] и ТБК-реактивные продукты. Методом электрофореза в 0,5 % геле агарозы было показано, что эта фракция содержала секретируемые печенью ЛП очень низкой плотности, но не ЛП высокой плотности, которые в данных условиях не флотируют, так как имеют плотность более 1,065 г/см³ [17]. Присутствие ЛП низкой плотности обнаружено не было.

У всех подопытных кроликов проводили морфометрию аорты [8]. В качестве контроля (4-я группа) служили интактные кролики, содержащиеся в течение эксперимента на обычной диете.

Для определения продуктов ПОЛ, реагирующих с ТБК, к 200—400 мкл сыворотки (или суспензии ЛП, или гомогената печени) добавляли 3 мл 1 % H_2PO_4 (содержащей 5×10^{-4} М ЭДТА), 1 мл 0,5 % ТБК. Смесь инкубировали 45 мин при 100 °С. После охлаждения прибавляли 4 мл н-бутанола и тщательно встряхивали. Для разделения фаз смесь центрифугировали 15 мин при 2000 g. Затем в верхней бутанольной фазе на спектрофотометре DU-7 («Beckman», США) определяли оптическую плотность при 532 нм, используя в качестве базовых точки спектра при 515 и 550 нм [5].

Содержание ТБК-реактивных продуктов выражали в микромолях малонового диальдегида (МДА). Коэффициент экстинкции для комплекса МДА — ТБК принимали равным $1,56 \times 10^5$ М⁻¹ см⁻¹ [1].

Результаты и их обсуждение. Результаты исследования приведены в табл. 2 и 3. Очевидно, что содержание кроликов на атерогенной диете приводит к выраженной гиперхолестеринемии. Экспериментальный атеросклероз сопровождается увеличением продуктов ПОЛ, реагирующих с ТБК, в сыворотке крови приблизительно в 2 раза и особенно в изолированной фракции апо-В-ЛП (примерно в 60 раз по сравнению с интактными животными). В период лечения у кроликов 3-й группы (которые в это время содержались на обычной диете) снижается уровень общего холестерина в сыворотке и ТБК-реактивных продуктов во фракции ЛП, изолированных из сыворотки (см. табл. 2). Вероятно, это связано с тем, что в период регрессии и лечения происходит отложение липидов (главным образом холестерина) и продуктов их окисления в сосудистой стенке. Морфометрические исследования показали, что при этом $52,9 \pm 19,9$ % поверхности аорты претерпевают атеросклеротические изменения. Как свидетельствуют результаты, представленные в табл. 3, гиперхолестеринемия приводит к тому, что в гомогенате печени увеличивается содержание продуктов ПОЛ (3-я группа). Одна из важнейших функций печени — синтез и секреция ЛП очень низкой плотности. Если

Таблица 1

Основные технохимические показатели использованного кукурузного масла

Показатель	Количественная характеристика
Кислотное число, мг КОН/г	0,3
Массовая доля фосфорсодержащих веществ, в % в пересчете на P_2O_5	0,004
Перекисное число, % I_2	0,16
Содержание токоферолов, %	0,123
Содержание стеролов, %	1,11

Влияние диеты, обогащенной ПНЖК в составе кукурузного масла в комплексе с антиоксидантами, на содержание холестерина в сыворотке, степень поражения аорты, уровень продуктов ПОЛ в сыворотке и апо-В-ЛП при экспериментальном атеросклерозе

Группа животных	ХС, мг%		Степень поражения аорты в %	МДЛ, мкм			
	А	Б		сыворотка		апо-В-ЛП	
				А	Б	А	Б
1-я (масло+α-токоферол)	835±40**	145±45**	4,8±0,5**	0,64±0,22*	0,30±0,04	0,81±0,19*	0,012±0,006
2-я (масло+α-токоферол+карнозин)	890±30**	194±99**	12,1±7,6**	0,46±0,15*	0,16±0,04	0,88±0,34*	0,008±0,004
3-я (контроль)	920±50**	491±117**	52,9±19,9	0,57±0,05*	0,74±0,15*	0,72±0,28*	0,067±0,008*
4-я (интактные кролики)	50±10	—	—	0,29±0,05	—	0,012±0,006	—

Примечание. ХС — холестерин, А — до лечения, Б — после окончания лечения. Одна звездочка — $p < 0,05$ по сравнению с интактными кроликами, две — $p < 0,01$ по сравнению с интактными кроликами или с контрольной группой в случае поражения аорты.

при гиперхолестеринемии активируются процессы ПОЛ в печени, то гепатоциты могут секретировать ЛП с повышенным содержанием липоперексидов.

Для выяснения этого вопроса мы перфузировали печень подопытных кроликов, определяли в перфузате, а также в изолированной из него фракции ЛП ($d < 1,065$ г/см³) содержание ТБК-реактивных продуктов. Из табл. 3 следует, что в перфузате кроликов с алиментарным атеросклерозом (3-я группа) содержание продуктов ПОЛ примерно в 3 раза выше, чем в перфузате интактных кроликов (4-я группа). Анализ содержания продуктов ПОЛ в изолированных из перфузата фракциях ЛП показал, что кролики с экспериментальным атеросклерозом содержат в ЛП ($d < 1,065$ г/см³), секретируемых печенью, примерно в 2 раза больше продуктов ПОЛ, чем интактные кролики.

Применение 30-дневного курса диеты, включающей 2 мл/кг кукурузного масла, в состав которого входит 123 мг % α-токоферола (кролики 1-й группы), приводило к достоверному снижению примерно в 6 раз уровня холестерина в сыворотке, тогда как у кроликов 3-й (контрольной группы) наблюдалось снижение холестерина приблизительно только в 2 раза. При этом у кроликов 1-й группы примерно в 2 раза снижалось содержание ТБК-реактивных продуктов в сыворотке и примерно в 60 раз в апо-В-ЛП (см. табл. 2). У кроликов 3-й группы наблюдали даже некоторое увеличение содержания ТБК-реактивных продуктов в сыворотке, а в ЛП продукты ПОЛ снижались примерно лишь в 10 раз. И-

интересно, что в гомогенате печени кроликов 1-й группы уровень ТБК-реактивных продуктов был снижен в 2,8 раза по сравнению с контрольными кроликами 3-й группы (см. табл. 3). Диета, содержащая кукурузное масло в комплексе с α-токоферолом, приводила к тому, что в перфузате уровень ПОЛ не отличался от такового у интактных кроликов, а в ЛП, изолированных из перфузата, он был примерно в 2 раза ниже, чем даже у интактных кроликов (см. табл. 3). Важно отметить, что, как показал морфометрический анализ, у кроликов 1-й группы было поражено лишь 4,8±0,5 % площади аорты, в то время как у контрольных кроликов 3-й группы 52,9±19,9 % (см. табл. 2).

Кроликов 2-й группы содержали в течение 30 дней на диете, включающей 2 мл/кг кукурузного масла (в состав которого входило 123 мг % α-токоферола) и 50 мг/кг карнозина. Из табл. 2 видно, что введение в диету карнозина не вызывало более выраженного снижения уровня холестерина в сыворотке крови. Морфометрический анализ показал, что площадь поражения аорты кроликов 2-й группы достоверно не отличалась от таковой у кроликов 1-й группы (см. табл. 2). Однако, как следует из табл. 2, карнозин вызывал выраженное снижение продуктов ПОЛ в сыворотке и апо-В-ЛП (см. табл. 2, 1-я и 2-я группы). Присутствие карнозина в диете приводило к тому, что в гомогенате печени, перфузате и ЛП, изолированных из перфузата, содержание продуктов ПОЛ было несколько ниже, чем у кроликов 1-й группы, в рационе которых не было добавки карнозина (см. табл. 3). Вероятно, это связано с тем, что водорастворимый карнозин способен перехватывать свободные радикалы в водной фазе (кислородные радикалы), а липидорастворимый α-токоферол — в липидной фазе (липидные радикалы).

Полученные в настоящей работе результаты свидетельствуют о том, что диета, обогащенная ПНЖК в составе кукурузного масла, дает гипохолестеринемический эффект, вероятно, благодаря известному свойству увеличивать экскрецию холестерина [7]. Более того, содержание животных с экспериментальным атеросклерозом на диете с добавкой кукурузного масла приводит к сокращению площади поражения аорты примерно в 10 раз. При этом не обнаружено увеличения уровня липоперексидов в сыворотке и в гомогенате

Таблица 3

Влияние диеты, обогащенной ПНЖК в составе кукурузного масла в комплексе с антиоксидантами, на содержание продуктов ПОЛ в гомогенате печени, перфузате и изолированной из него фракции ЛП ($d < 1,065$ г/см³) при экспериментальном атеросклерозе

Группа животных	Гомогенат печени, ммоль МДЛ/г влажной ткани	Перфузат, ммоль МДЛ/г белка	ЛП, ммоль МДЛ/г белка
1-я (масло+α-токоферол)	3,24±0,45*	4,3±2,1**	28,5±2,8**
2-я (масло+α-токоферол+карнозин)	2,84±0,85*	1,4±0,4**	20,8±6,9**
3-я (контроль)	8,93±2,06	14,0±6,2	108,9±10,6
4-я (интактные кролики)	5,80±0,45**	4,8±3,4**	53,5±24,2**

Примечание. Одна звездочка — $p < 0,01$ по сравнению с контролем, две — $p < 0,05$ по сравнению с контролем.

печени, как было показано в работе [16]. Используемая нами диета вызывала достоверное снижение продуктов ПОЛ в сыворотке и особенно в апо-В-ЛП. Возможно это связано с тем, что в состав кукурузного масла входил эффективный природный антиоксидант α -токоферол (2,5 мг/кг).

Экспериментальный атеросклероз, как показали наши исследования, сопровождается повышением содержания продуктов ПОЛ в печени, а также ЛП, секретируемых гепатоцитами. Присутствие в диете антиоксидантов (α -токоферола и карнозина) вызывало достоверное снижение уровня продуктов ПОЛ как в гомогенате печени, так и в ЛП, изолированных из перфузата. Это позволяет заключить, во-первых, что ПОЛ при атеросклерозе способно вмешиваться в изменение физико-химических свойств ЛП еще на стадии их синтеза и секреции гепатоцитами, а во-вторых, диета, обогащенная ПНЖК в комплексе с антиоксидантами, не только способствует снижению продуктов ПОЛ в сыворотке и ЛП, но и предотвращает их окисление в процессе синтеза в печени.

Таким образом, применение ПНЖК в составе кукурузного масла в комплексе одновременно с водо- и липидорастворимыми антиоксидантами (карнозином и α -токоферолом соответственно) дает выраженный гипохолестеринемический эффект и может быть рекомендовано для лечения и профилактики атеросклероза.

Авторы выражают благодарность Ж. И. Ключниковой за проведение анализа содержания холестерина в сыворотке, а также С. Никитину за проведение электрофореза.

ЛИТЕРАТУРА

1. Владимиров Ю. А., Арчаков А. И. Перекисное окисление липидов в биологических мембранах.— М., 1972.
2. Вольнова Т. В., Панасенко О. М., Заречнева Н. В. и др. // Биол. мембраны.— 1990.— № 7.— С. 141—148.
3. Воскресенский О. Н. // Кардиология.— 1981.— № 6.— С. 118—123.
4. Дудаев В. А., Аббуд А., Иванов А. С. // Там же.— 1987.— № 6.— С. 79—83.
5. Егоров Д. Ю., Козлов А. В. // Природа продуктов перекисного окисления липидов, определяемых в сыворотке крови по реакции с 2-тиобарбитуровой кислотой.— М., 1988.— С. 3—13 (Депонир. в ВИНИТИ 30.08.88, № 6766—В88).
6. Лопухин Ю. М. // Экспериментальная хирургия.— М., 1971.— С. 314—315.
7. Лопухин Ю. М., Арчаков А. И., Владимиров Ю. А., Коган Э. М. Холестериноз.— М., 1983.
8. Лопухин Ю. М., Климов А. И., Арчаков А. И. и др. // Кардиология.— 1983.— № 3.— С. 11—14.
9. Панасенко О. М., Вольнова Т. В., Азизова О. А., Владимиров Ю. А. // Биол. мембраны.— 1988.— № 11.— С. 1186—1191.
10. Панасенко О. М., Вольнова Т. В., Азизова О. А., Владимиров Ю. А. // Там же.— 1987.— № 4.— С. 875—881.
11. Панасенко О. М., Вольнова Т. В., Азизова О. А., Владимиров Ю. А. // Бюл. exper. биол.— 1988.— № 9.— С. 226—229.
12. Швачко А. Г., Формазюк В. Е., Сергиенко В. И. // Там же.— 1990.— № 8.— С. 155—157.
13. Boldyrev A. A. // Int. J. Biochem.— 1989.— Vol. 48.— P. 244.
14. Burstlein M., Scholink H. R., Morfin R. // J. Lipid Res.— 1970.— Vol. 11.— P. 583—595.
15. Harman D. // J. Geront.— 1957.— Vol. 12.— P. 199—202.
16. Kobatake Y., Hirahara F., Innami S., Nishide E. // J. Nutr. Sci. Vitaminol.— 1983.— Vol. 29, N 1.— P. 11—21.
17. Lindgren F. T. // Analysis of Lipids and Lipoproteins.— Champaign, 1975.— P. 204—224.

18. Lowry O. H., Rosebrough N. J., Farr A. L., Randall R. J. // J. biol. Chem.— 1951.— Vol. 193.— P. 265—275.
19. Sulyok S., Bar-Pollak Z., Feher E. et al. // Acta physiol. hung.— 1984.— Vol. 64.— P. 437—442.
20. Vega G. L., Groszek E., Wolf R., Grundy S. M. // J. Lipid Res.— 1982.— Vol. 23, N 6.— P. 811—822.

Поступила 19.06.91

CORRECTION OF LIPOPROTEIN PEROXIDATION IN EXPERIMENTAL ATHEROSCLEROSIS USING A DIET CONTAINING POLYUNSATURATED FATTY ACIDS AND ANTIOXIDANTS

A. G. Sdvigova, O. M. Panasenko, I. V. Lukyashchenko, V. I. Sergienko, Yu. M. Lopukhin

Institute of Physico Chemical Medicine, RSFSR Ministry of Public Health, Moscow

Atherosclerotic lesion of the aorta and lipid peroxidation (LPO) in blood and in lipoproteins produced in hepatocytes were studied in rabbits with experimental atherosclerosis maintained on a diet enriched in polyunsaturated fatty acids containing in corn oil (2 ml/kg daily during 30 days) and antioxidants α -tocopherol and carnosine (2.5 mg/kg and 50 mg/kg, respectively, daily during 30 days). This diet exhibited a hypocholesterolemic effect accompanied by approximately a 10-fold decrease of the impaired aortic area, as well as lowered content of 2-thiobarbituric acid-positive LPO products occurring in blood and, especially, in apoB lipoproteins. The antioxidant-containing diet decreased distinctly the content of LPO products both in the liver tissue homogenate and lipoprotein fraction ($d < 1.065 \text{ g/cm}^3$) produced by hepatocytes during 30-min perfusion of liver tissue. The findings suggest that the diet enriched in polyunsaturated fatty acids and antioxidants contributed to a decrease of LPO products content in the blood serum and apoB lipoproteins as well as to the inhibition of lipoprotein oxidation during their synthesis in liver cells; the diet may be recommended for the prophylaxis and treatment of atherosclerosis.

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 1993

УДК 616-056.257-07:616.153.915

И. А. Олейник, А. Д. Денисенко, К. К. Мирчук, Ю. И. Седлецкий, В. Т. Лозовский, Л. Е. Васильева, В. Ф. Трюфанов

УРОВЕНЬ ЛИПИДОВ И АПОЛИПОПРОТЕИНОВ ПРИ ОЖИРЕНИИ

Институт экспериментальной медицины РАМН, I Медицинский институт им. акад. И. П. Павлова, Санкт-Петербург

Ожирение общепринято считать фактором риска ишемической болезни сердца (ИБС), однако природа связи между ожирением и развитием атеросклероза до конца не выяснена. Весьма вероятно, что увеличение частоты ИБС у лиц с ожирением связано не столько с возрастанием массы тела как таковой, сколько с другими атерогенными факторами, имеющимися у лиц с избыточной массой (например, с гипертензией, дислипидемией и др.).

Задачей настоящего исследования явилось изучение концентрации липидов и аполипопротеинов у лиц с ожирением с целью проверить, не является ли дислипидемия атерогенно-го характера тем фактором, который и объясняет увеличение частоты ИБС при ожирении. Актуальность подобного рода исследований обусловлена тем, что имеющиеся в литературе дан-

Содержание липидов и аполипопротеинов (в мг/дл) у женщин с нормальной массой тела (контроль) и при ожирении

Показатель	Контроль (n=11)	Ожирение (n=42)	p
ХС	213,4±12,9	198,9±4,9	—
ХС ЛПНП	131,1±11,5	129,1±4,4	—
ХС ЛПОНП	22,1±2,4	33,6±1,9	<0,001
ХС ЛПВП	63,4±6,4	38,2±1,6	<0,01
ТГ	110,6±11,9	167,9±9,3	<0,001
Лпо А-I	146,6±6,8	138,6±2,7	—
Лпо В	107,1±9,4	110,9±4,4	—
Лпо Е	8,2±0,7	10,1±0,4	<0,05
ХС ЛПВП/апо-I	0,43±0,03	0,27±0,01	<0,001
ХС ЛПНП/апо В	1,26±0,09	1,21±0,06	—
Лпо А-I/апо В	1,5±0,2	1,4±0,1	—
ТГ/апо Е	14,4±2,0	17,0±0,9	—
ХС ЛПОНП/ХС ЛПВП	0,39±0,06	0,95±0,07	<0,001
Кхс	2,6±0,3	1,5±0,3	<0,001

нения концентрации ИГ и ХС ЛПВП у больных ожирением, как и в нашей работе: увеличение уровня ТГ и снижение — ХС ЛПВП.

Кроме липидов, в нашем исследовании определяли содержание аполипопротеинов А-I, В и Е в сыворотке крови. Концентрацию этих белковых компонентов липопротеидов сыворотки крови у лиц с избыточной массой тела ранее практически не изучали. Нами не обнаружено достоверных различий в содержании аполипопротеинов А-I и В у лиц с нормальной массой тела и ожирением. Что касается концентрации аполипопротеина Е, то она увеличивалась при ожирении у женщин и имела такую же тенденцию у мужчин.

Обращает на себя внимание тот факт, что у больных ожирением было снижено отношение ХС ЛПВП/апо А-I, что свидетельствует о преимущественном снижении концентрации крупных частиц ЛПВП — ЛПВП₂. Возможно, что сниженное содержание ЛПВП в крови больных ожирением связано с их катаболизмом в жировой ткани, масса которой резко увеличена при ожирении [10].

Отмеченное выше увеличение содержания ТГ, ХС ЛПОНП, снижение содержания ХС ЛПВП, а также практически неизменная концентрация ХС ЛПНП, апо В и возрастание отношения ТГ/апо Е дают основание предположить, что в сыворотке крови пациентов с избыточной массой тела происходит накопление крупных легких частиц ЛПОНП, обогащенных ТГ. В пуле сывороточного ХС происходит перераспределение ХС ЛПОНП и ХС ЛПВП (увеличение доли первого и снижение последнего). Близкие результаты были получены и другими авторами [5, 8, 9].

Таким образом, при ожирении отмечается нарушение обмена главным образом двух классов липопротеидов — ЛПОНП и ЛПВП, что отражается в увеличении содержания в крови ТГ, ХС ЛПОНП и снижении уровня ХС ЛПВП и как результат этого увеличения Кхс. Важно отметить, что уровень ХС ЛПВП у мужчин снижается до величины, характерной для 5 % отрезной точки кривой распределения этого показателя в местной популяции, а у женщин — даже ниже этой величины [1]. Это свидетельствует о том, что при ожирении развивается гиподислипидемия. Причем эти изменения достаточно выражены и имеют, безусловно, атерогенный характер. Таким образом, одной из причин повыше-

тые об уровне липидов при ожирении противоречивы, а аполипопротеины у таких пациентов практически не изучали.

Методика. Исследовано 75 мужчин и женщин в возрасте от 19 до 59 лет, 56 из которых (14 мужчин и 42 женщины) имели избыточную массу тела (150–258 % от идеальной массы), не связанную с нарушениями в гормональном статусе. Контрольную группу (8 мужчин и 11 женщин) составили практически здоровые лица с нормальной массой тела (80–120 % от идеальной массы). Кровь брали натощак из локтевой вены. Содержание в крови общего холестерина (ХС), триглицеридов (ТГ) и ХС липопротеидов высокой плотности (ХС ЛПВП) определяли на автоанализаторе АА-2 фирмы «Техникон» [4]. Определение ХС липопротеидов низкой плотности (ХС ЛПНП) проводили путем расчета по формуле, представленной в работе [6]:

$$\text{ХС ЛПНП} = \text{ХС}_{\text{общ}} - \left(\frac{\text{ТГ}}{5} + \text{ХС ЛПВП} \right),$$

где отношение $\frac{\text{ТГ}}{5}$ соответствует содержанию ХС липопротеидов очень низкой плотности (ХС ЛПОНП). Холестериновый коэффициент атерогенности (Кхс) рассчитывали по [2]. Концентрацию индивидуальных аполипопротеинов А-I, В и Е измеряли с помощью ракетного иммуноэлектрофореза [3]. Статистическую обработку данных производили на персональном компьютере HP 9845 Т (США).

Результаты и обсуждение. В табл. 1 и 2 представлены данные о содержании липидов и основных аполипопротеинов у больных ожирением.

Как видно из таблиц, независимо от пола обследуемых основные изменения в уровне липидов касались концентрации ТГ, ХС ЛПОНП и ХС ЛПВП: у лиц с ожирением уровень ТГ и ХС ЛПОНП был повышен, а ХС ЛПВП — снижен. Концентрации общего ХС и ХС ЛПНП не отличались существенно у лиц с нормальной массой тела и с ожирением, как у мужчин, так и у женщин. В литературе существуют разноречивые данные о содержании общего ХС у лиц с избыточной массой тела. Одни авторы [7, 12] в своих исследованиях отметили прямую связь между содержанием общего ХС и массой, в то время как другие [8, 9, 11] такой связи не обнаружили.

В работах [8, 9] также не обнаружено достоверного изменения концентрации ХС ЛПНП при ожирении. В то же время во всех указанных выше исследованиях были найдены такие же изме-

Таблица 1

Содержание липидов и аполипопротеинов (в мг/дл) у мужчин с нормальной массой тела (контроль) и при ожирении

Показатели	Контроль (n=8)	Ожирение (n=14)	p
ХС	205,4±9,2	209,0±10,0	—
ХС ЛПНП	134,9±7,2	133,6±8,5	—
ХС ЛПОНП	15,3±2,0	42,9±4,4	<0,001
ХС ЛПВП	58,1±5,0	34,2±1,8	<0,001
ТГ	76,5±10,1	214,4±22,0	<0,001
Лпо А-I	135,5±9,2	126,3±7,1	—
Лпо В	109,8±6,6	118,3±6,8	—
Лпо Е	8,6±0,7	10,0±0,4	<0,1
ХС ЛПВП/апо А-I	0,43±0,02	0,27±0,01	<0,001
ХС ЛПНП/апо В	1,24±0,07	1,15±0,06	—
Лпо А-I/апо В	1,3±0,1	1,1±0,1	—
ТГ/апо Е	9,3±1,5	21,7±2,1	<0,001
ХС ЛПОНП/ХС ЛПВП	0,28±0,04	1,28±0,14	<0,001
Кхс	2,7±0,3	5,2±0,4	<0,001

Примечание. Здесь и в табл. 2 апо — аполипопротеины.

ния частоты ИБС, а следовательно, и атеросклероза при ожирении может быть развитие описанных выше атерогенных нарушений обмена липопротеидов.

ЛИТЕРАТУРА

1. Бурлуцкий Г. И., Хоптяр В. П. // Эпидемиология и факторы риска ишемической болезни сердца / Под ред. А. Н. Климова. — Л., 1989. — С. 148—162.
2. Климов А. Н. // Превентивная кардиология / Под ред. Г. И. Косицкого. — М., 1977. — С. 260—321.
3. Климов А. Н., Усатенко М. С., Денисенко А. Д. и др. // Биохимия. — 1981. — Т. 46, № 4. — С. 590—602.
4. Трюфанов В. Ф., Сучкова С. Н. // Дислипидотемии и ишемическая болезнь сердца / Под ред. Е. И. Чазова, А. Н. Климова. — М., 1980. — С. 151—178.
5. Contaldo F., Strazzullo P., Postiglione A. et al. // Atherosclerosis. — 1980. — Vol. 37. — P. 163—167.
6. Friedewald W. T., Levy R. I., Fredrickson D. S. // Clin. Chem. — 1972. — Vol. 18. — P. 499—502.
7. Jooste P. L., Steenkamp H. J., Benade A. J., Rossouw J. E. // S. Afr. med. J. — 1988. — Vol. 74. — P. 101—104.
8. Kesaniemi J. A., Grundy S. M. // Arteriosclerosis. — 1983. — Vol. 3. — P. 170—177.
9. Kikkonen K., Rauzamaa R., Voutilainen E., Hietanen E. // Clin. Physiol. — 1982. — Vol. 2. — P. 251—262.
10. Saller A. M., Fong B. S., Jimenez J. et al. // Europ. J. clin. Invest. — 1987. — Vol. 17. — P. 16—22.
11. Sorbris R., Peterson B., Nilson-Ehl P. // Ibid. — 1981. — Vol. 11. — P. 491—498.
12. Vyssoulis G. P., Karpanou E. A., Toutouza M. A. et al. // International Symposium on Atherosclerosis Poster Session, 8-th: Abstracts. — Rome, 1988. — P. 1007.

Поступила 04.04.91

CONTENT OF LIPIDS AND APOLIPOPROTEINS IN OBESITY

I. A. Oleinik, A. D. Denisenko, K. K. Mirchuk, Yu. I. Sedletsky, V. T. Losovsky, L. E. Vasilyeva, V. F. Tryufanov

Institute of Experimental Medicine, Academy of Medical Sciences of the Russian Federation, St. Petersburg.

The level of lipids and apolipoproteins was studied in the serum of patients with various degrees of obesity without hormonal impairments in order to find interrelationship between obesity and atherosclerosis development. 14 men and 42 women aged 19-59 years were examined. Concentration of triglycerides and very low density lipoprotein (VLDL) cholesterol was distinctly higher in obese patients of both sexes than in normal weight persons. However, content of apo A-I and apo B was similar in blood of both obese and normal persons, while concentration of apo E was higher in obesity. In obesity, the ratio HDL cholesterol/A-I was decreased, thus indicating that the HDL₂/HDL₁ ratio was altered, showing a decreased content of the latter subfraction. The findings suggest that impairment in metabolism of mainly HDL and VLDL subfractions occurred in patients with obesity. These impairments were atherogenic and may be responsible for a high risk for atherosclerosis and heart ischemic disease in obese patients.

© Е. А. СТРОЕВ, Л. Г. ЧУГУНОВА, 1993

УДК 616.379-008.64-06:616.441-007.61

Е. А. Строев, Л. Г. Чугунова, И. И. Дубинина

АКТИВНОСТЬ ЛИЗОСОМНЫХ ФЕРМЕНТОВ У БОЛЬНЫХ САХАРНЫМ ДИАБЕТОМ ПРИ СОЧЕТАНИИ С ДИФфуЗНЫМ УВЕЛИЧЕНИЕМ ЩИТОВИДНОЙ ЖЕЛЕЗЫ

Рязанский медицинский институт

Инсулиновая недостаточность (абсолютная или относительная) при сахарном диабете вызывает метаболические нарушения, что в первую очередь касается углеводного и белкового обмена. Известно действие на белковый обмен и тиреоидных гормонов. Определенный интерес представляет изучение состояния метаболизма у больных сахарным диабетом при сочетании с диффузным увеличением щитовидной железы.

В ряде экспериментальных работ получены разнонаправленные изменения активности лизосомных ферментов — В-галактозидазы, катепсинов — при стрептозотоциновом и генетических формах диабета у мышей в печени, почках и миокарде [4, 5, 7]. В единичных клинических исследованиях при сахарном диабете отмечены повышение активности В-галактозидазы в сыворотке крови при наличии диабетических ангиопатий [6] и стимуляция В-галактозидазы в лейкоцитах под воздействием эндоваскулярного лазерного облучения крови у больных сахарным диабетом с диабетическими ангиопатиями [3].

Целью настоящего исследования явилось изучение активности лизосомных ферментов у больных сахарным диабетом I и II типа с диабетическими ангиопатиями на фоне нового метода лечения сахарного диабета — интенсифицированной инсулинотерапии и при сочетании с диффузным увеличением щитовидной железы.

Методика. Обследовано 68 больных сахарным диабетом I и II типа в возрасте от 16 до 69 лет. Контрольную группу составили 20 практически здоровых лиц. У 31 человека был инсулинзависимый тип сахарного диабета (I тип), из них средней тяжести у 23 больных и тяжелая форма заболевания у 8. Инсулиннезависимый сахарный диабет (II тип) средней тяжести диагностирован у 19 человек. В группу комбинированной патологии вошли 18 больных сахарным диабетом I типа средней тяжести и диффузной струмой I—II степени. У большинства больных сахарным диабетом I и II типа диагностированы диабетические ангиопатии — ретинопатия, нефропатия, полинейропатия. Длительность сахарного диабета была от нескольких месяцев до 27 лет. Больным сахарным диабетом I типа проводили лечение инсулином в виде однократной инъекции инсулина пролонгированного действия в дозе 50—60 ЕД/сут, при лечении 13 человек использовали новый метод инсулинотерапии — интенсифицированную инсулиновую терапию в дозе 0,5—0,8 ЕД на 1 кг массы тела в сутки в 2—3 инъекциях. Больных сахарным диабетом II типа лечили пероральными сахаропонижающими средствами (букарбан, манинил, адебит). Проведено исследование активности лизосомных ферментов — В-галактозидазы, катепсинов, ДНКазы — в лейкоконцентрате спектрофотометрическим методом [2]. Больным с комбинированной патологией проводились термография щитовидной железы, исследование тиреотропного гормона гипофиза иммуноферментным методом с помощью системы ультрамикромунного анализа «Сума» (Куба).

Полученные результаты обработаны методом вариационной статистики с использованием критерия Стьюдента.

Активность лизосомных ферментов в лейкоконцентрате у больных сахарным диабетом в сочетании с диффузным увеличением щитовидной железы

Группа	В-галактозидаза	Катепсины	ДНКазы
	нмоль/ч на 1 мг белка		
Здоровые	20,56±0,85	49,96±1,86	4,63±0,31
Сахарный диабет I типа	17,51±1,23*	53,02±3,13	3,75±0,38*
Сахарный диабет II типа	18,2±2,21	54,96±4,78	3,32±0,48*
Традиционная инсулинотерапия	15,94±1,83*	55,62±4,68	3,56±0,42*
Интенсивная инсулинотерапия	19,68±2,2	49,42±5,6	4,53±0,71
Пероральная терапия	18,45±3,0	53,94±6,41	3,29±0,41*
Сахарный диабет + диффузная струма I—II степени	19,14±2,28	50,19±7,46	4,85±0,65

Примечание. Звездочка — достоверно по отношению к группе здоровых.

Результаты и обсуждение. Как видно из таблицы, у больных сахарным диабетом I и II типа установлено снижение активности лизосомных ферментов в лейкоконцентрате — В-галактозидазы и ДНКазы, что подтверждает метаболические нарушения при сахарном диабете. Снижение активности лизосомных ферментов В-галактозидазы и ДНКазы — свидетельствует о нарушении катаболических превращений гликопротеинов и энергетического обмена в базальной мембране, на что указывает также повышение активности катепсинов в лейкоцитах у данных больных.

Изучение активности лизосомных ферментов у больных сахарным диабетом I типа при использовании интенсифицированной инсулинотерапии показало эффективность данного метода по сравнению с традиционной инсулинотерапией. Имеют место достоверное снижение активности В-галактозидазы и ДНКазы в лейкоцитах у больных сахарным диабетом I типа на фоне однократного введения инсулина и тенденция к нормализации активности лизосомных ферментов на фоне интенсифицированной инсулинотерапии. Следует также отметить улучшение компенсации обменных процессов и стабилизацию гликемии при интенсифицированной инсулинотерапии, что согласуется с литературными данными [1]. У больных сахарным диабетом II типа, находящихся на пероральной терапии, выявлено достоверное снижение активности ДНКазы и менее выраженное снижение активности В-галактозидазы при повышении активности катепсинов в лейкоцитах, что, по-видимому, связано с недостаточной компенсацией нарушенного метаболизма в этой группе больных.

У больных с сочетанной патологией (сахарный диабет I типа средней тяжести и диффузная струма I—II степени) отмечается выравнивание активности катепсинов до нормы с одновременным повышением активности В-галактозидазы и ДНКазы в лейкоцитах крови. При исследовании функционального состояния щитовидной железы у больных с комбинированной патологией выявлено достоверное снижение содержания тиреотропного гормона гипофиза, что может указывать на легкую гиперфункцию щитовидной железы. В связи с этим, учитывая анаболическое действие малых доз тиреоидных гормонов на белковый обмен, можно рекомендовать включение в комплексную терапию боль-

ных сахарным диабетом молодого возраста малые дозы Л-тироксина.

Таким образом, у больных сахарным диабетом I и II типа наблюдается снижение активности В-галактозидазы и ДНКазы и повышение активности катепсинов в лейкоконцентрате, что указывает на метаболические нарушения при сахарном диабете и улучшение данных показателей на фоне интенсифицированной инсулинотерапии. Гиперфункция щитовидной железы восстанавливает активность лизосомных ферментов у больных сахарным диабетом I типа средней тяжести, что позволяет использовать в комплексной терапии сахарного диабета I типа Л-тироксин под контролем функционального состояния щитовидной железы.

ЛИТЕРАТУРА

1. Зефирова Г. С. // Тер. арх.— 1988.— № 9.— С. 113—116.
2. Орехович В. Н. // Современные методы в биохимии.— М., 1968.— С. 44—48.
3. Строев Е. А., Ларионов В. А., Григорьева Л. П. и др. // Пробл. эндокринологии.— 1990.— № 6.— С. 23—25.
4. Belfiore F. et al. // Diabetologia.— 1980.— Vol. 19, N 3.— P. 257.
5. Belfiore F. et al. // Horm. Metab. Res.— 1985.— Vol. 17, N 9.— P. 435—437.
6. Price C. P. // Clin. Biochem.— 1979.— Vol. 12, N 6.— P. 231—233.
7. Skora L. // Lab. Invest.— 1980.— Vol. 43, N 5.— P. 443—448.

Поступила 13.01.91

ACTIVITY OF LYSOSOMAL ENZYMES IN DIABETIC PATIENTS WITH DIFFUSE THYROID ENLARGEMENT

E. A. Stroeve, L. G. Chugunova, I. I. Dubinina

Medical Institute, Ryazan

Activity of lysosomal enzymes was studied in 68 patients with Types 1 and 2 diabetes mellitus concurrent with diffuse thyroid enlargement. A decrease in activities of β -galactosidase and DNAase and activation of cathepsins were detected in the leukocytes fraction from patients with Types 1 or 2 diabetes mellitus, thus demonstrating that metabolic impairments occurred in diabetes mellitus. These patterns were improved after intensive insulinotherapy. Hyperfunction of the thyroid gland in patients with moderate Type 1 diabetes mellitus normalizes the activity of lysosomal enzymes.

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 1993

УДК 616.89-008.441.13-07:616.153.473.2

Г. Ф. Карандашова, Е. М. Крупицкий,
В. Н. Петров, З. С. Никитина, А. Я. Гриненко

ИССЛЕДОВАНИЕ КОНЦЕНТРАЦИИ γ -АМИНОМАСЛЯНОЙ КИСЛОТЫ (ГАМК) В ПЛАЗМЕ КРОВИ БОЛЬНЫХ АЛКОГОЛИЗМОМ

Областной наркологический диспансер, НИИ экспериментальной медицины РАМН, Санкт-Петербург

ГАМК-ергические системы мозга играют важную роль в механизмах психофармакологического действия этанола [2]. В исследованиях последних лет было показано, что как у предпочитающих алкоголь животных, так и у больных хроническим алкоголизмом отмечается снижение функции ГАМК-ергических систем мозга [7, 8].

Содержание ГАМК (в нг/мл) в крови здоровых испытуемых и больных алкоголизмом в ходе лечения в стационаре

День лечения в стационаре	Больные алкоголизмом		Здоровые испытуемые
	без ААС	с ААС	
1-й	43,8±1,01* (69)	42,7±1,70* (35)	52,6±1,10 (29)
20-й	47,0±1,20* (53)		
40-й	44,3±1,60* (33)		
60-й	46,3±0,90* (8)		

Примечание. Звездочка — $p < 0,001$. В скобках — число обследованных.

С другой стороны, в ряде работ были обнаружены параллельные изменения активности ГАМК-ергических систем мозга и уровня ГАМК в плазме крови людей [1], что позволило сделать предположение о том, что содержание ГАМК в крови в определенной мере отражает состояние ГАМК-ергических механизмов центральной нервной системы [4, 6]. В связи с этим исследование динамики содержания ГАМК в плазме крови больных алкоголизмом представлялось нам важным и перспективным для оценки развивающихся при алкоголизме изменений в ГАМК-ергических системах мозга и, следовательно, для биохимической диагностики этого заболевания.

Методика. Исследование было проведено у 104 мужчин с диагнозом хронического алкоголизма II стадии, проходивших курс лечения в наркологическом стационаре. Забор крови для определения уровня ГАМК проводили при поступлении больных в стационар (при этом у 35 из 104 больных отмечалась клиника алкогольного абстинентного синдрома — ААС), а также на 20, 40 и 60-й дни пребывания в стационаре. Поскольку значительная часть больных к 60-му дню исследования по разным причинам выписывалась из стационара, число обследованных больных уменьшилось со 104 человек, обследованных при поступлении, до 53 на 20-й день, 33 на 40-й и 8 человек на 60-й день исследования. Для исключения влияния фармакологических препаратов на уровень ГАМК в крови за 3—4 дня до исследования всем больным полностью отменяли фармакотерапию. В качестве группы сравнения (контроля) выступали 29 здоровых испытуемых (мужчин), длительно воздерживавшихся от употребления алкоголя.

Определение концентрации ГАМК в плазме крови осуществляли с помощью отечественного спектрофлуориметра «Люмилан» по методу [9].

Результаты и обсуждение. Концентрация ГАМК в плазме крови больных алкоголизмом значительно не изменялась ни в состоянии ААС, ни в процессе лечения. Были зарегистрированы высокодостоверные различия содержания ГАМК в крови между здоровыми испытуемыми и больными алкоголизмом, у которых концентрация этой аминокислоты в плазме крови была снижена (см. таблицу).

Полученные данные, во-первых, подтверждают сформулированные ранее представления о снижении функций ГАМК-ергических систем мозга при алкоголизме [9] и, во-вторых, позволяют рассматривать концентрацию ГАМК в крови как полезный показатель для биохимической диагностики хронического алкоголизма II стадии, в том числе и у больных, длительно воздерживающихся от приема алкоголя. Последнее обстоятельство представляется особенно важным, поскольку большинство показателей, используемых для биохимиче-

ской диагностики алкоголизма (γ-глутамилтрансфераза, средний корпускулярный объем эритроцитов и др.) возвращается к норме через 2—4 нед воздержания от спиртного [3].

Следует отметить, что результаты нашего исследования хорошо согласуются с данными других авторов [5], обнаруживших высокодостоверные различия в уровне ГАМК в крови больных алкоголизмом вне ААС и здоровых испытуемых.

Поскольку фактором, лимитирующим синтез ГАМК, является скорость превращения глутамата в ГАМК под действием глутаматдекарбоксилазы [10], можно предположить, что снижение активности этого фермента у больных алкоголизмом может являться одной из причин пониженного уровня ГАМК в крови.

ЛИТЕРАТУРА

1. Мишутина Т. М. // Вопр. мед. химии.— 1990.— № 2.— С. 22—24.
2. Рожанец В. В. // Вопр. наркол.— 1988.— № 2.— С. 45—49.
3. Успенский А. Е. // Итоги науки и техники. Токсикология.— М., 1984.— Т. 13.— С. 6—56.
4. Apud J., Recagni G., Iuliano E. et al. // Endocrinology.— 1981.— Vol. 108.— P. 1505—1510.
5. Coffman J., Petty F. // Amer. J. Psychiat.— 1985.— Vol. 142, N 10.— P. 1204—1205.
6. Coffman J., Petty F. // L.E.R.S.— 1986.— Vol. 4.— P. 179—185.
7. Kulonen E. // Med. Biol.— 1983.— Vol. 61, N 3.— P. 147—167.
8. Malka R., Ollat H. // Encephale.— 1987.— Vol. 13, Spec. issue.— P. 187—192.
9. Sutton J., Simmonds H. // Biochem. Pharmacol.— 1974.— Vol. 23.— P. 1801—1808.
10. Szerb J. C. // Neurotransmitt. and Cortial Funct. from Mol. Mind.— New York, 1988.— P. 153—166.

Поступила 09.06.91

ESTIMATION OF γ-AMINOBUTYRIC ACID CONCENTRATION IN BLOOD PLASMA OF PATIENTS WITH ALCOHOLISM

G. F. Karandashova, E. M. Krupitsky, V. N. Petrov, Z. S. Nikitina, A. Ya. Grinenko

Regional Narcologic Dispensary, Institute of Experimental Medicine, Academy of Medical Sciences of the Russian Federation, St. Petersburg

Concentration of γ-aminobutyric acid (GABA) was estimated in the plasma of 104 patients with alcoholism during 2 month treatment course in narcologic hospital and in 29 healthy volunteers. Highly distinct differences in content of GABA were detected in the plasma of the volunteers and patients with alcoholism, which remained within 60 days of alcohol withdrawal.

И. П. Черникевич, Б. Ф. Дорофеев, А. Г. Мойсеенко

ВОЗМОЖНЫЕ ПУТИ РЕГУЛЯЦИИ ПРОИЗВОДНЫМИ ПАНТОТЕНОВОЙ КИСЛОТЫ ДЕЗИНТОКСИКАЦИОННЫХ ПРОЦЕССОВ В АЛКОГОЛЬДЕГИДРОГЕНАЗНОЙ РЕАКЦИИ

Институт биохимии АН Беларуси, Гродно

Антитоксические свойства пантотеновой кислоты (ПК) и ее производных известны в отношении аминогликозидных антибиотиков и препаратов группы гидразида изоникотиновой кислоты [4, 7]. С участием витамина интенсифицируются реакции ацетилирования, лимитирующим фактором которых является кофермент А — основной метаболит ПК [6]. Показаны антитоксические свойства производных ПК и в условиях алкогольной интоксикации [2, 6], идущей с нарушением процессов ацетилирования [1], однако конкретный механизм участия синтезированных производных В₃ в реакциях дезинтоксикации раскрыт не был. Учитывая, что основная роль в катаболизме этанола и в проявлении алкогольной интоксикации принадлежит алкогольдегидрогеназе (АДГ, алкоголь: НАД-оксидоредуктаза; КФ 1.1.1.1), очевидно, можно ожидать, что реализация биологической активности производных ПК будет осуществляться на уровне алкогольдегидрогеназной реакции посредством участия производных как субстратов или эффекторов в каталитическом акте.

Существенной трудностью в адекватной дезинтоксикационной терапии производными ПК остается рациональное дозирование препаратов. До настоящего времени данный процесс осуществлялся эмпирически без должного учета скорости утилизации производных в метаболическом потоке.

Исходя из вышеизложенного нами предпринята попытка изучить влияние производных и предшественников ПК на скорость алкогольдегидрогеназной реакции с целью выяснения механизма дезинтоксикации и определения оптимальных концентраций препаратов, оказывающих направленное терапевтическое действие. Исследованию подвергали β-аланин и ГАМК («Reanal», Венгрия), пантоат и фосфопантотенат натрия, пантотенат кальция, синтезированные в НИО «Витамины» (Москва), пантотенат натрия («Koch-Light», Англия), пантолактон («Serva», Германия), пантетин («Daiichi Seigaku Co, LTD», Япония), пантенол («Иенафарм», Германия), кофермент А и ацетилкофермент А («Fluko», Швейцария).

Методика. Формальный механизм антитоксического действия производных ПК анализировали на примере АДГ из печени лошади («Reanal», Венгрия) с удельной активностью 2,0 ФЕ·мг⁻¹ белка·мин⁻¹. Для удаления стабилизирующих агентов, влияющих на скорость реакции, белок перед использованием фильтровали через колонку с сефадексом G-25, предварительно уравновешенную 0,01 М трис-НСl-буфером pH 7,2, с 0,5 мМ ЭДТА и 1 мМ дитиотрейтолом. Начальную скорость измеряли по восстановлению НАД при 340 нм на двухлучевом спектрофотометре («Perkin-Elmer», Швеция), в термостатируемых кюветках (30 °С). В случае прямой реакции исследуемая среда общим объемом 3 мл включала 3 мМ глицинового буфера pH 9,6, 1 мМ НАД, 3—4 мкг ферментного препарата АДГ и различные концен-

Активность АДГ из печени лошади с этанолом и без него в присутствии фиксированных концентраций ($2 \cdot 10^{-2}$ М) производных или предшественников ПК (прямая реакция)

Производные или предшественники ПК	Активность, по отношению к C ₂ H ₅ OH, %	
	без этанола	в присутствии $2 \cdot 10^{-2}$ М этанола
Пантенол	103,0	—
Пантетин	—	83,9
Пантотенат натрия	—	7,3
Пантотенат кальция	—	6,9
Фосфопантотенат натрия	—	48,7
Пантоат	—	3,1
Пантолактон	—	—
Кофермент А*	—	37,6
Ацетилкофермент А*	—	32,9
β-Аланин	—	—
γ-Аминомасляная кислота	—	—
Гомотаруин	—	—

Примечание. Звездочка — концентрация вносимых кофермента А или ацетилкофермента А $5 \cdot 10^{-4}$ М.

трации этилового спирта (от 5 до 30 мМ) в отсутствие или в присутствии производных ПК. При использовании в качестве субстрата пантенола концентрации последнего были идентичны концентрациям этилового спирта. Реакцию инициировали внесением фермента, регистрируя изменения оптической плотности раствора за первые 3 мин.

Скорость обратного процесса измеряли в калий-фосфатном буфере pH 7,5 с 10 мМ пропионовым альдегидом и 1 мМ НАДН₂. Расчет кинетических констант и анализ характера ингибирования активности АДГ осуществляли непараметрическим методом [12], концентрацию белка определяли методом Лоури [13]. Результаты обрабатывали статистически с использованием критерия U Вилкоксона—Манна—Уитни [3].

Результаты и обсуждение. Изучение влияния ПК и ее некоторых основных физиологически активных производных на активность АДГ из печени лошади показывает, что ферментативному окислению в алкогольдегидрогеназной реакции может подвергаться только пантенол (см. таблицу), поскольку наличие свободных концевых гидроксиметильных группировок в молекуле пантенола придает этому соединению определенное структурное сходство с истинным субстратом — этанолом — при широкой субстратной специфичности самой ферментативной системы.

Насыщение АДГ пантенолом наблюдается при более высоких в сравнении с этиловым спиртом концентрациях, свидетельствуя о его более низком сродстве к АДГ (рис. 1). Константы Михаэлиса (K_m) для пантенола и этанола существенно отличаются и равны $8 \cdot 10^{-3}$ и $5 \cdot 10^{-4}$ М соответственно.

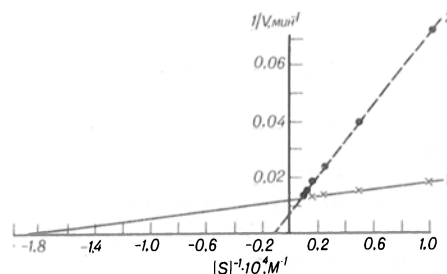


Рис. 1. Зависимость скорости реакции (в мкмоль НАДН/мин·мг), катализируемой АДГ из печени лошади, от концентрации этанола (1) и пантенола (2) в координатах Лайнуивера — Берка.

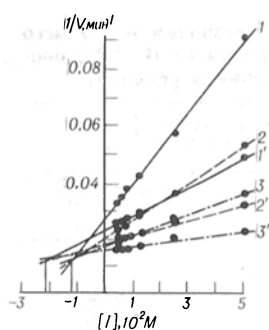


Рис. 2. Зависимость обратной скорости реакции (в мкмоль НАДН/мин·мг), катализируемой АДГ из печени лошади, от концентрации пантетина (1—3) или фосфопантотената (1'—3') при различных фиксированных концентрациях этанола.

1, 1' — $0,2 \cdot 10^{-3}$ М; 2, 2' — $0,5 \cdot 10^{-3}$ М; 3, 3' — $1 \cdot 10^{-3}$ М.

Уровень эндогенного этанола в организме человека составляет в среднем 40 мкмоль/г ткани [5], а содержание ПК колеблется в пределах 360 мкмоль [10]. При физиологических концентрациях интермедиатов в клетке и особенно при нагрузке пантенолом последний вполне может конкурировать с этанолом за активные центры АДГ печени, способствуя тем самым дезинтоксикации организма при алкогольных отравлениях. На реальность такого предположения указывает гораздо более низкая токсичность пантенола в условиях *in vivo* [9, 10].

ПК и другие производные ингибируют АДГ, причем степень инактивации фермента определяется близостью структурной организации молекулы ингибитора по отношению к субстрату (см. таблицу). Наиболее выраженный ингибиторный эффект прослеживается для пантетина и фосфопантотената натрия, у которых, помимо гидроксиметильной, имеется реакционно способная дисульфидная или фосфатная группировка, но торможения скорости не наблюдается в присутствии отличных по строению метаболитических предшественников ПК: β -аланина, гомоатаурина, пантолактона и γ -аминомасляной кислоты. Определенные графически из зависимости обратной скорости алкогольдегидрогеназной реакции от концентрации ингибитора при нескольких фиксированных концентрациях этанола значения констант ингибирования (K_i) для прямой реакции равны в случае пантетина и фосфопантотената натрия $1,2 \cdot 10^{-2}$ и $2,1 \cdot 10^{-2}$ М соответственно (рис. 2). Они показывают, что наличие фосфатной группировки

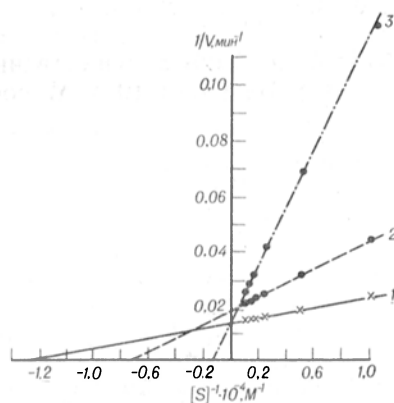


Рис. 3. Зависимость скорости реакции (в мкмоль НАД/мин·мг), катализируемой АДГ из печени лошади, от концентрации пропанонового альдегида в координатах Лайнуивера — Берка.

1 — без добавок; 2, 3 — в присутствии $5 \cdot 10^{-2}$ М пантетина или фосфопантотената соответственно.

ровки в молекуле фосфопантотената снижает его сродство к АДГ, хотя механизм ингибиторного действия для обеих производных остается одним и тем же — конкурентным. Прямые характеризующие зависимости между обратными величинами $1/V$ от $[S]$ при всех исследованных концентрациях пантетина или фосфопантотената пересекали ординату в одних и тех же точках, соответствующих V_{max} .

Снижая скорость окисления этанола в прямой алкогольдегидрогеназной реакции, пантетин и фосфопантотенат натрия угнетали и обратный процесс восстановления пропанонового альдегида как субстрата с образованием пропанола. Причем в отличие от реакции окисления в данном случае ингибирование пантетином осуществлялось по смешанному типу. В двойных обратных координатах наряду со снижением V_{max} увеличивалась и K_m для альдегида (рис. 3). На значение дисульфидной группировки в регуляции ПК указывалось ранее [5, 10]. По-видимому, различный характер связывания пантетина, содержащего S—S-группу, с АДГ печени служит дополнительным подтверждением роли дисульфидсодержащих соединений в метаболической регуляции уровня В₃. Фосфопантотенат натрия проявляет конкурентный тип ингибирования (см. рис. 3). K_i для пантетина и фосфопантотената, рассчитанные по формулам для конкурентного обратного и смешанного ингибирования в случае обратной реакции, соответственно равны $3,2 \cdot 10^{-2}$ и $6,4 \cdot 10^{-2}$ М.

Особого внимания заслуживает возможность участия в утилизации спиртов и альдегидов кофермента А и ацетилкофермента А как производных ПК и непосредственных участников регуляции реакций цикла Кребса и электротранспортной системы, поддерживающих биоэнергетический потенциал клетки. На рис. 4 представлена зависимость скорости реакции, катализируемой АДГ печени, от концентрации этанола при различных фиксированных концентрациях кофермента А или ацетилкофермента А в координатах Лайнуивера — Берка. Видно, что как кофермент А, так и ацетилкофермент А, не изменяя величины K_m для субстрата, достоверно снижают максимальную скорость ферментативного процесса. Выявленные закономерности угнетения алкогольдегидрогеназной активности исследованными интермедиатами свидетельствуют о неконкурентном механизме ин-

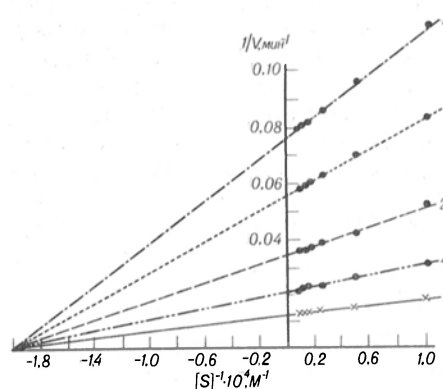


Рис. 4. Зависимость скорости реакции (в мкмоль НАДН/мин·мг), катализируемой АДГ из печени лошади, от концентрации этанола в координатах Лайнуивера — Берка.

1 — без добавок; 2, 3 — в присутствии $3 \cdot 10^{-4}$ М кофермента А; 4, 5 — в присутствии $8 \cdot 10^{-4}$ М ацетилкофермента А.

гибирования. В приведенных условиях кофермент А и ацетилкофермент А не конкурируют с субстратом за связывание в активном центре АДГ, а дают ингибиторный эффект, взаимодействуя с участком белковой глобулы, находящимся вне каталитического центра. Рассчитанные по формуле, а также найденные из зависимости обратной скорости реакции от концентрации ингибитора значения K_i хорошо совпадали и составляли для кофермента А и ацетилкофермента А $4,4 \cdot 10^{-1}$ и $5,1 \cdot 10^{-4}$ М соответственно, указывая на достаточно высокое сродство этих производных к участку связывания на молекуле АДГ. Наличие ацетильной группировки в молекуле ацетилкофермента А создает стерические препятствия связыванию.

Неконкурентный тип ингибирования был обнаружен в случае кофермента А и ацетилкофермента А для обратной реакции восстановления альдегидов, причем фиксируемые величины констант ингибирования незначительно превышали K_i в реакции окисления этанола — $5,0 \cdot 10^{-4}$ М для кофермента А и $5,7 \cdot 10^{-4}$ М для ацетилкофермента А. Отсутствие заметных различий в значениях K_i прямой и обратной реакций окисления — восстановления спиртов и альдегидов, очевидно, является одним из удобных механизмов поддержания постоянства концентраций субстратов и их регуляции при изменяющихся условиях среды. Это подтверждается еще и тем, что регистрируемые в наших опытах величины K_i для пантетина, фосфопантотената, кофермента А и ацетилкофермента А близки или несколько выше реально существующих концентраций этих метаболитов в клетке. При таком соотношении констант и концентраций ингибиторов незначительное изменение в их содержании будет вести к сравнительно большим изменениям скоростей ферментативных реакций, что может способствовать смещению направленности различных метаболических потоков [11].

Результаты проведенных экспериментов показывают, что в случае алкогольной интоксикации способностью окисляться в алкогольдегидрогеназной реакции из всех исследованных производных и предшественников ПК обладает лишь пантенол. Его выраженный антиоксидантный эффект, несомненно, связан с гораздо более низкой в сравнении с этанолом токсичностью образующегося альдегида [9, 10], лучшей липидорастворимостью, позволяющей проникать через биологические мембраны и как следствие более низким повреждающим действием на сами клеточные структуры. Влияние пантетина, фосфопантотената, кофермента А и ацетилкофермента А носит опосредованный характер и реализуется на уровне адсорбционных или активного центров АДГ путем угнетения скорости ферментативной реакции.

ЛИТЕРАТУРА

1. Бородай В. Т. Нарушение интенсивности процессов ацетилирования у больных белой горячкой и в состоянии алкогольной интоксикации: Автореф. дис. ... канд. мед. наук. — М., 1976.
2. Волинец С. И. // Новые препараты, применяемые в психиатрии и наркологии, и теоретические основы их разработки. — М., 1981. — С. 21—22.
3. Гублер Е. В., Генкин А. А. Применение непараметри-

ческих критериев статистики в медико-биологических исследованиях. — Л., 1973.

4. Дорофеев Б. Ф., Короблев М. В., Копелевич В. М. // Антибиотики. — 1983. — № 10. — С. 760—763.
5. Метаболические предпосылки и последствия потребления алкоголя / Островский Ю. М., Сатановская В. И., Островский С. Ю. и др. — Минск, 1988.
6. Мойсеенок А. Г., Дорофеев Б. Ф., Копелевич В. М. и др. // Хим.-фарм. журн. — 1979. — № 11. — С. 22—26.
7. Мойсеенок А. Г., Дорофеев Б. Ф., Шейбак В. М., Хомич Т. И. // Антибиотики. — 1984. — № 11. — С. 851—855.
8. Мойсеенок А. Г., Дорофеев Б. Ф. // Хим.-фарм. журн. — 1983. — № 11. — С. 1293—1296.
9. Мойсеенок А. Г. Пантотеновая кислота. — Минск, 1989.
10. Мойсеенок А. Г., Копелевич В. М., Шейбак В. М., Гуринович В. А. Производные пантотеновой кислоты. — Минск, 1989.
11. Хачича П., Сомеро Дж. Биохимическая адаптация: Пер. с англ. — М., 1988. — С. 9—98.
12. Cornish-Bowden A. Principles of Enzyme Kinetics. — London, 1976.
13. Lowry O. H., Rosebrough N. J., Farr A. L., Randall R. J. // J. biol. Chem. — 1951. — Vol. 193. — P. 265—275.

Поступила 25.12.91

POSSIBLE WAYS OF REGULATION OF DETOXIFICATION PROCESS IN THE ALCOHOL DEHYDROGENASE REACTION BY PANTOTHENIC ACID DERIVATIVES

I. P. Chernikevich, B. F. Dorofeev, A. G. Moiseenok

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

Oxidation of derivatives and precursors of pantothenic acid was studied in alcohol dehydrogenase reactions. Despite the presence of free hydroxymethyl groups in a number of pantothenic acid derivatives only panthenol with $K_m = 8 \cdot 10^{-3}$ M was shown to serve as a substrate for alcohol dehydrogenase from horse liver tissue (EC 1.1.1.1). Pantethine, sodium phosphopantothenate, CoA and acetyl-CoA decreased the rate of ethanol oxidation, where pantethine and sodium phosphopantothenate were competitive inhibitors, while CoA and acetyl-CoA inhibited the enzyme noncompetitively. $K_i = 1.2 \cdot 10^{-2}$ M, $2.1 \cdot 10^{-2}$ M, $4.4 \cdot 10^{-4}$ M and $5.1 \cdot 10^{-4}$ M, respectively. Metabolic precursors, which were different from pantothenic acid in their structure, were not involved in the alcohol dehydrogenase reaction. Possible regulation of alcohol intoxication using derivatives and precursors of vitamin B₃ is discussed.

© А. Н. ВЕРНИГОРА, М. Т. ГЕНКИН, 1993

УДК 616.831-008.931:577.152.3421-02:613.8631-092.9-07

А. Н. Вернигора, М. Т. Генкин

ВЛИЯНИЕ ПОТРЕБЛЕНИЯ ЭТАНОЛА НА АКТИВНОСТЬ КАРБОКСИПЕПТИДАЗЫ Н МОЗГА КРЫС ПРИ ХРОНИЧЕСКОМ ЭМОЦИОНАЛЬНО-БОЛЕВОМ СТРЕССЕ

Пензенский педагогический институт

Действие этанола ослабляет постстрессовые физиологические реакции [5]. Показано влияние этанола на активность различных компонентов системы адаптации при стрессе [2, 15], в том числе на синтез и секрецию нейропептидов гипоталамуса — β-эндорфина, АКТГ [16] и энкефалинов [8]. Вместе с тем ферментативные механизмы влияния этанола при стрессе на синтез и секрецию гормонов гипоталамуса и других регуляторных пептидов мало изучены. Одним из ключевых ферментов генеза АКТГ и энкефалинов, действующих

на заключительной стадии их процессинга, считают карбоксипептидазу Н [4], которая катализирует отщепление основных аминокислот с С-конца пропептидов [10], переводя таким образом пропептиды в их активные формы. Основанием для заключения о ведущей роли карбоксипептидазы Н в генезе физиологически активных пептидов гипофиза является также тот факт, что содержание этого фермента в гипофизе на порядок выше по сравнению с другими отделами мозга [10].

Целью настоящей работы было изучение влияния этанола на активность карбоксипептидазы Н в отделах мозга крыс при хроническом эмоционально-болевым стрессе.

Методика. Опыты проводили на белых беспородных крысах-самках массой 250–300 г. Животных разделили на три группы: 1-я — интактные, 2-я и 3-я — подвергнутые хроническому эмоционально-болевому стрессу. Хронический эмоционально-болевой стресс моделировали, подвергая крыс в течение 30 сут (по 2 ч в сутки) воздействию эмоционально-болевого стресса, который вызывали, подавая через каждые 10 с в произвольном режиме один из сигналов: вспышку света, звук силой 70 дБ или электрокожное раздражение пороговой силы (длительность каждого из сигналов 1 с) [1]. Животные 3-й группы на протяжении всего периода развития хронического эмоционально-болевого стресса в качестве единственного источника жидкости получали 15 % раствор этанола.

Крыс декапитировали, извлекали головной мозг, разделяли его на соответствующие отделы и гомогенизировали в 50 мМ натрий-ацетатном буфере pH 5,6. Для получения растворимой и мембранной фракций гомогенат центрифугировали 60 мин при 20 000 g.

Активность карбоксипептидазы Н определяли по [12] с некоторыми изменениями. К 200 мкл препарата фермента (конечная концентрация белка в пробе 0,06–0,14 мг/мл) добавляли 200 мкл 2,5 мМ CoSO₄ в 50 мМ натрий-ацетатном буфере pH 5,6 (или 200 мкл буфера). Через 8 мин инкубации при 37 °C прибавляли 100 мкл раствора дансил-фенил-лей-арг в 50 мМ натрий-ацетатном буфере pH 5,6 (конечная концентрация 42 мкМ). Реакцию останавливали через 20 мин прибавлением 50 мкл 1 н. HCl. К пробам прибавляли по 2 мл хлороформа, встряхивали в течение 40 с и центрифугировали 5 мин при 1000 об/мин. В нижней хромоформной фазе изме-

ряли флюоресценцию на флюориметре ФМЦ-2 при λ_{ex} 360 нм и λ_{em} 530 нм. Активность карбоксипептидазы Н определяли как разность в флюоресценции проб, содержащих и не содержащих кобальт, и выражали в наномолях образованного продукта (дансил-фенил-лей) на 1 мин инкубации на 1 мг свежей ткани или на 1 мг белка. Белок определяли по [13].

Полученные результаты обрабатывали статистически [6].

Результаты и обсуждение. У животных, подвергнутых хроническому эмоционально-болевому стрессу, наблюдали агрессивное поведение и снижение массы тела на 20–25 г за 30 сут по сравнению с крысами контрольной группы. У крыс, которые наряду с эмоционально-болевым стрессом получали этанол, эти признаки отсутствовали.

При хроническом эмоционально-болевым стрессе в гипоталамусе и гипофизе отмечали повышение активности карбоксипептидазы Н как в мембранной, так и в растворимой фракциях (см. таблицу). В гипофизе активность фермента в растворимой и мембранной фракциях повышалась примерно одинаково (на 48 и 43 % соответственно), а в гипоталамусе активность в растворимой фракции повышалась немного существенней, чем в мембранной (на 99 и 35 % соответственно). В среднем мозгу наблюдали повышение активности фермента только в мембранной фракции (на 30 %). В других отделах достоверных изменений не обнаружено.

Таким образом, при хроническом эмоционально-болевым стрессе активность карбоксипептидазы Н наиболее существенно изменялась в гипофизе и гипоталамусе, т. е. в тех отделах, которые играют ведущую роль в формировании стрессорных реакций [14].

У крыс, получавших этанол на фоне развития хронического эмоционально-болевого стресса, по сравнению с крысами, не получавшими этанол, в гипофизе достоверных изменений активности карбоксипептидазы Н не наблюдали. В мембран-

Влияние этанола на активность растворимой (Р) и мембранно-связанной (М) карбоксипептидазы Н в отделах мозга крыс при хроническом эмоционально-болевым стрессе, в имоль дансил-фенил-лей, освобожденного при гидролизе дансил-фенил-лей-арг за 1 мин на 1 мг ткани (1) и 1 мг белка (2) ($M \pm m$; $n=6 \pm 8$)

Группа животных	Карбоксипептидаза Н	Гипофиз		Гипоталамус		Средний мозг	
		1	2	1	2	1	2
Норма	Р	0,30±0,03	9,3±0,9	0,0087±0,0006	1,18±0,08	0,0118±0,0006	1,30±0,07
	М	0,46±0,04	8,9±0,9	0,055±0,007	0,77±0,10	0,051±0,003	0,65±0,04
Хронический эмоционально-болевой стресс	Р	0,44±0,03***	13,8±0,09	0,0174±0,0008***	2,35±0,11	0,0110±0,0009	1,21±0,10
	М	0,66±0,06***	12,7±1,2	0,074±0,004***	1,04±0,06	0,066±0,005***	0,85±0,06
Потребление этанола при хроническом эмоционально-болевым стрессе	Р	0,37±0,05	11,6±1,1	0,0139±0,0009***	1,88±0,12	0,0137±0,0010***	1,51±0,11
	М	0,78±0,17*	15,0±3,3	0,080±0,008***	1,13±0,11	0,060±0,002***	0,77±0,03

Продолжение

Группа животных	Карбоксипептидаза Н	Стриатум		Гиппокамп		Серое вещество	
		1	2	1	2	1	2
Норма	Р	0,0110±0,0008	1,55±0,11	0,0161±0,0013	2,11±0,17	0,0100±0,0003	1,06±0,03
	М	0,050±0,004	0,64±0,05	0,067±0,006	0,88±0,08	0,034±0,003	0,47±0,04
Хронический эмоционально-болевой стресс	Р	0,0116±0,0009	1,63±0,13	0,0169±0,0016	2,14±0,20	0,0100±0,0014	1,06±0,15
	М	0,050±0,002	0,64±0,03	0,071±0,007	0,93±0,09	0,034±0,001	0,47±0,02
Потребление этанола при хроническом эмоционально-болевым стрессе	Р	0,0108±0,0022	1,52±0,31	0,0124±0,0005*****	1,57±0,06	0,0116±0,0004****	1,23±0,04
	М	0,066±0,006***	0,85±0,08	0,105±0,003****	1,38±0,04	0,028±0,001****	0,39±0,01

Примечание. Одна звездочка — $p < 0,05$, две — $p < 0,01$, три — $p < 0,001$; звездочка — p дано по отношению к норме, крестик — p дано по отношению к хроническому эмоционально-болевому стрессу.

ной фракции гипоталамуса изменений активности фермента также не отмечали, но в растворимой фракции гипоталамуса наблюдали некоторое снижение активности фермента (на 20 %), однако, несмотря на это, активность была значительно выше, чем в норме (на 59 %).

Потребление этанола вызывало некоторое снижение увеличения активности фермента в мембранной фракции среднего мозга при хроническом эмоционально-болевым стрессе (на 9 %), однако активность оставалась выше, чем в норме (на 18 %).

В растворимой фракции серого вещества и среднего мозга наблюдали повышение активности карбоксипептидазы H (на 16 и 25 % соответственно), тогда как в мембранной фракции этих отделов активность фермента снижалась (на 17 и 9 % соответственно), причем в мембранной фракции серого вещества активность снижалась ниже уровня нормы.

Наиболее выраженные изменения активности карбоксипептидазы H при хроническом эмоционально-болевым стрессе на фоне потребления этанола наблюдали в мембранной фракции гиппокампа и стриатума, где активность фермента повышалась на 48 и 33 % соответственно. Вместе с тем в растворимой фракции гиппокампа активность фермента снижалась (на 25 %), а в растворимой фракции стриатума не изменялась.

Необходимо отметить, что при хроническом эмоционально-болевым стрессе на фоне потребления этанола активность карбоксипептидазы H изменялась неоднозначно, что, вероятно, отражает различную роль этих отделов в формировании ответа как на стресс, так и на потребление этанола. При этом разнонаправленные изменения активности растворимой и мембранно-связанной форм фермента в сером веществе, среднем мозгу и гиппокампе связаны, вероятно, с предполагаемым различием роли этих форм ферментов, возможно, со способностью мембранно-связанной формы фермента переходить в растворимую [3, 11]. Наши данные косвенно подтверждают предположение о том, что мембранно-связанная и растворимая формы карбоксипептидазы H могут участвовать в процессинге различных нейропептидов [3].

Особенности используемой нами модели не позволяют сравнивать изменения активности фермента в отделах мозга с единичными на сегодня литературными данными об изменении содержания нейропептидов при совместном воздействии этанола и стресса [3, 16]. Однако полученные результаты позволяют предположить, что карбоксипептидаза H, вероятно, участвует в увеличении биосинтеза секретируемых пептидов гипоталамуса и гипоталамуса при стрессе. Исходя из того, что этанол при хроническом эмоционально-болевым стрессе заметно не влияет на активность фермента в гипоталамусе и гипоталамусе, но вызывает существенное повышение активности

в стриатуме и гиппокампе — отделах лимбической системы, особенно богатых энкефалинами [9], можно предположить, что этанол оказывает антистрессорное воздействие не столько через гипоталамус-гипофизарную систему, сколько через систему опиоидных пептидов. Это предположение подтверждается и литературными данными о роли энкефалинергической системы в ограничении стрессорных реакций [7].

ЛИТЕРАТУРА

1. Ведяев Ф. П. // Журн. выпш. нервн. деят. — 1977. — № 2. — С. 325—327.
2. Голова И. Д. // Алкоголизм. — М., 1989. — С. 53—54.
3. Гомазков О. А., Григорьянц О. О. // Успехи соврем. биол. — 1989. — № 4. — С. 109—124.
4. Григорьянц О. О., Гомазков О. А. // Вопр. мед. химии. — 1986. — № 3. — С. 15—20.
5. Кампов-Полевой А. Б. // Фармакология экспериментального алкоголизма / Под ред. Ю. В. Бутова. — М., 1982. — С. 130—135.
6. Ойвин И. А. // Пат. физиол. — 1960. — № 4. — С. 76—85.
7. Слепешкин В. Д., Лишманов Ю. Б., Золов Г. К., Трун И. А. // Успехи физиол. наук. — 1985. — № 4. — С. 106—118.
8. Юхананов Р. Ю., Рожанец В. В., Майский А. И. // Бюл. экспер. биол. — 1989. — № 10. — С. 455—457.
9. Янг Х.-Ю. Т., Хонг Дж. С., Фратта В., Коста Е. // Эндорфины / Под ред. Э. Коста, М. Трабукки. — М., 1981. — С. 155—164.
10. Fricker L. D. // Trends Neurosci. — 1985. — N 5. — P. 210—214.
11. Fricker L. D. // J. Cell. Biochem. — 1988. — Vol. 38. — P. 279—289.
12. Fricker L. D., Snyder S. H. // Proc. nat. Acad. Sci. USA. — 1982. — Vol. 79. — P. 3886—3890.
13. Lowry O. H., Rosebrough N. J., Farr A. L., Randall R. J. // J. biol. Chem. — 1951. — Vol. 193. — P. 265—275.
14. Makara S. B., Palkovits M., Chentagotnai J. // Selye's Guide to Stress Research / Ed. H. Selye. — New York, 1980. — P. 280—337.
15. Masatoshi T., Ishou S., Yoshishige I. // Biomed. and Soc. Aspects Alcohol. and Alcohol. — 1988. — P. 247—250.
16. Rivier C., Toshihiro I., Vale W. // Brain. Res. — 1990. — Vol. 520. — P. 1—5.

Поступила 09.06.91

EFFECT OF ETHANOL CONSUMPTION ON ACTIVITY OF CARBOXYPEPTIDASE H IN BRAIN OF RATS WITH CHRONIC EMOTIONAL-PAINFUL STRESS

A. N. Vernigora, M. T. Gengin

Pedagogical Institute, Penza

With ethanol consumption, activity of carboxypeptidase H was increased in all the brain regions of rats with chronic emotional-painful stress. The most distinct increase of enzyme activity was found in the striatum membrane fraction and in the hippocampus. Carboxypeptidase H appears to be involved in development of stress reactions under conditions of ethanol consumption via the enkephalinergetic system.

Г. А. Грибанов, Д. В. Ильяшенко

ЛИПИДЫ СЕРОГО И БЕЛОГО ВЕЩЕСТВА ГОЛОВНОГО МОЗГА КРЫС ПРИ АУТОЛИЗЕ

Тверской университет

В литературе мало сведений об изменениях биохимических компонентов мозга при аутолизе. Но этот вопрос приобретает важное значение в связи с решением ряда проблем танатогенеза [2, 7, 8, 11].

Липиды мозговой ткани проявляют неодинаковую устойчивость к аутолизу. Так, отмечена сравнительно высокая стабильность липидного компонента головного мозга в процессе длительного аутолиза [14]. Напротив, при изучении липидного состава мозговой ткани на ранних стадиях ишемии и в ходе клинической смерти наблюдали значительную лабильность отдельных липидных компонентов (главным образом фосфолипидов — ФЛ и незэстерифицированных жирных кислот) [8, 12, 16].

Представляет интерес сравнительное изучение изменений состава липидов серого и белого вещества головного мозга крыс на разных сроках аутолиза (6—7 мин, 1, 4, 24 ч). Выбор указанных сроков был обусловлен попыткой выявить сходство и различия в изменениях липидного компонента мозговой ткани как на ранних, близких к периоду клинической смерти этапах аутолиза (6—7 мин, 1 ч), так и на более поздних этапах (4, 24 ч), соответствующих достаточно глубоким и, как правило, необратимым изменениям в мозговой ткани.

Методика. Эксперименты проводили на беспородных белых крысах-самцах массой 170—250 г, содержащихся на стандартном рационе. Декапитацию осуществляли после короткого эфирного наркоза (рауш-наркоз) и быстро (в течение 20—35 с) извлекали мозг. В связи с тем что многие биохимические изменения в мозге начинаются уже в первые минуты ишемии, были исследованы образцы мозга сразу и через 6—7 мин после декапитации. Для ускоренного получения образцов мозга было разработано специальное устройство, принцип действия которого основан на быстром и качественном получении тонких срезов головного мозга с последующим выделением из них участков серого и белого вещества. В экспериментах использовали главным образом заднеоблобную и темные области неокортекса и соответствующие им участки белого вещества головного мозга. Полученные образцы серого и белого вещества массой 20—30 мг инкубировали в асептических условиях в чашках Петри в термостате при 37 °С в условиях 100 % относительной влажности в течение 1, 4 и 24 ч [3]. Для определения изменений массы навесок в ходе аутолиза их взвешивали до и после инкубации. Все работы по приготовлению образцов мозга проводили быстро и без охлаждения с целью исключения искусственного ингибирования интенсивно развивающихся посмертных процессов. Выделенные образцы гомогенизировали в смеси хлороформ — метанол (2:1 по объему). Экстракцию липидов проводили в течение 1,5—2 ч с последующей отмывкой экстрактов от нелипидных примесей по Фолчу [13]. Количественное определение общих липидов (ОЛ), их фракционирование с использованием тонкослойной хроматографии на силикагеле («Септарол») и последующий количественный анализ отдельных липидных фракций проводили по методикам, описанным ранее [4, 5]. Результаты экспериментов обрабатывали статистически с использованием критерия Стьюдента [10].

Результаты и обсуждение. В условиях инкубации навесок ткани различных отделов го-

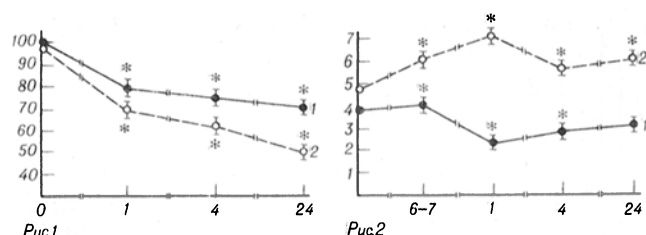


Рис. 1. Изменение массы навесок ткани серого (1) и белого (2) вещества головного мозга крыс при аутолизе.

По оси абсцисс — сроки инкубации, ч; по оси ординат — масса навесок (в %) к нулевому времени инкубации. Здесь и в табл. 2: звездочка — достоверные различия с контролем (0) ($p < 0.05$; $n = 8-10$).

Рис. 2. Изменения содержания общих липидов в ткани серого (1) и белого (2) вещества головного мозга крыс при аутолизе.

По оси абсцисс — сроки инкубации (1,4 ч, 6—7 мин); по оси ординат — содержание общих липидов (мг % · 10³).

ловного мозга крыс при 37 °С во влажной камере их масса значительно уменьшается. Как видно из рис. 1, у белого вещества по сравнению с серым наблюдается более интенсивное снижение массы навесок. Наиболее резкая потеря массы происходит в ранние сроки аутолитических процессов. Уже к первому часу инкубации в сером веществе она составила 80 %, а в белом — 70 % от исходной величины. Далее изменения массы навесок происходят более плавно (4 ч), достигая к 24 ч инкубации 70 % для серого вещества и до 50 % для белого вещества от исходных значений.

Основной причиной уменьшения массы навесок ткани мозга в ходе аутолиза, на наш взгляд, является потеря ими свободной и структурированной воды. При этом, несмотря на то что в сером веществе головного мозга содержание воды несколько выше, чем в белом [9], при аутолитической деструкции белое вещество теряет в массе больше, чем серое. Этот феномен потери массы навесок наблюдался и в других аутолизующихся тканях [5]. Не исключено, что эти процессы сопровождаются также увеличением выхода CO₂, являющегося продуктом распада ряда биохимических компонентов клетки.

Как видно из рис. 2, количество ОЛ в ткани серого и белого вещества головного мозга крыс при инкубации претерпевало ряд изменений. Следует отметить, что в зависимости от времени инкубации эти изменения носили как сходный, так и различный характер. На ранних сроках (6—7 мин) отмечали лишь незначительное возрастание количества ОЛ в сером и белом веществе мозга. Через 1 ч инкубации в белом веществе наблюдалась тенденция к увеличению содержания ОЛ, напротив, для серого вещества характерным было снижение их содержания. К 4 и 24 ч инкубации уровень ОЛ в ткани серого и белого вещества был близок к исходным значениям.

На рис. 3, а, б представлены данные об изменениях состава липидов серого и белого вещества головного мозга крыс при аутолизе. Как видно из рис. 3, а к 6—7 мин относительное содержание ФЛ серого вещества снижалось до 57 % от исходных значений. Для свободного холестерина (Х) отмечено незначительное уменьшение его количества с параллельным нарастанием эфиров холестерина (ЭХ). Содержание триацилглицеридов (ТГ) имело тенденцию к увеличению, а доля

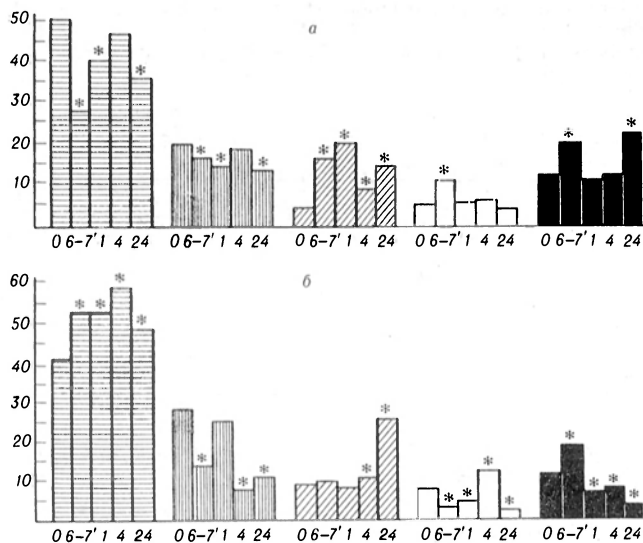


Рис. 3. Изменения соотношения отдельных фракций липидов ткани серого (а) и белого (б) вещества головного мозга крыс при аутолизе.

По оси абсцисс — сроки инкубации (1,4 ч, 6—7 мин); по оси ординат — % от суммы фракций. Столбики с горизонтальной штриховкой — ФЛ, с вертикальной штриховкой — Х, с косой штриховкой — СЖК, светлые столбики — ТГ, темные — ЭХ. Звездочка — достоверные различия с контролем (0) ($p < 0,05$; $n = 5-6$).

свободных жирных кислот (СЖК) возрастала более чем в 3 раза.

Через 1 ч инкубации относительное содержание ФЛ увеличивалось и составило 40 % от суммы фракций. Содержание Х незначительно снижалось, а в концентрации ТГ и ЭХ были близки к исходным значениям. Количество СЖК продолжало прогрессивно нарастать.

К 4 ч инкубации наблюдалось увеличение относительного количества ФЛ, которое было близким к исходной концентрации, с параллельным уменьшением содержания СЖК. Содержание остальных фракций (ТГ, ЭХ, Х) существенно не изменялось.

Через 24 ч количество ФЛ снижалось на 30 % от исходных значений, а уровень СЖК возрастал более чем в 2 раза по сравнению с исходной величиной. Наблюдалось незначительное уменьшение количества Х, сопровождающееся накоплением ЭХ. Содержание ТГ практически не изменялось.

В белом веществе головного мозга уже на ранних этапах (6—7 мин) также наблюдались изменения соотношений отдельных липидных фракций (см. рис. 3, б). Содержание ФЛ возрастало от 42 % в исходном состоянии до 52 % от суммы фракций. Количество Х снижалось вдвое с параллельным нарастанием ЭХ. Концентрация ТГ уменьшалась до 40 % от исходных значений, а количество СЖК при этом существенно не изменялось.

К 1 ч инкубации количество ФЛ оставалось на прежнем уровне, содержание Х вновь приближалось к исходным значениям, что сопровождалось резким уменьшением доли ЭХ. Содержание остальных фракций (СЖК, ТГ) изменялось незначительно.

Через 4 ч в переживающей ткани белого вещества головного мозга крыс количество ФЛ несколько возрастало, вместе с тем наблюдалось снижение концентрации Х с параллельным увеличением доли ЭХ. К 24 ч отмечено резкое возрастание количества СЖК (в 3 раза по сравнению

с исходным значением), сопровождающееся снижением содержания ФЛ, ТГ и ЭХ, но в разной степени.

Анализ полученных данных позволяет предположить наличие как общих, так и принципиально различных механизмов деградации отдельных липидных компонентов ткани серого и белого вещества головного мозга крыс на разных сроках аутолитического процесса. Содержание одних изменялось мало, других — резко снижалось. Изменение количества ряда фракций носило разнонаправленный характер. Следует отметить, что именно в ранние (6—7 мин) и поздние (24 ч) сроки аутолиза липиды серого и белого вещества подвергались наибольшим изменениям. Вместе с тем следует отметить тенденцию к возврату через 4 ч инкубации относительного содержания практически всех липидных фракций серого вещества (ФЛ, Х, ЭХ и в меньшей степени СЖК и ТГ) к уровню исходных значений, а через 24 ч вновь наблюдаются изменения, сходные с таковыми через 6—7 мин. В белом веществе эта тенденция имела лишь частичное проявление. Немаловажное значение в настоящих процессах, вероятно, имеет снижение (на определенных этапах инкубации) активности некоторых липолитических ферментов, связанное с обезвоживанием образцов мозга в динамике посмертного аутолиза.

Обращает на себя внимание и то, что в сером веществе в отличие от белого происходит резкий спад уровня ФЛ, особенно на ранних, а также на поздних этапах инкубации, который сопровождается существенным нарастанием доли как СЖК, так и ТГ и ЭХ.

Наблюдаемое в ранние сроки накопление ТГ и ЭХ, а к 24 ч главным образом ЭХ свидетельствует о проявлении сложных метаболических отношений между ацилсодержащими компонентами (ФЛ, ТГ, ЭХ) через общий пул СЖК [5, 6] и предполагает участие в аутолитической деградации липидов мозговой ткани не только гидролазных, но и трансацилазных механизмов.

В ткани белого вещества на ранних и промежуточных сроках аутолиза (6—7 мин и 4 ч) основной фракцией, количество которой снижается, является Х, тогда как в поздние сроки — ЭХ. При этом через 6—7 мин происходит накопление ЭХ и незначительное — ФЛ, а к 24 ч — СЖК. Эти данные указывают на то, что на первоначальных этапах аутолиза (6—7 мин) протекают реакции эстерификации Х, активация которых, очевидно, связана с изменением ионного баланса (понижение pH) [1, 15] в ткани белого вещества и с использованием пула СЖК, образующихся, вероятно, при гидролизе ТГ, но не ФЛ. Вместе с тем в поздние сроки наблюдается выраженный гидролиз ЭХ с резким накоплением Х и СЖК, некоторая часть которых (СЖК) может быть также продуктом гидролиза ТГ.

Несмотря на большую стабильность липидов белого вещества по сравнению с серым, наблюдаемое в ходе аутолиза уменьшение относительного содержания Х в белом веществе головного мозга через 6—7 мин, 4 и 24 ч инкубации свидетельствует о возможном снижении ригидности нейрональных мембран (мислиновых и др.), что, очевидно, приводит к увеличению подвижности мембранных липидов и может являться одной

из причин возрастания относительного содержания некоторых фракций (ФЛ, ЭХ). Другим источником структурных компонентов для образования ФЛ при аутолизе могут служить и отдельные продукты распада углеводов [5].

Не исключено, что отмеченные изменения липидов в сером и в белом веществе головного мозга будут существенно влиять на проявление их физиологических функций, особенно на ранних (6—7 мин, 1 ч) этапах аутолиза, а это, вероятно, отразится на степени обратимости (например, в ходе реанимации) процессов аутолитической деструкции мозговой ткани.

Таким образом, можно полагать, что в ранние сроки аутолитического процесса в сером веществе головного мозга крыс активируются главным образом различные фосфолипазы, а в белом веществе — ТГ-липазы и холестеролэстеразы с превалированием в последнем синтетазного механизма. Вместе с тем в поздние сроки инкубации в белом веществе отмечается выраженный гидролиз ЭХ. Полученные данные свидетельствуют также о возможном участии в ходе аутолитических процессов в ткани серого и белого вещества головного мозга крыс комплекса не только гидролазных, но и трансацилазных и иных механизмов деградации их липидного компонента.

ЛИТЕРАТУРА

1. Брокерхоф Х., Дженсен Р. // Липолитические ферменты / Под ред. А. Е. Браунштейна, Е. В. Гориченковой: Пер. с англ. — М., 1978.
2. Бурлакова Е. Б. // Исследование памяти. — М., 1990. — С. 145—153.
3. Голубев В. П., Грибанов Г. А., Козельцев В. П. // Вопр. мед. химии. — 1987. — № 6. — С. 186.
4. Грибанов Г. А., Сергеев С. А. // Лаб. дело. — 1975. — № 6. — С. 652—655.
5. Грибанов Г. А. Исследование биохимических превращений липидов биологических структур при аутолизе: Дис. ... д-ра биол. наук. — Калинин, 1986.
6. Грибанов Г. А. // Успехи соврем. биол. — 1979. — Т. 87, № 1. — С. 16—32.
7. Лушиков Е. Ф., Шапиро Н. А. Аутолиз. — М., 1978.
8. Неговский В. А., Гурвич А. М., Золотокрылина Е. С. Постреанимационная болезнь. — М., 1987. — С. 155—159.
9. Нейрохимия / Под ред. Н. И. Прохоровой. — Л., 1979.
10. Плохинский Н. А. Алгоритмы биометрии. — М., 1980.
11. Полежаев Л. В., Александрова М. А. Трансплантация ткани мозга в норме и патологии. — М., 1986.
12. Bazan N. C., Rodriguerde Tured E. // Advanc. Neurol. — 1980. — Vol. 28. — P. 197—205.
13. Folch J. J., Lees M. J., Sloanes G. // J. biol. Chem. — 1957. — Vol. 226. — P. 497—502.
14. Lindlar F. // Z. klin. Chem. Klin. Biochem. — 1967. — Bd 5, N 5. — S. 251—253.
15. Riddle M. et al. // Biochim. biophys. Acta. — 1975. — Vol. 388, N 3. — P. 339—348.
16. Webster G., Thompson R. // Nature. — 1965. — Vol. 498. — P. 74—75.

Поступила 14.01.91

LIPIDS OF RAT BRAIN GRAY AND WHITE MATTERS IN AUTOLYSIS

G. A. Gribanov, D. V. Ilyashenko

State University, Tver.

A decrease in relative content of phospholipids and cholesterol simultaneously with increase in cholesterol esters and free fatty acids were detected in tissues of rat brain gray and white matters during autolysis at 37° within 6-7 min, 1, 4 and 24 hrs; the most distinct alterations were observed in lipids of the gray matter especially at early (6-7 min) and late (24 hrs) stages of autolysis. In the gray matter, relative

content of all the lipid fractions studied was restored to initial level within 4 hrs of incubation. In the white matter, during autolysis the content of cholesterol varied, the content of phospholipids was only slightly increased, while the level of free fatty acids was increased only at 24 hrs of incubation with synchronous decrease in content of triacylglycerols, cholesterol and, partially, phospholipids. These experimental data are of importance in resuscitation. Both common and dissimilar mechanisms of these lipid alterations are discussed. Not only the complex of hydrolase reactions but also that of transacylase and other reactions, involved in the degradation and biotransformation of brain lipids in autolysis, were noted.

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 1993

УДК 616.33+616.342]-052.2-07:[616.155.1-008.931+616.33-008.831

И. А. Переслегина, Е. А. Жукова, Л. А. Беленцова,
Ж. В. Антипина

АНТИОКСИДАНТНЫЕ КОМПОНЕНТЫ ЭРИТРОЦИТОВ И ПИЩЕВАРИТЕЛЬНЫХ СЕКРЕТОВ ПРИ ГАСТРОДУОДЕНАЛЬНОЙ ПАТОЛОГИИ У ДЕТЕЙ

НИИ педиатрии Минздрава РФ, Нижний Новгород

Установлено, что в патогенезе хронических гастродуоденитов и язвенной болезни важное место принадлежит активации перекисного окисления липидов (ПОЛ) [2, 3]. В настоящее время внимание исследователей сосредоточено на изучении механизмов нарушения перекисного гомеостаза [3, 4, 8—10]. Однако в детской гастроэнтерологии работы этого направления единичны [7, 12, 15]. Существование возрастных особенностей ПОЛ и антиоксидантной защиты [1, 17, 18, 28] не позволяет непосредственно перенести результаты исследований у взрослых больных в педиатрическую практику. Кроме того, практически отсутствуют исследования антиоксидантных свойств пищеварительных секретов, что могло бы составить основу дифференцированного применения антиоксидантов.

В настоящей работе изучено состояние антиоксидантной защиты организма детей при хроническом гастродуодените и язвенной болезни двенадцатиперстной кишки.

Методика. Обследовано 55 детей с хроническим гастродуоденитом (ХГД) и 58 детей с язвенной болезнью двенадцатиперстной кишки (ЯБДПК) в возрасте от 5 до 16 лет. Длительность заболевания составила 1,5—7 лет. В контрольную группу вошли 20 практически здоровых детей. Диагноз устанавливали на основе клинико-anamnestических данных, рентгенологического и эндоскопического исследования желудка и двенадцатиперстной кишки. Функции желудка оценивались по данным фракционного желудочного зондирования. У всех больных при поступлении в стационар была выявлена фаза обострения процесса в гастродуоденальной слизистой оболочке. В клинике дети получали традиционное лечение, включающее диету, седативные средства, антациды, спазмолитики, препараты холинергического ряда. Длительность пребывания больных с ХГД в клинике составила в среднем 21 день, ЯБДПК — 44 дня. Исследования проводили до начала лечения, при выписке из стационара и в отдаленные сроки (до 8 мес) после выписки.

В эритроцитах, слюне и желудочном соке определяли ферментативные и неферментативные компоненты антиоксидантной системы. Кровь забирали натощак в пробирки с 3,8 % раствором цитрата натрия и ЭДТА. Эритроциты отмывали физиологическим раствором общепринятым способом. Слюну собирали в течение 10 мин, добавляли ЭДТА (1 мг на 1 мл), центрифугировали 10 мин при 3000 об/мин, исследовали супернатант. Желудочный сок получали методом зондирования по

Антиоксидантные компоненты эритроцитов, слюны и желудочного сока при гастродуоденальной патологии у детей

Показатель	Здоровые	Гастродуоденальная патология	
		обострение	неполная клиническая ремиссия
Эритроциты:			
каталаза, с ⁻¹ /г Нb	89,3±8,4	128,0±10,0*	99,1±7,8
СОД, ед/мин·г Нb	437±49	266±19*	371±60
ГП, мкмоль/мин·г Нb	598±35	381±32*	419±45*
ГР, мкмоль/мин·г Нb	3,6±0,7	3,3±0,3	2,8±0,5
ГТ, мкмоль/мин·г Нb	2,4±0,2	3,2±0,3	2,5±0,1
Г-SH, мкМ/л крови	1066±30	1042±25	1027±44
Г-SS-Г, мкМ/л крови	51,2±5,8	45,0±6,0	48,4±6,5
ПГ, %	7,8±0,3	12,8±1,3*	8,2±0,8
	(n=20)	(n=100)	(n=78)
Слюна:			
каталаза, с ⁻¹ /г белка	14,2±1,6	17,3±0,8	17,4±2,5
СОД, ед/мин·г белка	2889±340	1201±213*	1636±200*
ГП, мкмоль/мин·г белка	1984±205	903±30*	961±142*
ГР, мкмоль/мин·г белка	14,4±1,2	12,8±1,7	12,2±1,3
ГТ, мкмоль/мин·г белка	6,2±0,6	7,1±1,0	7,6±1,0
Г-SH, мкМ	51,3±5,5	70,3±5,0	67,7±5,5
Г-SS-Г, мкМ	4,3±1,8	19,2±2,7*	16,0±2,3*
	(n=20)	(n=88)	(n=72)
Желудочный сок стимулированный:			
СУА, ед/мин·л	10 280±1270	7534±488*	7000±920
ГП, мкмоль/мин·г белка	2949±470	849±110*	936±72*
ГР, мкмоль/мин·г белка	28,5±4,4	7,1±0,8*	5,5±1,5*
ГТ, мкмоль/мин·г белка	6,0±0,8	2,5±0,7*	3,3±1,0*
Г-SH, мкМ	91,9±2,5	77,5±6,0	78,3±5,0
Г-SS-Г, мкМ	23,0±7,5	31,0±11,0	24,7±9,0
	(n=15)	(n=56)	(n=77)

Примечание. Звездочка — различия со здоровыми детьми достоверны ($p<0,05$).

Н. И. Лепорскому. Для исследования использовали базальную и стимулированную порции предварительно отфильтрованного желудочного сока. Во всех объектах оценивали активность каталазы [19], супероксиддисмутазы (СОД) [16, 25], глутатионпероксидазы (ГП) [20], глутатионредуктазы (ГР) [29], глутатионтрансферазы (ГТ) [22], содержание восстановленного (GSH) и окисленного (GSSG) глутатиона [14]. Определяли величину перекисного гемолиза (ПГ) эритроцитов [13], которую использовали как косвенный критерий обеспеченности мембран эритроцитов витамином Е [24]. Активность ферментов рассчитывали на 1 г белка или гемоглобина (Нб). Супероксидустраняющая активность (СУА) желудочного сока, имеющая неферментативный характер [11], рассчитана на 1 л. Активность каталазы в желудочном соке не выявлена [11].

Результаты и обсуждение. При гастродуоденальной патологии имеет место нарушение ферментной и неферментной антиоксидантной защиты организма (табл. 1). По степени выявленных изменений изученные объекты расположены следующим образом: эритроциты < слюна < желудочный сок, что свидетельствует о нарушении не только внутриклеточной, но и внеклеточной антиоксидантной защиты слизистой оболочки желудка и двенадцатиперстной кишки. В эритроцитах в фазу обострения снижена активность СОД и ГП на 40 и 36 % соответственно ($p<0,05$). В такой же степени увеличена активность каталазы и ГТ. На 64 % возрастает величина ПГ ($p<0,05$), свидетельствуя о недостатке витамина Е. Увеличение активности каталазы и ГТ можно рассматривать как компенсаторное явление в условиях дефицита других антиоксидантных компонентов [6, 29].

В слюне в фазу обострения, кроме дефицита СОД и ГП, отмечена тенденция к снижению активности ГР, в 4,7 раза возрастает концентрация окисленного глутатиона.

В желудочном соке в фазу обострения снижает

ся СУА желудочного сока (на 30 %; $p<0,05$), выявлен дефицит всех ферментов обмена глутатиона (ГП на 70 %, ГР на 75 %, ГТ на 56 %; $p<0,05$), уменьшается концентрация восстановленного глутатиона при росте содержания его окисленной формы.

В фазу неполной клинической ремиссии (см. табл. 1) нарушения антиоксидантной защиты эритроцитов претерпевают обратное развитие. Сохраняется дефицит СОД и ГП, менее выраженный, чем в фазу обострения (15 %; $p>0,05$ и 30 %; $p<0,05$ соответственно). В слюне и желудочном соке нарушения антиоксидантных свойств остаются выраженными, хотя степень их уменьшается в сравнении с фазой обострения.

В фазу клинической ремиссии достигнутый антиоксидантными компонентами уровень в целом сохраняется. В эритроцитах отмечается тенденция к увеличению ПГ, в желудочном соке происходит дальнейшее снижение СУА, величина которой становится на 40 % ($p<0,05$) ниже, чем у здоровых детей.

Выявлена зависимость изменений антиоксидантной защиты от функционального состояния желудка, которая проявляется более значительным дефицитом антиоксидантных факторов у больных с низкой кислотообразующей функцией желудка. У этих больных обеспеченность эритроцитов витамином Е снижена в 2 раза, в то время как у больных с высокой кислотообразующей функцией только на 24 %. У больных с низким кислотообразованием также более выражен дефицит СУА желудочного сока.

Установлено, что нарушения антиоксидантной защиты взаимосвязаны с характером течения заболеваний. При неблагоприятном течении во всех объектах имеет место глубокая степень наруше-

Антиоксидантные компоненты эритроцитов и пищеварительных секретов в фазу обострения гастроудоденальной патологии при различных вариантах течения

Показатель	Эритроциты		Слюна		Желудочный сок (стимулированный)	
	неблагоприятное течение	благоприятное течение	неблагоприятное течение	благоприятное течение	неблагоприятное течение	благоприятное течение
Каталаза, с ⁻¹ /г	91,3±6,2	127,0±11,0*	9,8±0,8	11,2±1,3	—	—
СОД, ед/мин·г	272±15,5	368±19,0**	1080±220	1395±310	6030±1200	9130±1500
ГП, мкмоль/мин·г	350±20,8	390±32,0	780±132	1200±250	622±100	1575±155***
Г-SS-Г, мкМ	61,5±11,0	46,4±6,3	19,5±5,5	20,3±5,5	53,0±3,3	27,7±4,8**
ПП, %	19,7±1,4	13,1±1,1**	—	—	—	—

Примечание. Достоверность различий между группами: одна звездочка — $p<0,05$, две — $p<0,01$, три — $p<0,001$.

ний, для которой характерен выраженный дефицит витамина Е, активности СОД и ГП при отсутствии компенсаторного увеличения активности каталазы (табл. 2).

Для доказательства патогенетического значения выявленных нарушений проведено исследование взаимосвязи между антиоксидантными свойствами желудочного сока и морфологической характеристикой слизистой оболочки двенадцатиперстной кишки. Оказалось, что активность ГП желудочного сока прямо коррелирует с количеством фибробластов собственной пластинки ворсин ($r=+0,59$; $p>0,05$) и межкрипталльного пространства ($r=+0,65$; $p<0,05$), обеспечивающих регенерационную способность слизистой оболочки. СУА желудочного сока коррелирует с количеством плазматических клеток собственной пластинки ворсин, участвующих в иммунных механизмах защиты слизистой оболочки ($r=+0,59$; $p<0,05$), а также с количеством бокаловидных клеток эпителия ворсин, участвующих в продукции слизи ($r=+0,78$; $p<0,05$). Более глубокой степени нарушения антиоксидантной защиты при неблагоприятном течении гастроудоденальных заболеваний соответствует следующая морфологическая характеристика: количество фибробластов ворсин и межкрипталльного пространства соответственно в 1,5 и 1,8 раза ниже ($p<0,05$), а количество бокаловидных клеток эпителия ворсин на 28 % ниже ($p>0,05$), чем при благоприятном течении заболеваний. Полученные результаты свидетельствуют о регулирующем влиянии антиоксидантных свойств желудочного сока на резистентность слизистой оболочки и соответствуют литературным данным о повреждающем действии на гастроудоденальную слизистую оболочку экзогенных метаболитов кислорода [23] и перекиси водорода [21, 26], а также об уменьшении площади повреждения слизистой оболочки при внутрижелудочном введении СОД и каталазы [5, 27].

Таким образом, снижение резистентности слизистой оболочки двенадцатиперстной кишки в виде нарушения слизеобразования и дисрегенераторных процессов, составляющее морфологическую основу рецидивирующего течения гастроудоденальных заболеваний, взаимосвязано с нарушением антиоксидантной защиты организма. Коррекция нарушений антиоксидантной защиты должна проводиться на органном уровне и уровне целостного организма. Наибольшая степень изменений в желудочном соке обуславливает возможность применения компенсаторной антиоксидант-

ной ферментотерапии и создает основу для разработки антиоксидантных препаратов в виде продуктов лечебного питания.

ЛИТЕРАТУРА

1. Бирюков В. С. Возрастные изменения некоторых показателей перекисного окисления липидов у здоровых детей. — Одесса, 1983. (Деп. во ВНИИМИ. № 7171).
2. Жукова Е. А., Каптерева Л. А., Переслгина И. А. // Педиатрия. — 1989. — № 8. — С. 15—18.
3. Зверихановский Ф. А., Вайнштейн С. Г. // Врач. дело. — 1987. — № 9. — С. 42—47.
4. Зверихановский Ф. А., Жулкевич И. В. // Тер. арх. — 1987. — № 2. — С. 53—55.
5. Зверихановский Ф. А., Симонян М. А., Дегтяр В. В. // Физиол. журн. — 1988. — № 1. — С. 81—86.
6. Кахнов Н. Б., Хмелевский Ю. В. // Укр. биохим. журн. — 1983. — № 1. — С. 86—92.
7. Кмито Н. Л. Клинико-патогенетическая оценка хронических гастроудоденитов у детей: Автореф. дис. ... канд. мед. наук. — Омск, 1988.
8. Куликов В. Ю., Ермолаева В. В., Колесникова Л. И. // Вопр. мед. химии. — 1979. — № 3. — С. 289—292.
9. Моренкова С. А., Тубуцадзе Т. У., Федорова Л. М., Месенко В. П. // Бюл. экспер. биол. — 1987. — № 11. — С. 570—572.
10. Пасечников В. Д., Мосин В. И., Вирганский А. О. // Тер. арх. — 1988. — № 2. — С. 30—33.
11. Переслгина И. А. // Биоантиоксидант. — М., 1989. — Т. 2. — С. 118.
12. Переслгина И. А., Ермолина М. В., Жукова Е. А. и др. // Съезд детских врачей Узбекистана, 3-й: Тезисы докладов. — Ташкент, 1988. — С. 373—374.
13. Покровский А. А., Аббаров А. А. // Вопр. питания. — 1964. — № 6. — С. 44—48.
14. Удинцев Г. Н., Бланк В. Б., Кравец Д. А., Тимесков И. С. // Пособие по клинико-лабораторным методам исследования. — Л., 1986. — С. 68—70.
15. Хамраев А. Х., Рустамов М. Р. // Мед. журн. Узбекистана. — 1987. — № 7. — С. 36—37.
16. Чевари С., Чаба И., Секей И. // Лаб. дело. — 1985. — № 11. — С. 678—681.
17. Шадрин С. А. // Педиатрия. — 1974. — № 12. — С. 44—46.
18. Al-Turk W. Z., Stohs P. G., El-Rashidi F. H., Othman S. // J. Pharm. Pharmacol. — 1987. — Vol. 39, N 1. — P. 13—16.
19. Beers R. F., Sizer I. W. // J. biol. Chem. — 1952. — Vol. 195, N 1. — P. 133—140.
20. Berschneider E., Ruben I. Пат. 210983 ГДР. — N 2438407, С 12 N 9/18.
21. Brain Dunford H. // Free Radiol. Biol. Med. — 1987. — Vol. 3. — P. 405—421.
22. Habig W. H., Pabst M. J., Jacoby W. B. // J. biol. Chem. — 1974. — Vol. 249. — P. 7130.
23. Hiraiishi Hideyuki et al. // Amer. J. Physiol. — 1987. — Vol. 253, N 1. — P. 640—648.
24. Gutcher G. E., Raynor W. J., Farrel P. M. // Amer. J. clin. Nutr. — 1984. — Vol. 40, N 5. — P. 1078—1089.
25. Kakkar Poonam, Das Ballabh, Viswanathan N. // Indian J. Biochem. Biophys. — 1984. — Vol. 21, N 2. — P. 130—132.
26. Link E. M. // Arch. Biochem. — 1988. — Vol. 265, N 2. — P. 362—372.
27. Pascu O., Dejica D. // Rev. roum. Med. interne. — 1987. — Vol. 25, N 2. — P. 81—84.

28. Pinto R. E., Bartley V. // J. Biochem. — 1969. — Vol. 112. — P. 109—115.
 29. Toshiaki M., Taketo O. // Chem. Pharm. Bull. — 1982. — Vol. 30, N 10. — P. 3662—3668.

Поступила 23.07.91

ANTIOXIDANT COMPONENTS OF ERYTHROCYTES AND DIGESTIVE SECRETS IN CHILDREN WITH GASTRODUODENAL DISEASES

I. A. Pereslegina, E. A. Zhukova, L. A. Belentsova, Zh. V. Antipina

Research Institute of Pediatrics, Ministry of Health of the Russian Federation, Nizhni Novgorod.

Enzymatic and nonenzymatic components of the antioxidant system were studied in the erythrocytes, saliva and gastric juice of 20 healthy volunteers, 113 children with chronic gastroduodenitis and duodenal ulcerous disease. A decrease in the activity of superoxide dismutase and imbalance of the glutathione redox system were found both in the erythrocytes and the digestive secrets of children with gastroduodenal pathology. The rate of impairments depended on the gastric functional state, on the nature of disease development; the most pronounced alterations were detected in the gastric juice.

© Е. Ю. ВОЛКОВ, 1993

УДК 616.33+616.342]-002.44-007.251-089.84-089.168-07:[616.153.96:577.112.853

Е. Ю. Волков

СОДЕРЖАНИЕ НЕКОТОРЫХ УГЛЕВОДНЫХ КОМПОНЕНТОВ В СЫВОРОТКЕ КРОВИ И МОЧЕ БОЛЬНЫХ В ОТДАЛЕННЫЕ СРОКИ ПОСЛЕ УШИВАНИЯ ПРОБОДНЫХ ГАСТРОДУОДЕНАЛЬНЫХ ЯЗВ

Ярославский медицинский институт

Ранее мы исследовали содержание углеводов-содержащих биополимеров в крови и моче больных в раннем послеоперационном периоде после ушивания перфоративных язв желудка и двенадцатиперстной кишки [3]. Известно, что отдаленные результаты ушивания прободной язвы желудка и двенадцатиперстной кишки зависят от ряда факторов, в частности от длительности заболевания и морфологической характеристики язвенного дефекта [1, 2, 4, 7].

Выявление зависимости концентрации углеводов-содержащих биополимеров в крови и моче оперированных больных от вышеперечисленных причин и явилось целью настоящей работы.

Методика. Обследовано 128 пациентов (мужчин 112, женщин 16), которым ранее (в сроки от 2 до 16 лет) было выполнено ушивание прободной язвы желудка или двенадцатиперстной кишки. Возраст больных на момент обследования составил от 24 до 64 лет. Желудочный анамнез от начала заболевания до момента перфорации у 28 человек был до 1 года, у 45 — от 1 года до 3 лет, у 28 — от 3 до 5 лет и у 27 — более 5 лет. Прободение острой язвы диагностировано у 30 человек, хроническая язва выявлена у 70 пациентов, у 28 больных обнаружена перфорация каллезной язвы.

Содержание углеводов-содержащих биополимеров исследовали в крови и моче, что позволяло судить о состоянии общего обмена гликопротеинов и выведения продуктов их распада почками. Об общем содержании полисахаридно-белковых соединений судили по концентрации гекоз, обнаруживаемых во всех слизистых биополимерах [8—10]. Содержание фукогликопротеинов, которые обеспечивают защиту слизистой оболочки желудка от повреждающего действия агрессивных факторов желудочного сока и поэтому являются важными для язвенной болезни факторами [5, 11, 13], оценивали по концентрации фукозы. Сиалогликопротеины как показатель активности любого воспалительного процесса [6, 12] учитывали по результатам определения сиаловых кислот. Методики определения описаны нами ранее [3]. Измерения проводили на спектрофотометре фирмы «Karl Zeiss» (Германия). Достоверность различий измеренных величин определяли по таблице Стьюдента.

Результаты и их обсуждение. Исследование концентрации углеводов-содержащих биополимеров в сыворотке крови и моче больных с различными сроками течения язвенной болезни до момента перфорации полностью подтвердило наши предположения (табл. 1).

Приведенные данные указывают на прогрессирующее нарушение активности защитных факторов слизистой оболочки желудка и двенадцатиперстной кишки у больных после ушивания прободных гастродуоденальных язв в зависимости от длительности течения язвенной болезни до момента прободения. Так, если перфорация язвы произошла не позднее года от начала заболевания, то в отдаленные сроки после ушивания перфорации показатели защитного барьера желудка и двенадцатиперстной кишки в крови и моче больных восстанавливались почти до уровня физиологической нормы. У больных с длительностью болезни желудка от 1 года до 3 лет уже наблюдается нарушение защитной функции гастродуоденальной зоны. Правда, снижение показателей гекоз в крови и моче статистически недостоверно. Концентрация фукозы в сыворотке крови увеличивается статистически достоверно ($p<0,05$), а в моче, наоборот, снижена ($p<0,05$). Содержание сиаловых кислот в крови и моче незначительно возрастает ($p>0,05$). У обследован-

Таблица 1

Концентрация (в мМ) гекоз, фукозы и сиаловых кислот в отдаленные сроки после ушивания прободных гастродуоденальных язв в зависимости от длительности язвенной болезни

Углеводный компонент	Норма	Длительность заболевания, годы			
		менее 1	1—3	3—5	более 5
Гекозы	601,73±9,04	606,0±9,81	581,93±11,26	560,71±12,84**	531,17±10,22**
	882,86±4,77	888,71±9,12	870,44±12,46	859,74±22,61*	830,24±11,41**
Фукоза	86,69±6,75	89,25±6,11	94,61±8,12*	76,80±10,63**	68,47±9,24***
	304,30±2,48	300,02±12,34	281,27±14,66*	251,72±16,82**	231,17±18,53***
Сиаловые кислоты	209,98±7,96	212,51±9,36	219,85±11,61	231,76±12,55*	220,66±13,13
	288,47±2,03	289,77±10,41	299,30±11,38	318,15±14,80*	300,47±15,39

Примечание. Здесь и в табл. 2 статистически достоверные различия по сравнению с нормой: одна звездочка — $p<0,05$, две — $p<0,01$, три — $p<0,05$, четыре — $p<0,001$. Над чертой — кровь, под чертой — моча.

Концентрация (в мМ) гексоз, фукозы и сиаловых кислот в отдаленные сроки после ушивания прободных гастродуоденальных язв в зависимости от морфологической характеристики язвенного процесса

Углеводный компонент	Норма	Характер язвы		
		острый	хронический	каллезный
Гексозы	601,73±9,04	603,71±9,65	559,28±14,33**	524,59±14,16****
	882,86±4,77	885,27±8,14	851,17±16,66*	816,65±17,84***
Фукоза	86,69±6,75	88,21±7,35	78,47±11,60*	66,14±12,35****
	304,80±2,48	300,75±9,86	250,64±16,53**	290,80±13,45****
Сиаловые кислоты	209,98±7,96	213,55±8,63	225,75±16,28*	219,88±10,67
	288,47±2,03	289,04±9,56	306,57±17,01*	299,10±16,23

ных пациентов с длительностью язвенной болезни от 3 до 5 лет выявлено нарушение слизистого барьера желудка и двенадцатиперстной кишки. Так, содержание гексоз достоверно снижено как в крови ($p<0,01$), так и в моче ($p<0,05$), фукозы одинаково понижено в крови и моче ($p<0,01$), а сиаловых кислот достоверно превышает норму в исследованных биологических жидкостях ($p<0,05$). У больных, более 5 лет страдавших язвенной болезнью, наблюдаются грубые нарушения защитного барьера желудка и двенадцатиперстной кишки в отдаленные сроки после ушивания перфоративной язвы. Концентрация гексоз в крови и моче резко снижена ($p<0,005$), фукозы резко снижена в крови и моче ($p<0,001$), а сиаловых кислот в исследованных средах не намного превышает среднестатистические значения.

Таким образом, после ушивания прободной язвы, существовавшей до операции не более года, отмечено восстановление защитного барьера желудка и двенадцатиперстной кишки в отдаленные сроки после операции. При увеличении срока заболевания происходит прогрессирующее снижение как общего содержания углеводсодержащих биополимеров (гексозы), так и специфического защитного фактора (фукоза). В то же время воспалительная реакция в зоне ушитой язвы с удлинением срока заболевания, наоборот, возрастает, но у больных с более чем 5-летним язвенным анамнезом воспалительный процесс несколько стихает, незначительно превышая контрольные значения (сиаловые кислоты).

Патоморфологические проявления язвенной болезни, обнаруженные во время операции, также влияют на защитный барьер слизистой оболочки желудка и двенадцатиперстной кишки.

Данные, приведенные в табл. 2, показывают, что возникновение и прогрессирование язвенного процесса приводят к нарастающему подавлению защитного барьера слизистой оболочки желудка и двенадцатиперстной кишки.

У больных с перфорацией острых язв в отдаленные сроки после их ушивания происходит возвращение всех изучаемых параметров защитного барьера гастродуоденальной зоны до уровня физиологической нормы. Ушивание прободной хронической язвы не приводит к нормализации защитных механизмов. Содержание гексоз как в крови, так и в моче достоверно снижены ($p<0,01$). Концентрация фукозы тоже уменьшается в крови и моче ($p<0,01$), а сиаловых кислот, наоборот, возрастает в исследуемых объектах ($p<0,05$). В отдаленные сроки после

ушивания прободных каллезных язв отмечается грубое нарушение защитного барьера желудка и двенадцатиперстной кишки: резко выражено угнетение выработки как общих факторов защитной системы — гексоз ($p<0,005$), так и специфических — фукозы ($p<0,001$).

Таким образом, при углублении морфологических изменений в зоне язвы, происшедших до момента ее перфорации, в отдаленные сроки после ушивания прободения наблюдаются выраженные нарушения защитного барьера слизистой оболочки желудка и двенадцатиперстной кишки. Однако воспалительная реакция нарастает лишь до определенного уровня; при переходе язвы в каллезную наступает снижение воспалительной реакции.

Выполненные биохимические исследования полностью подтверждены результатами клинических обследований с обязательным фиброгастроскопическим контролем.

Выполненные нами исследования показывают необходимость индивидуального выбора метода оперативного лечения перфоративных язв желудка и двенадцатиперстной кишки в зависимости от длительности язвенного анамнеза и морфологических проявлений язвенного процесса, а также методов и длительности послеоперационного лечения больных, перенесших ушивание прободных гастродуоденальных язв.

ЛИТЕРАТУРА

1. Кукош В. И., Учугина А. Ф., Мамаев Ю. Н. // Всесоюзный съезд хирургов, 6-й: Материалы. — Воронеж, 1983. — С. 122—123.
2. Муравьева Л. А., Волков Е. Ю. // Клин. хир. — 1988. — № 4. — С. 11—13.
3. Муравьева Л. А., Волков Е. Ю. // Вopr. мед. химии. — 1988. — № 6. — С. 20—23.
4. Мышкин К. И., Лагун М. А. Перфоративные гастродуоденальные язвы. — Саратов, 1983. — С. 164.
5. Рабинович П. Д. Анализ значения переваривающей силы желудочного сока и некоторых защитных механизмов гастродуоденальной системы в развитии язвенной болезни: Дис. ... д-ра мед. наук. — Чита, 1967.
6. Рычагов Г. П., Пологутин Л. Г., Кан Ч. Я. и др. // Вестн. хир. — 1987. — № 8. — С. 22—36.
7. Сажин В. П., Лукичев О. Д., Жаболенко В. П. и др. // Хирургия. — 1987. — № 5. — С. 52—56.
8. Скляр Е. Я. // Врач. дело. — 1984. — № 5. — С. 26—28.
9. Чертов А. П., Кругликова Л. А. // Всесоюзное науч. о-во гастроэнтерологов: Правление: Пленум: Материалы. — М.: Смоленск, 1988. — С. 565—567.
10. Cooke A. R. // Amer. J. Dig. Dis. — 1976. — Vol. 21, N 2. — P. 155—164.
11. Dayton M. F., Kauffman G. L., Schigel J. F. et al. // Dig. Dis. Sci. — 1988. — Vol. 38, N 5. — P. 449—455.
12. Ibeis K. J. // Terrologia. — 1983. — Vol. 20, N 6. — P. 517—524.

CONTENT OF SOME CARBOHYDRATE COMPONENTS IN THE SERUM AND URINE OF PATIENTS WITHIN LATER PERIODS AFTER SUTURING OF PERFORATED GASTRODUODENAL ULCERS

E. Yu. Volkov

Medical Institute, Yaroslavl

The duration of gastric impairment before perforation as well as morphological features of sutured ulcer were shown to influence the protective functions of the gastric and duodenal mucosal membrane as shown by estimation of hexose, fucose and sialic acids in the blood serum and urine of 128 patients within later periods after saturation of perforated gastroduodenal ulcers. Inhibition of the mucosal membrane protective functions in gastroduodenal tissues was increased with a longer disease period before perforation and with more distinct pathomorphological alterations of the perforated ulcer.

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 1993

УДК 616.127-002-056.3-092.9-085.272-036.8-07.616.127-076.4

Н. В. Карсанов, Л. Е. Гогияшвили, Е. В. Селихова

ДЕЙСТВИЕ НАД И ЦИТОХРОМА С НА СИСТЕМУ ЭНЕРГЕТИЧЕСКОГО ОБЕСПЕЧЕНИЯ И УЛЬТРАСТРУКТУРУ КАРДИОМИОЦИТА ПРИ ТОКСИКО-АЛЛЕРГИЧЕСКОМ МИОКАРДИТЕ

Республиканский научно-исследовательский центр медицинской биофизики Министерства здравоохранения и социального обеспечения Республики Грузия, Тбилиси

Ранее было показано [14], что в основе недостаточности сердца при воспалительных повреждениях миокарда лежит нарушение функционирования всех трех систем кардиомиоцита, ответственных за акт сокращения — расслабление: систем контрактильных белков, энергетического обеспечения миокарда и транспорта кальция.

В основе резкого снижения доступной для использования энергии (в виде АТФ) и особенно ее запаса в кардиомиоците (в виде креатинфосфата — КФ) при воспалительном повреждении миокарда лежат уменьшение содержания НАД [9, 21, 22] и цитохрома с [6, 11].

Показано, что при адреналиновом поражении мышцы сердца парентеральное введение НАД [13] или его предшественника никотинамида [5, 23, 24, 32] и цитохрома с [12, 13] ведет к су-

щественному повышению энергетической обеспеченности миокарда.

Цель настоящей работы — изучить влияние экзогенных НАД и цитохрома с на содержание пиридиновых нуклеотидов, энергетическую обеспеченность и ультраструктуру кардиомиоцита при токсико-аллергическом миокардите (ТАМ).

Методика. Работа проведена на 66 кроликах породы шиншилла массой тела 2,5—3,5 кг. 25 кроликов составляли группу нормальных животных, 41 — с ТАМ. В числе последних: 25 — контрольных, 12 — леченных НАД и 9 — цитохромом с.

ТАМ воспроизводили, как описано ранее [2]; 2 раза внутривенно вводили по 2 мл лошадиной сыворотки крови с интервалом 4 дня и затем через 7 дней 0,5 мл стафилококкового токсина.

При лечении подопытных кроликов НАД (0,5 мг/кг массы) и цитохромом с (5 мг/кг массы) вводили внутривенно с 4-го дня после воспроизведения патологического состояния в продолжение 7 дней. Эвтансию животных (одно-временно подопытного и контрольного) производили под гексеналовым наркозом (300 мг/кг массы) на 10-й день заболевания.

После извлечения сердца иссекали кусочки миокарда левого желудочка, которые сразу же замораживали в жидком азоте и использовали для исследования нуклеотидов адениловой системы и КФ.

Адениловые нуклеотиды экстрагировали, как описано в работе [7], разделяли их на ионно-обменной колонке с ионитом Дауэкс 1Х4, (100Х200 меш) («Serva») в хлорной форме и количественно определяли спектрофотометрически [3]. Энергетический заряд системы адениловых нуклеотидов рассчитывали по [31]. КФ и пиридиновые нуклеотиды определяли, как описано, соответственно, в работах [1] и [29].

Образцы миокарда для электронно-микроскопического исследования брали из левого желудочка сокращающегося сердца.

Материал фиксировали в 2,5 % забуференном растворе глутаральдегида в течение 1,5 ч и в 2 % забуференном растворе OsO₄ pH 7,35, обезвоживали в восходящих концентрациях спирта и оксипропилена и затем заключали в смесь аралдита.

Ультратонкие срезы получали на микротоме LKB 8810А. Срезы контрастировали в 2 % водном растворе уранил-ацетата и лимонно-кислого свинца. Электронно-микроскопические снимки получали на электронном микроскопе ДЖЕМ 100-В («Джеол», Япония).

Количественный анализ митохондрий на электронограммах производили, как описано ранее [19].

В табл. 1—3 приведены число животных (*n*), средние арифметические величины (\bar{X}) и их ошибки ($m_{\bar{X}}$), а также существенность различий между средними (*p*), которую оценивали по критерию *t* Стьюдента [4].

Результаты и обсуждение. При ТАМ 10-дневной продолжительности среднее содержание НАД в миокарде уменьшается относительно нормы на 32,50 % (*p* < 0,001). При этом соотношение НАДН/НАД возрастает (на 71 %) (см. табл. 1).

Таблица 1

Содержание НАД и НАДН (в мкмоль/г влажной ткани) в миокарде левого желудочка кроликов при ТАМ 10-дневной продолжительности

Группа	НАД	НАДН	НАД+НАДН	НАДН/НАД
Норма (8)	0,68±0,02	0,36±0,04	1,08±0,03	0,50±0,036
ТАМ:				
без лечения (8)	0,47±0,05***	0,41±0,05	0,84±0,03***	0,86±0,04***
лечение НАД (5)	0,68±0,04+++	0,33±0,015	1,03±0,03+++	0,46±0,04+++
лечение цитохромом с (6)	0,54±0,04**,\$	0,48±0,09	1,05±0,07+	0,90±0,08\$\$\$

Примечание. Здесь и в таблице 2 и 3: звездочка — сравнение с нормой, плюс — с контролем, параграф — лечения НАД с лечением цитохромом с, отсутствие знака — отсутствие достоверных различий; один знак — *p* < 0,05, два — < 0,01, три — < 0,001; в скобках — число животных.

Содержание нуклеотидов адениловой системы и КФ (в мкмоль/г влажной ткани) в миокарде левого желудочка кроликов при ТАМ 10-дневной продолжительности

Группы, подгруппы	АТФ	АДФ	АМФ	АТФ+АДФ+АМФ	АТФ/АДФ	Энергетический заряд	КФ
Норма (25)	2,5±0,13	2,02±0,12	1,07±0,07	5,52±0,02	1,35±0,12	0,65±0,02	3,4±0,18
ТАМ:							
без лечения (20)	1,3±0,13***	1,49±0,16**	0,78±0,09***	3,56±0,21***	1,05±0,12*	0,57±0,01***	1,52±0,07***
лечение НАД (12)	2,43±0,22+++	2,68±0,33***++	0,58±0,14**	5,57±0,51++	1,14±0,22	0,65±0,04+	1,50±0,12***
лечение цитохромом с (9)	2,19±0,09+++	1,42±0,05***§§	0,62±0,09***	4,24±0,16***+	1,56±0,09++	0,69±0,02+++	2,07±0,22***. +. §

Среднее содержание АТФ в миокарде уменьшается на 48 %, АДФ — на 26,2 % и АМФ — на 27,1 %; общее содержание нуклеотидов адениловой системы снижается на 35,4 %. Отношение АТФ/АДФ и энергетический заряд системы адениловых нуклеотидов снижаются на 12,3 %. Особенно резко (на 55,3 %) уменьшается содержание КФ (см. табл. 2).

Вышеописанные изменения сопровождаются развитием значительного внутриклеточного отека кардиомиоцита и резким уменьшением числа митохондрий (см. табл. 3). Между миофибриллами на протяжении нескольких саркомеров иногда отмечали полное исчезновение митохондрий (рис. 1). Наблюдала также резкое набухание (см. табл. 3) и вакуолизацию митохондрий (см. рис. 1), резкое снижение числа крист в митохондриях, образование в результате слияния набухших митохондрий значительного числа гигантских митохондрий, резкое снижение КЭЭМ (см. табл. 3), резкое расширение саркоплазматического ретикулума (СР), утерю поперечной исчерченности миофибриллами, фрагментацию и деструкцию А- и I-дисков, очаговое расплавление саркомеров и смещение Z-пластин (см. рис. 1), резкое уменьшение содержания цитогранул гликогена в кардиомиоците. При этом поражение не только миокарда, но и кардиомиоцита носит мозаичный характер.

Под воздействием экзогенного НАД среднее содержание НАД в миокарде по сравнению с контрольной величиной возрастает почти в 2 раза ($p<0,001$) и достигает уровня нормы, а среднее содержание НАДН снижается до нижней границы нормы. В результате сумма пиридиновых нуклеотидов возрастает на 23 % ($p<0,001$), а соотношение НАДН/НАД снижается на 47 % ($p<0,001$) и оба показателя нормализуются (см. табл. 1).

Среднее содержание АТФ при лечении НАД по сравнению с контролем возрастает на 86 % ($p<0,001$) и также достигает нормы (см. табл. 2),

а АДФ — увеличивается на 80 % ($p<0,001$) и превышает уровень нормы ($p<0,02$). Содержание АМФ остается в пределах контрольного значения на уровне, который был ниже нормы на 46 % ($p<0,01$). Суммарное содержание адениловых нуклеотидов в результате возрастает по сравнению с контролем в среднем на 56 %. Это обеспечивает нормализацию общего содержания нуклеотидов адениловой системы, соотношения АТФ/АДФ и ее энергетического заряда. При всех этих положительных сдвигах в системе адениловых нуклеотидов содержание КФ совершенно не изменялось, оставаясь на уровне контроля (см. табл. 2). Внутриклеточный отек существенно уменьшался. Все межфибрилярные пространства заполнялись митохондриями, которые местами располагались группами (рис. 2), что приводило к некоторому повышению числа митохондрий на электронограммах (см. табл. 3). Кристы митохондрий утолщались. Однако в некоторых митохондриях часть крист все еще оставались гомогенизированной, отмечались межкристные включения. Наружная мембрана таких митохондрий местами имела расплывчатый контур. Между миофибриллами и вокруг митохондрий, а также в области Z-пластин появлялись гранулы α -гликогена (см. рис. 2). КЭЭМ по сравнению с контролем увеличивается на 85 % ($p<0,05$), хотя и этот показатель все еще остается ниже нормы на 54 % ($p<0,01$; см. табл. 3). Степень расширения каналов СР под влиянием НАД уменьшается, однако встречаются каналы, растянутые в виде кист. Они содержат вещество умеренной оптической плотности. Расположение Z-пластин становится выравненным, А- и I-диски в большинстве случаев становятся различимыми (см. рис. 2).

В аналогичных условиях под влиянием цитохрома с содержание НАД и НАДН в миокарде возрастало до нормы, но соотношение фракций по сравнению с контролем при этом не изменялось (см. табл. 1).

Таблица 3

Количественный анализ митохондрий на ЭГ левого желудочка сердца кроликов при ТАМ 10-дневной продолжительности

Показатели	Интактные кролики (8)	ТАМ		
		без лечения (3)	лечение НАД (3)	лечение цитохромом с (3)
Число митохондрий на 1 ЭГ	20,0±0,72	7,0±0,48***	10,35±2,12**	12,26±1,11***++
Число крист на 1 ЭГ	193,5±24,7	27,0±4,0***	65,4±5,6***++	56,4±1,81***++
Площадь митохондрии (в мкм ²) на 1 ЭГ	3,96±0,25	5,46±0,5***	5,0±0,20*	4,64±0,19*
Площадь одной митохондрии, мкм ²	0,15±0,019	0,66±0,13***	0,5±0,062**	0,38±0,014***+
Число крист на 1 митохондрии	10,0±0,27	4,0±0,57***	5,2±0,9**	4,6±2,64*
КЭЭМ	766±55	191±38***	354±54,7**+	334,4±23,47***++

Примечание. ЭГ — электронограмма, КЭЭМ — коэффициент энергетической эффективности митохондрий.

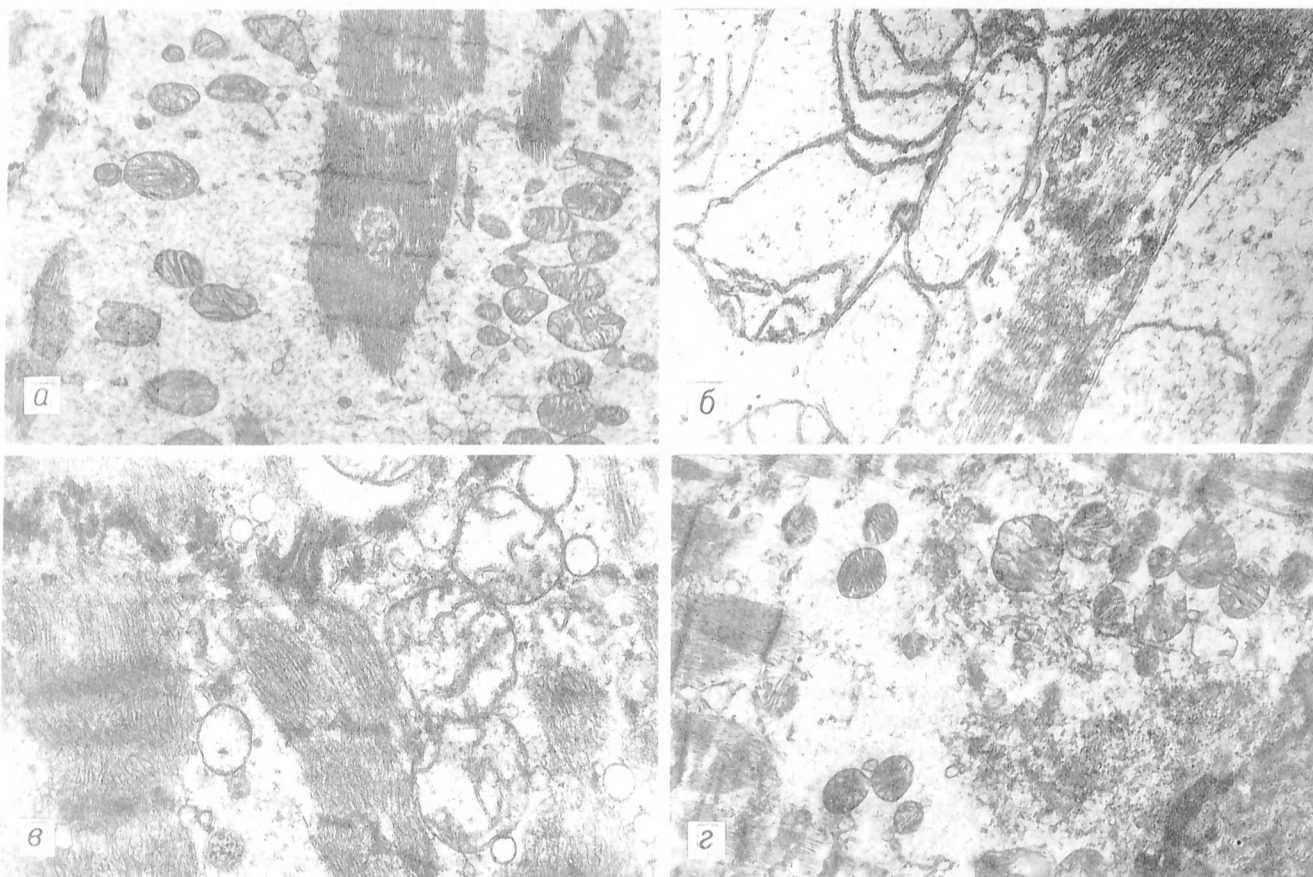


Рис. 1. Ультраструктура кардиомиоцитов левого желудочка кролика при ТАМ.

а — лизис группы саркомеров (С), деструкция митохондрий (Мх). $\times 7000$; б — вымывание матрикса и вакуолизация митохондрий (Мх), отек и расправление миофибрилл (Мф). $\times 17\,000$; в — резкое расширение СР. $\times 1300$; г — фрагментация А- и I-дисков (А), (I), расплавление саркомеров (С), смещение Z-пластинок (Z). $\times 1300$.

Содержание АТФ в миокарде под воздействием цитохрома с увеличивалось по сравнению с контролем на 68 % ($p < 0,001$), достигая нижних пределов нормы. Содержание АДФ оставалось ниже нормы на 30 % ($p < 0,01$), а АМФ — на 42 % ($p < 0,01$). Суммарное содержание адениловых нуклеотидов по сравнению с контролем возрастало на 19 %, не достигая нормы. Соотношение АТФ/АДФ и энергетический заряд нормализовались, содержание КФ под воздействием цитохрома с по сравнению с контролем существенно увеличивалось (см. табл. 2).

Под влиянием цитохрома с резко уменьшался внутриклеточный отек кардиомиоцита и объем митохондрий (рис. 3).

Между митохондриями и миофибриллами появлялись скопления α -гликогена в виде плотных осmioфильных конгломератов. Число митохондрий по сравнению с контролем возрастало на 75 % ($p < 0,01$). Число крист на электронограмме увеличивалось на 108 % ($p < 0,01$); КЭЭМ увеличивался на 75 % ($p < 0,01$) (см. табл. 3), степень расширения СР снижалась, восстанавливались четкие контуры миофибрилл, структура саркомеров и Z-пластин становилась упорядоченной (см. рис. 3).

Таким образом, НАД и цитохром с в меньших, чем микромолярные, концентрациях оказывали выраженное положительное действие на энергетику и структуру кардиомиоцита. Их действие имеет как сходные черты, так и существенные различия. Сходство действия экзогенных НАД

и цитохрома с обусловлено примерно одинаковым повышением в миокарде содержания АТФ, значительным уменьшением внутриклеточного отека и улучшением структуры органелл (митохондрий, миофибрилл, СР) кардиомиоцита, а также появлением гранул α -гликогена.

Различия выражаются в отсутствии нормализующего влияния цитохрома с на содержание и соотношение пиридиновых нуклеотидов, имеющего место в случае применения НАД, существенном повышении под влиянием НАД содержания АДФ при полном отсутствии влияния на него цитохрома с и, наоборот, существенном повышении содержания КФ в случае применения цитохрома с и отсутствии влияния на этот показатель НАД, несколько более выраженном положительном действии цитохрома с на структуру кардиомиоцита.

Повышение содержания АТФ под воздействием экзогенного НАД в основном обусловлено повышением его образования в процессе гликолиза в результате повышения содержания НАД в миокарде и нормализации отношения НАДН/НАД и в связи с этим восстановления гликолитической оксидоредукции нормальной интенсивности, необходимой для протекания гликолиза [15, 21, 22].

Интенсивность гликолиза под влиянием НАД должна возрастать и в результате усиления связывания фосфофруктокиназы (а также других гликолитических ферментов) с мембранами и уменьшением в связи с этим степени ее распада

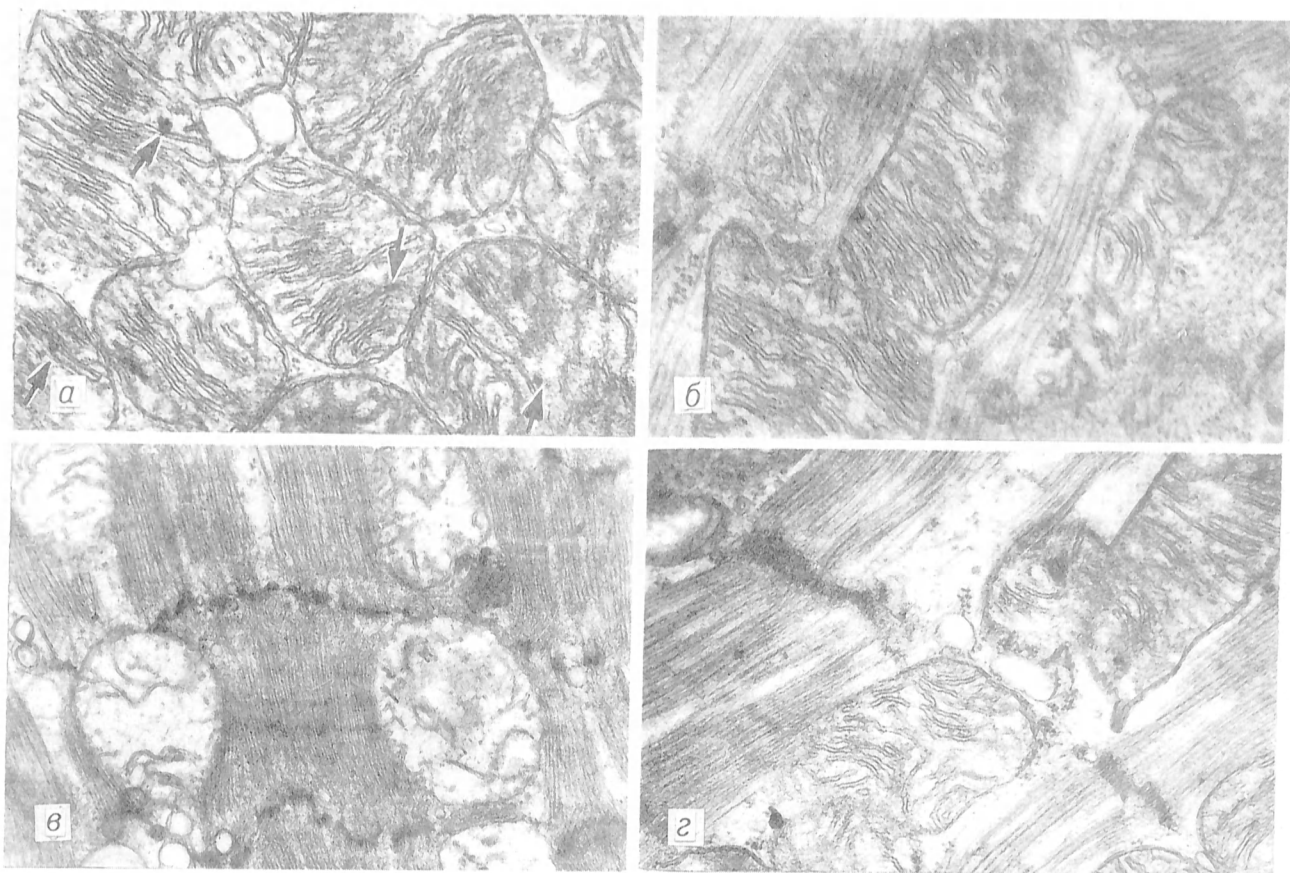


Рис. 2. Ультраструктура кардиомиоцита левого желудочка кролика при ТАМ после воздействия НАД.

а — крупные митохондрии (*Мх*) с параллельными кристами, скопление гликогена (*Г*). $\times 17\,500$; *б* — крупные митохондрии (*Мх*), расположенные гранулами, с частичной гомогенизацией крист и межкристными включениями (указано стрелками), *СР* расширен. $\times 1500$; *в* — гранулы α -гликогена (*Г*) между миофибриллами (*Мф*), в области Z-пластин (*З*). $\times 1500$; *г* — каналы *СР* расширены, содержимое умеренной плотности. $\times 1300$.

на неактивные мономеры [17, 28]. Активность фосфофруктокиназы должна стимулироваться и в связи с ростом содержания АДФ, а также низким содержанием КФ [16]. Наконец, НАД опосредованно активирует образование цАМФ [33], а цАМФ переводит неактивную форму фосфоорилазы в активную [18].

Увеличение содержания НАД в цитозоле и активация гликолитической оксидоредукции должны увеличивать приток электронов от цитозольного НАДН (через малатаспартатный челночный механизм [37, 38]) в митохондрии. Кроме того, освобождение электронов под влиянием НАД должно увеличиваться и в самих митохондриях в связи с увеличением в них содержания НАД [24] [мембрана митохондрий, в норме не проницаемая для НАД; при патологических состояниях, например при аноксии (гипоксии) становится для НАД проницаемой [20, 30]] и активацией НАД-зависимых дегидрогеназ цикла Кребса [9, 10]. Следовательно, под воздействием НАД образование АТФ должно активироваться в результате усиления окислительного фосфорилирования в митохондриях.

Однако при воспалительном повреждении миокарда из-за потери значительной частью цепей переноса электронов митохондрий цитохрома *с* нарушен транспорт электронов и синтез АТФ путем окислительного фосфорилирования в случае применения НАД, по-видимому, не активи-

руется; при этом содержание КФ (в отличие от опытов с применением цитохрома *с*) существенно не повышается.

Следовательно, увеличение содержания АТФ под влиянием НАД в основном происходит, по-видимому, в результате стимулирования его образования в процессе гликолиза, тогда как увеличение образования АТФ под влиянием цитохрома *с* наступает за счет того, что экзогенный цитохром *с* проникает в митохондрии (также в результате увеличения проницаемости мембран митохондрий при воспалительных повреждениях миокарда [11]), встраивается в цепь транспорта электронов [8, 11, 25, 26] и тем самым устраняет нарушение транспорта электронов. В пользу того что увеличение синтеза АТФ под влиянием цитохрома *с* происходит именно в результате активации окислительного фосфорилирования в митохондриях, свидетельствует существенное возрастание содержания КФ в случае лечения цитохромом *с*.

Таким образом, НАД и цитохром *с* действуют на различные пути образования АТФ. Следовательно, для полной нормализации энергетического обеспечения миокарда при его воспалительных повреждениях, в частности при ТАМ, необходимо в порядке заместительной терапии одновременное применение НАД и цитохрома *с*. Именно этим объясняется то, что комбинированное

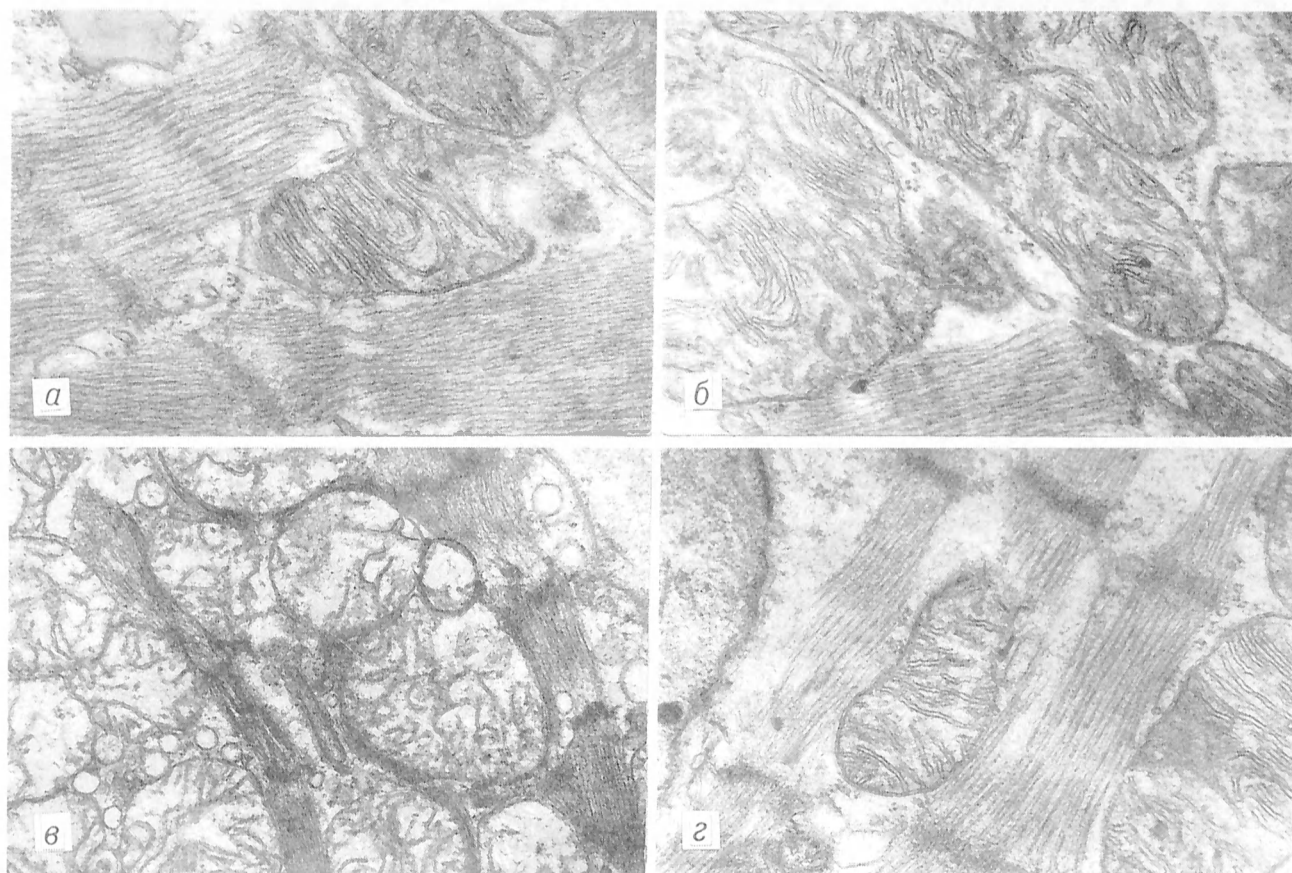


Рис. 3. Ультраструктура кардиомиоцита левого желудочка кролика при ТАМ после воздействия цитохрома с.

а — крупные митохондрии (Мх), гликоген (Г) в саркоплазме. $\times 17\,500$; б — гигантские митохондрии (Мх) с утолщенными извилистыми кристами, скопление гликогена (Г) между митохондриями. $\times 1500$; в — уменьшение просвета канальцев СР, расположенных вокруг митохондрий (Мх) и субсарколеммы (СЛ). $\times 1300$; г — структура саркомеров (С) и Z-пластинок упорядочена (Z). А- и I-диски четко контурированы (А), (I). $\times 1500$.

применение НАД и цитохрома с не только полностью нормализует содержание АТФ [13], но и повышает содержание КФ.

Улучшение структуры органелл кардиомиоцита и увеличение содержания α -гликогена как в случае применения НАД, так и цитохрома с обусловлены улучшением энергетического состояния кардиомиоцита. Установлено, что уридин-овые и пиридиновые нуклеотиды стабилизируют структуру различных ферментов и белков. В частности, показано, что АТФ, например, стабилизирует структуру миозиновой [34] и актиновой [36] нитей саркомера и других белков клетки, цАМФ — структуру лизосомальных мембран [35], а НАД — НАД-зависимых ферментов [17, 28]. Более выраженное положительное действие цитохрома с на отек кардиомиоцита и структуру органелл в определенной степени связано с его фармакодинамическим действием, направленным на усиление коронарного кровотока [27]. Повышение дозы цитохрома с до 10 мкг/кг массы животного [13], полностью нормализующей содержание адениловых нуклеотидов, нужно ожидать, будет оказывать и более выраженное положительное действие на ультраструктуру миокарда.

ЛИТЕРАТУРА

1. Алексеева А. М. // Биохимия.— 1951.— № 2.— С. 97—103.
2. Андреев С. В., Соколов М. В. // Саногенез.— М., 1968.— С. 91—92.
3. Баев А. А. // Биохимия.— 1958.— № 1.— С. 164—176.
4. Бейли Н. Статистические методы в биологии.— М., 1964.
5. Варнакова Г. М. // Вопр. питания.— 1983.— № 4.— С. 32—35.
6. Верболович П. А., Ерджанова С. С., Резчик С. П. // Здравоохр. Туркменистана.— 1973.— № 8.— С. 38—40.
7. Воскобойников Г. В. // Биохимия.— 1966.— № 5.— С. 1041—1045.
8. Голубцева М. В. // Укр. биохим. журн.— 1971.— № 5.— С. 577—581.
9. Епштейн М. М., Никонова В. А., Спідіоті З. И., Кахновер Н. Б. // Там же.— С. 572—576.
10. Зубовская А. М. // Бюл. exper. биол.— 1961.— № 3.— С. 55—58.
11. Карсанов Н. В., Бакоева С. А., Колесникова Т. В. и др. // Грузинская респ. науч. конф. по энзимологии.— Тбилиси, 1981.— С. 136.
12. Карсанов Н. В., Бочоришвили В. Г., Хаиндрава Н. К. и др. // Биофизические основы патологического состояния мышц и энергетическое обеспечение сократительного аппарата.— Тбилиси, 1973.— С. 98—100.
13. Карсанов Н. В., Хаиндрава Н. К. // Всесоюзный симпозиум по медицинской энзимологии, 2-й: Материалы.— Душанбе, 1974.— С. 74—75.
14. Карсанов Н. В., Хугашвили З. Г., Мамулашвили Л. Д. и др. // Кардиология.— 1984.— № 1.— С. 80—85.
15. Кобаяши К., Нийли Д. Р. // Метаболизм миокарда.— М., 1979.— С. 269—285.
16. Куприянов В. В., Сеппет Э. К., Сакс В. А. // Биохимия.— 1978.— № 8.— С. 1468—1477.
17. Наградова Н. К. // Там же.— 1977.— № 3.— С. 379—395.
18. Ньюсхолм Э., Старт К. Регуляция метаболизма.— М., 1977.
19. Пауков В. С., Казанская Т. А., Фролов В. А. // Бюл. exper. биол.— 1971.— № 4.— С. 122—125.

20. Розанов Л. Я. Митохондрии. Ферментативные процессы и их регуляция.— М., 1968.
21. Северин С. Е., Цейтлин Л. А. // Вопр. мед. химии.— 1961.— № 2.— С. 201—208.
22. Северин С. Е., Цейтлин Л. А. // Там же.— 1964.— № 3.— С. 300—305.
23. Северин С. Е., Цейтлин Л. А. // Там же.— 1967.— № 5.— С. 498—502.
24. Северин С. Е., Цейтлин Л. А. // Метаболизм миокарда.— М., 1975.— С. 249—259.
25. Слепнева Л. В., Алексеева Н. Н., Кривцова И. М. // Острая ишемия органов и ранние постинфарктные расстройства.— М., 1978.— С. 468—469.
26. Слепнева Л. В., Манойлов Ю. С., Кробошук Б. И. // Лечебные препараты из крови и тканей.— Л., 1974.— С. 131—133.
27. Сурменков А. А. Автореф. дис. ... канд. наук.— Курск, 1975.
28. Тамарина Н. З., Чумаков В. Н., Лысцова Г. В. // Укр. биохим. журн.— 1984.— № 1.— С. 46—52.
29. Теленева В. И., Мештер Р. // Биохимия.— 1969.— № 1.— С. 160—165.
30. Халмуратов А. Г., Тоцкий В. Н., Чаговец П. Б. Мембранный транспорт коферментных витаминов и коферментов.— Киев, 1982.
31. Atkinson D. E. // Biochemistry (Wash.).— 1968.— Vol. 7.— P. 4030—4034.
32. Delabar U., Siess M. // Basic Res. Cardiol.— 1979.— Vol. 74.— P. 528—544.
33. Feldman A. M., Lewine M. A., Baughman K. L., Van Dop C. // Biochem. biophys. Res. Commun.— 1987.— Vol. 142.— P. 631—637.
34. Hiratsuka T. // Biochemistry (Wash.).— 1986.— Vol. 25.— P. 2101—2109.
35. Ignarro J. L. // J. Pharmacol. exp. Ther.— 1973.— Vol. 186.— P. 86—95.
36. Korn E. D., Carlier M.-F., Pantaloni D. // Science.— 1987.— Vol. 238.— P. 638—644.
37. Safer B. // Circulat. Res.— 1975.— Vol. 37.— P. 527.
38. Williamson J. R., Ford C., Illingworth J., Safer B. // Ibid.— 1976.— Vol. 38.— P. 1—39—1—51.

Поступила 24.10.91

EFFECT OF NAD AND CYTOCHROME C ON ENERGY PROVISION AND CARDIOMYOCYTE ULTRASTRUCTURE IN TOXIC-ALLERGIC MYOCARDITIS

N. V. Karsanov, L. E. Gogiasvili, E. V. Selikhova

Research Centre of Medical Biophysics, Ministry of Health and Social Security, the Georgian Republic, Tbilisi.

The level of NAD was decreased while the NADH/NAD ratio was increased in the myocardium of rabbits with 10-day toxic-allergic myocarditis. The concentrations of ATP, ADP, AMP and especially of creatine phosphate were decreased in the myocardium. At the same time, inter- and intracellular edema was developed and the cardiomyocyte structure was impaired. After administration of NAD in a dose of 0.5 mg/kg of body mass, the content and ratio of pyridine nucleotides as well as content of ATP and AMP were completely normalized, while content of ADP exceeded the control values but creatine phosphate was maintained at a low level. Cardiomyocyte ultrastructure was distinctly improved. Cytochrome c, administered at a dose of 5 mg/kg of body mass, did not affect markedly the pyridine nucleotides ratio but increased slightly their total content. The adenylic nucleotides and creatine phosphate were distinctly increased as well as cardiomyocyte ultrastructure was considerably improved.

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 1993

УДК 616.36-002.1-022:578.891]-07:616.153.963

Е. Е. Гуссаковский, А. В. Гаршинина,
Е. Ю. Бондырева, Ш. Х. Ходжаев

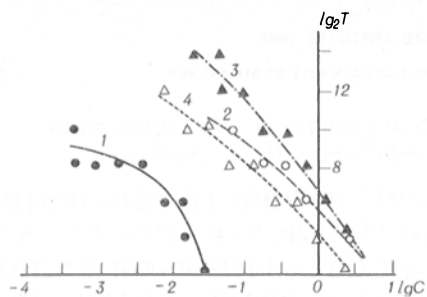
РОЛЬ ОЛИГОМЕРНОСТИ СЫВОРОТОЧНОГО АЛЬБУМИНА ЧЕЛОВЕКА ПРИ ЕГО ВЗАИМОДЕЙСТВИИ С РЕЦЕПТОРАМИ ПОЛИАЛЬБУМИНА В СЫВОРОТКЕ КРОВИ БОЛЬНЫХ ВИРУСНЫМ ГЕПАТИТОМ В

НИИ вирусологии Минздрава Узбекистана, Ташкент

Модифицированный глутаральдегидом сывороточный альбумин человека (GA-HSA) имеет рецепторы в сыворотке крови, которые связаны с инфекционным процессом при вирусном гепатите В и входят в состав поверхностного антигена вируса гепатита В (HBsAg) [3, 12, 13, 17]. Поскольку модификация сывороточного альбумина глутаральдегидом приводит к образованию разных олигомеров (от мономера до пентамера) [1, 4], возникает вопрос о роли молекулярной массы GA-HSA в его взаимодействии с соответствующими рецепторами. Уровень рецепторной активности в сыворотке крови определяют с помощью реакции обратной пассивной гемагглютинации (РОПГА), в которой используют эритроциты, покрытые GA-HSA [6]. В настоящей работе вопрос о роли олигомерности рассматривался с двух точек зрения. С одной стороны, разные олигомеры GA-HSA использовали как нейтрализующие РОПГА, а с другой стороны, РОПГА проводили с использованием эритроцитов, покрытых разными олигомерами.

Методика. Модификацию сывороточного альбумина человека («Реанал», Венгрия) с помощью глутарового альдегида («Реанал») проводили, как описано ранее [1, 9]. Тетра-GA-HSA (tHSA), ди-GA-HSA (dHSA) и моно-GA-HSA (mHSA) получали с помощью гель-фильтрации раствора GA-HSA на сефадексе G-200 [1], а молекулярную массу оценивали с помощью вертикального электрофореза в плоском 7.5 % полиакриламидном геле (пластины геля 100×100×1 мм) в 0.1 % додецилсульфате натрия [1, 18]. Для проведения РОПГА готовили эритроциты барана (SRBC), покрытые тетра-, ди- или моно-GA-HSA по методу [16], а также эритроциты барана, покрытые нефракционированным GA-HSA (SRBC-GA-HSA) по методу [6]. При приготовлении SRBC-tHSA, SRBC-dHSA и SRBC-mHSA концентрации фракций GA-HSA были одни и те же. Концентрацию белка определяли по методу Лоури [10]. Титр в РОПГА определяли как наименьшее разведение сыворотки крови, приводящее к положительной РОПГА, и выражали в единицах отрицательного логарифма от кратности разведения по основанию 2. Нейтрализацию РОПГА производили добавлением GA-HSA или его фракций на каждом этапе разведения сыворотки. Сыворотку крови разводили физиологическим раствором.

Результаты и обсуждение. Обнаружение в сыворотке крови человека рецепторов к GA-HSA (GA-HSA-R) с помощью РОПГА предполагает наличие более одного рецептора на субчастицах (HBsAg). Традиционный метод нейтрализации, применяемый для определения специфичности иммунологической реакции, в данном случае может быть использован, если нейтрализующими будут молекулы модифицированного альбумина. Результаты, приведенные на рисунке, показывают, что добавление олигомеров GA-HSA, а также интактного HSA в сыворотку крови больных ви-



Зависимость титра (Т) рецепторов к модифицированному глутаральдегидом сывороточному альбумину человека (GA-HSA) в сыворотке крови больных вирусным гепатитом В в РОПГА при использовании эритроцитов крови барана, покрытых всем пулом GA-HSA от концентрации (С) олигомеров GA-HSA.

1 — тетра-GA-HSA; 2 — ди-GA-HSA; 3 — моно-GA-HSA; 4 — интактный HSA.

русным гепатитом В приводит к падению титра GA-HSA-R. Это соответствует связыванию любых форм альбумина с рецепторами, в том числе и интактного альбумина, что отмечалось другими авторами [5, 7, 8, 11, 13, 19], хотя имеются сведения о том, что мономерные формы связываться не могут [4, 14—16]. Видно, что если димеры и мономеры нейтрализуют РОПГА приблизительно в одинаковых концентрациях, то тетрамер связывается с полиальбуминовыми рецепторами при концентрациях примерно в 100 раз меньших, т. е. связывание тетрамера значительно более интенсивное, чем димеров или мономеров. Поскольку моно-GA-HSA и интактный HSA оказывают приблизительно одинаковое влияние на РОПГА, можно полагать, что сама по себе модификация альбумина глутаральдегидом не имеет существенного значения для нейтрализации, а более значимой является степень олигомерности альбумина.

Роль олигомерности альбумина в связывании с рецепторами в сыворотке крови больных вирусным гепатитом В проявляется и в эксперименте с конструированием эритроцитарного диагностикума, в котором эритроциты были покрыты разными фракциями GA-HSA. Результаты представлены в таблице. Оказалось, что эритроциты, покрытые димером или мономером GA-HSA, не агглютинируют, хотя рецепторы в сыворотке присутствуют, по данным РОПГА с применением эритроцитов, покрытых всем пулом GA-HSA. Напротив, агглютинация эритроцитов с тетрамером весьма интенсивна и ингибируется в присутствии как тетрамера, так и димера или мономера или интактного альбумина. В таблице также представлены данные об отсутствии нейтрализации РОПГА модифицированным или интактным бычьим сывороточным альбумином. Известно, что как бычий сывороточный альбумин, так и альбумины из сыво-

роток крови других животных (кроме приматов) не имеют рецепторов в сыворотке крови человека [13, 16]. Поэтому такие данные указывают на специфичность РОПГА, проводимых с участием альбумина человека.

Тем самым, с одной стороны, димер и мономер альбумина взаимодействуют с глутаральдегид-альбуминовыми рецепторами в сыворотке крови, нейтрализуя РОПГА (хотя и не так интенсивно, как тетрамер), а с другой стороны, они, будучи адсорбированными на эритроцитах, не обеспечивают их агглютинацию, т. е. не могут связываться с рецепторами субчастиц (HBsAg) сыворотки крови. Такая ситуация возможна, если димер или мономер имеют только одно место связывания с эритроцитом или рецептором. Тетрамер, напротив, имеет по крайней мере два места связывания. Пока остается неясным, одинаковы ли эти места связывания с эритроцитом или рецептором или разные. Связывание альбумина с эритроцитом в некотором приближении можно рассматривать как неспецифическое взаимодействие с плазматической мембраной гепатоцита. Кроме того, есть основания полагать, что HBsAg, содержащий рецепторы, обладает мембранными структурами [2]. С этой точки зрения наличие более одного места связывания на тетрамере вполне отвечает гипотезе об олигомерах сывороточного альбумина как посредниках связывания HBsAg с гепатоцитом. Наличие же одного места связывания на димере или мономере может иметь значение для блокирования с их помощью связывания вируса или HBsAg с гепатоцитом и торможения инфекционного процесса при вирусном гепатите В.

ЛИТЕРАТУРА

1. Гусакова А. В., Гуссаковский Е. Е. // Химия природных соединений. — 1991. — № 1. — С. 98—101.
2. Чумаков В. М., Калмансон А. Э. // Итоги науки и техники. Вирусология. — М., 1990. — Т. 22. — С. 78—79.
3. Baumgarten R., Geserick G., Markus R., Fengler J. D. // Wiss. Beitr. M. Luther-Univ. Halle-Wittenberg. — 1987. — Bd R. — S. 248—255.
4. Fukuda M., Akahane Y., Mayumi M. // Jap. J. exp. Med. — 1987. — Vol. 57. — P. 125—129.
5. Hansson B. G., Purcell R. H. // Infect. Immun. — 1979. — Vol. 26. — P. 125—130.
6. Imai M., Yanaze Y., Najiri T. et al. // Gastroenterology. — 1979. — Vol. 76. — P. 242—247.
7. Ise Y., Fukuda M., Suzuki T. // Med. Microbiol. Immunol. — 1987. — Vol. 176. — P. 199—207.
8. Ishihara K., Waters J. A., Pienatell M., Thomas H. C. // J. med. Virol. — 1987. — Vol. 21. — P. 89—95.
9. Lenkei R., Mota G., Dan M. E., Laky M. // Clin. Chem. — 1974. — Vol. 14. — P. 22—30.

Нейтрализация РОПГА в сыворотке крови больного вирусным гепатитом В (титр в РОПГА)

Нейтрализующий белок	Концентрация белка, мг/мл	Эритроциты, покрытые		
		тетра-GA-HSA	ди-GA-HSA	моно-GA-HSA
Без нейтрализации	—	1:2048	Отрицательный	Отрицательный
Тетра-GA-HSA	0,056	1:8		
Ди-GA-HSA	0,55	1:8		
Моно-GA-HSA	1,0	1:256		
Интактный HSA	1,5	Отрицательный		
Интактный BSA	1,0	1:1024		
GA-BSA	2,0	1:1024		

Примечание. BSA — бычий сывороточный альбумин.

10. Lowry O. H., Rosebrough N. J., Farr A. L., Randall R. J. // J. biol. Chem.— 1951.— Vol. 193.— P. 265—275.
11. Lu X., Yao G., Tian Y. // Arch. Virol.— 1988.— Vol. 98.— P. 163—170.
12. Machida A., Kishimoto S., Ohnuma H. et al. // Gastroenterology.— 1984.— Vol. 86.— P. 910—918.
13. Milich D. R., Gottfried T., Vyas G. N. // Ibid.— 1981.— Vol. 81.— P. 218—225.
14. Mora I., Carreno V., Perres J. C. et al. // Acta virol.— 1987.— Vol. 31.— P. 116—125.
15. Pontisso P., Alberti A., Shiyon E. et al. // J. virol. Meth.— 1983.— Vol. 6.— P. 151—159.
16. Thung S. N., Gerber M. A. // Infect. Immun.— 1981.— Vol. 32.— P. 1292—1294.
17. Thung S. N., Gerber M. A. // Progr. Liver Dis.— 1986.— Vol. 8.— P. 335—345.
18. Weber K., Osborn M. // J. biol. Chem.— 1969.— Vol. 244.— P. 4406—4412.
19. Yu M. W., Finlayson J. S., Shih J. W.-K. // J. Virol.— 1985.— Vol. 55.— P. 736—743.

Поступила 21.05.91

ROLE OF OLIGOMERIC STRUCTURE OF HUMAN BLOOD SERUM ALBUMIN IN BINDING WITH POLYALBUMIN RECEPTORS IN THE BLOOD SERUM OF PATIENTS WITH VIRAL HEPATITIS B

E. E. Gussakovskiy, A. V. Garshinina, E. Yu. Bondyrev, Sh. Kh. Khodzhaev

Institute of Virology, Ministry of Public Health of the Uzbek Republic, Tashkent.

Several oligomers of human blood serum albumin modified by glutaraldehyde differ in their binding ability to polyalbumin receptors in blood serum of patients with viral hepatitis B. Erythrocytes containing the albumin tetramer are able to agglutinate, while the red blood cells coated with dimer or monomer are deprived of this property. At the same time, the albumin dimers and monomers neutralize agglutination of the erythrocytes containing the complete pool of modified albumin in membranes although their effect is distinctly lower than that of tetramer. The albumin tetramer may have two or more sites of binding to erythrocytes or to the surface antigen of hepatitis B virus, bearing polyalbumin receptors, whereas the protein dimer or monomer contained only one site of binding.

© К. Т. АЛМАТОВ, М. ОБИДХОНОВ, 1993

УДК 616.231-007.271-07:616.36-018.1-008.93.915

К. Т. Алматов, М. Обидхонов

ФОСФОЛИПИДНЫЙ СОСТАВ МИТОХОНДРИЙ ПЕЧЕНИ КРОЛИКОВ ПРИ СТЕНОЗЕ ТРАХЕИ СРЕДНЕЙ ТЯЖЕСТИ

Ташкентский университет

Изменения фосфолипидов сопровождаются нарушениями микроструктуры, физико-химических свойств и функций мембран митохондрий [2, 5, 11]. Важным направлением в решении вопроса о механизме влияния стеноза трахеи на функциональную активность митохондрий печени явилось изучение фосфолипидного спектра мембран митохондрий. В задачи настоящего исследования входило изучение закономерностей качественного и количественного изменения спектра фосфолипидов в митохондриях печени при стенозе трахей средней тяжести.

Методика. Опыты проводили на кроликах-самцах массой 2—3 кг. Стеноз трахеи создавали методом наложения лигатуры на шейный отдел трахеи и сужением ее просвета на $\frac{2}{3}$ [6]. Ее проходимость контролировали с помощью спирогрaммы, трахеобронхографии, показателей газового состава

крови и кислотно-щелочного состояния. Результаты изучения функции внешнего дыхания при стенозе трахеи показали, что значительные изменения происходят начиная с первых суток после создания стеноза и выражаются снижением частоты дыхания; небольшая физическая нагрузка вызывает у этих животных резко выраженную одышку.

Исследование газового насыщения и кислотно-щелочного баланса при стенозах шейного отдела трахеи указало на развитие респираторных и метаболических нарушений в организме. Развитие дыхательного ацидоза при стенозе связано с повышением CO_2 , который зависит от нарушения соответствия альвеолярной вентиляции и интенсивности окислительных процессов. Повышение CO_2 указывает на альвеолярную гиповентиляцию. Развитие метаболического ацидоза характеризуется увеличением дефицита буферных оснований и значительным увеличением уровня бикарбоната в крови, что обусловлено длительностью стеноза и накоплением кислых метаболитов в организме животных. Контролем служили интактные животные. Животных забивали декапитацией на 15-е сутки эксперимента.

Митохондрии выделяли методом дифференциального центрифугирования [8]. Экстракцию фосфолипидов митохондрий проводили по [4]. Фосфолипиды анализировали с помощью двухмерной тонкослойной хроматографии на стандартных пластинках «Silufol» (Чехо-Словакия). Система растворителей в первом направлении хлороформ — метанол — вода (65:25:4), во втором бутанол — уксусная кислота — вода (60:20:20). Количественное определение фосфолипидов митохондрий по фосфору проводили по методу [17].

Результаты и обсуждение. Методом двухмерной тонкослойной хроматографии получено разделение фракций фосфолипидов мембран митохондрий: фосфатидилхолин, фосфатидилэтаноламин, кардиолипин, фосфатидилсерин, фосфатидилинозит, лизофосфатидилхолин, сфингомиелин и фосфатидная кислота (см. таблицу). В митохондриях печени подопытных животных наблюдается снижение уровня фосфатидилхолинов (на 32,5 %), фосфатидилэтаноламинов (на 32,9 %), кардиолипинов (на 28,8 %) и повышение содержания лизофосфатидилхолинов (на 272,5 %), что свидетельствует о повышении каталитической активности фосфолипазы A_2 мембран митохондрий. Эти данные свидетельствуют о том, что при стенозе трахеи для эндогенных липоидных ферментов мембран митохондрий главные фосфолипиды являются основными субстратами. Избыточное накопление лизоформ фосфолипидов в мембране митохондрий свидетельствует о глубоком нарушении свойств мембран. Избыточное содержание лизофосфолипидов способствует нарушению структуры биологических мембран [15, 16, 18].

Фосфолипидный состав митохондрий печени кроликов при стенозе трахеи средней тяжести (в мкг фосфолипида на 1 мг белка)

Фосфолипид	Контроль	Опыт
Фосфатидилхолин	136,8±16,1	92,4±9,6*
Фосфатидилэтаноламин	112,0±14,4	75,2±8,4*
Кардиолипин	79,2±5,6	56,4±1,6***
Фосфатидилсерин	8,0±1,6	34,0±7,6**
Фосфатидилинозит	12,4±4,8	50,4±19,6***
Фосфатидная кислота	4,0±1,6	41,2±10,0***
Лизофосфатидилхолин	8,8±0,8	24,0±3,2***
Сфингомиелин	30,0±9,6	15,6±3,2*
Неидентифицированные фосфолипиды	12,8±4,8	10,8±6,4

Примечание. В серии по 10—16 опытов. Различия между контролем: одна звездочка — $p<0,05$, две — $p<0,01$, три — $p<0,001$.

При стенозе трахеи на фоне снижения концентрации главных фосфолипидов мембран митохондрий наблюдается резкое увеличение содержания минорных фосфолипидов — фосфатидилсеринов и фосфатидилинозитов (в 4,2 и 4,1 раза соответственно). Эти изменения — следствие энзиматических реакций метилирования и декарбоксилирования, протекающих в ткани печени [10, 19, 23], и повышения трансацилирующей активности эндогенной фосфолипазы D [1, 2, 7]. Можно допустить, что при стенозе трахеи средней тяжести в митохондриях замедляется превращение фосфатидилсерина в фосфатидилэтаноламин (реакция декарбоксилирования) и фосфатидилэтанолamina в фосфатидилхолин (реакция метилирования).

Накопление фосфатидной кислоты (в 10,3 раза) в мембране митохондрий печени при стенозе трахеи также свидетельствует о значительном нарушении мембран, обусловленном действием эндогенной фосфолипазы D. Известно, что фосфатидная кислота является Са-ионофором [12—14, 21]. Методом ЯМР зарегистрировано появление изотропной фазы в бислоях под действием фосфолипазы D [9]. Любые дефекты бислойной организации способствуют гидролитическому действию различных фосфолипаз независимо от причины, вызвавшей эти дефекты [20].

При стенозе трахеи в митохондриях печени заметно уменьшается содержание сфингомиелина (на 48 %), что, по-видимому, связано с торможением реакции образования сфингомиелина из фосфатидилхолина, которая протекает в плазматической мембране [19].

Таким образом, при стенозе трахеи средней тяжести в митохондриях печени кроликов наблюдается снижение содержания фосфатидилхолинов, фосфатидилэтаноламинов, кардиолипинов, сфингомиелинов и повышение содержания фосфатидилсеринов, фосфатидилинозитов, фосфатидной кислоты и лизофосфатидилхолинов. При этом соотношение фосфатидилхолин/фосфатидилэтаноламин, играющее важную роль в сохранении целостности мембранных структур, повышается в 1,5 раза. Обнаружены также изменения в соотношении диацильных форм фосфолипидов и их лизопродных при стенозе трахеи (коэффициент фосфатидилхолин/лизофосфатидилхолин повышается в 4 раза). Наблюдаемые при стенозе трахеи изменения фосфолипидного состава мембран митохондрий могут быть обусловлены нарушением восполнения фосфолипидного компонента мембран, разрушением главных фосфолипидов под влиянием фосфолипаз и автолиза. В связи с этим можно полагать, что изменение содержания индивидуальных фосфолипидов и их лизо соединений в митохондриях печени при стенозе трахеи средней тяжести может явиться существенным фактором, отражающим нарушения параметров дыхания и окислительного фосфорилирования [3].

ЛИТЕРАТУРА

1. Алматов К. Т., Горбатая О. Н., Ходжаева Н. И. и др. // Укр. биохим. журн. — 1987. — Т. 59, № 4. — С. 93—96.
2. Алматов К. Т. Механизмы развития повреждений мембран митохондрий и роль липолитической системы: Дис. ... д-ра. — Ташкент, 1990.
3. Амиров Ф. Ф., Алимов Р. А., Саидов А. А. и др. // Мед. журн. Узбекистана. — 1978. — № 5. — С. 43—45.

4. Кейтс М. Техника липидологии. — М., 1975. — С. 74—77.
5. Микельсаар Х., Северина И. И., Скулачев В. И. // Успехи соврем. биол. — 1974. — Т. 78, № 3 (6). — С. 348—370.
6. Подвонов Б. Влияние стенозов трахеи и гортани различной длительности на функцию и структуру сердца и легких: Дис. ... канд. — М., 1986.
7. Рахимов М. М., Горбатая О. Н., Алматов К. Т. // Биохимия. — 1989. — Т. 54, № 7. — С. 1056—1074.
8. Скулачев В. И. Аккумуляция энергии в клетке. — М., 1969.
9. Шрагин А. С., Василенко И. А., Селищева Л. А., Швец В. И. // Биол. мембраны. — 1985. — Т. 2, № 8. — С. 794—798.
10. Berezial G. // Ann. Nutr. Alim. — 1980. — Vol. 34, N 2. — P. 241—254.
11. Berezney R., Awasthi Y., Funk L., Krane F. // J. Bioenerg. — 1970. — Vol. 1, N 5. — P. 445—456.
12. Borovjagin V. L., Vergara J. A., McInton Th. I. // J. Membr. Biol. — 1982. — Vol. 69. — P. 199—211.
13. Burt Y. M., Rich T. L., Longer G. A. // Amer. J. Physiol. — 1984. — Vol. 247, N 5. — P. 880—885.
14. Cullis P. R., de Kruijff B. // Biochim. biophys. Acta. — 1979. — Vol. 559, N 3. — P. 399—420.
15. Deamer D. W. // J. biol. Chem. — 1973. — Vol. 248, N 2. — P. 5477—5485.
16. Hunter D. R., Komai H., Haworth R. A. // Biochem. biophys. Res. Commun. — 1974. — Vol. 56, N 3. — P. 647—653.
17. Kahovcova J., Odovit R. A. // J. Chromatogr. — 1969. — Vol. 40. — P. 90—96.
18. Komai K., Hunter D. R., Takachashi Y. // Biochem biophys. Res. Commun. — 1973. — Vol. 53, N 1. — P. 82—89.
19. Morggrog W., Anderer A. F., Kanfer J. N. // Biochim. biophys. Acta. — 1981. — Vol. 664, N 1. — P. 61—73.
20. Upreli A., Jean M. K. // J. Membr. Biol. — 1980. — Vol. 55, N 2. — P. 113—121.
21. Verkleij A. J., de Maard R., Lennissen Y. et al. // Biochim. biophys. Acta. — 1982. — Vol. 684, N 2. — P. 255—282.
22. Vojnikov V. K., Lazova G. B., Korzun A. M. // Planta. — 1983. — Vol. 153, N 3. — P. 194—198.
23. Zborowski J., Woitczak L. // Biochim. biophys. Acta. — 1969. — Vol. 187, N 1. — P. 73—84.

Поступила 23.12.91

PHOSPHOLIPID COMPOSITION OF RABBIT LIVER MITOCHONDRIA IN MODERATE TRACHEAL STENOSIS

K. T. Almatov, M. Obidkhanov

State University, Tashkent

A decrease in phosphatidyl cholines by 32.5 %, phosphatidyl ethanolamines by 32.9 %, cardiolipins by 28.8 % and sphingomyelins by 48 % as well as increase in concentration of phosphatidyl serine 4.2-fold, phosphatidyl inosites 4.1-fold, phosphatidic acid 10.3-fold and lysophosphatidyl cholines 2.7-fold were detected in liver mitochondria of rabbits with moderate tracheal stenosis. At the same time, the phosphatidyl choline / phosphatidyl ethanolamine ratio which is of importance in stabilizing membrane structures, was increased 1.5-fold. The ratio of diacyl forms of phospholipids and their lyso derivatives was also altered in stenosis of trachea: the phosphatidyl choline / lysophosphatidyl choline ratio was increased 4-fold.

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 1993

УДК 616.381-008.853.3-008.924.1-02:615.331:579.222.547.915-07

В. Д. Уваров, А. П. Шепелев, В. М. Поляков

ИНДУКЦИЯ Ca^{2+} -ЗАВИСИМОГО ХЕМИЛЮМИНЕСЦЕНТНОГО ОТВЕТА ПЕРИТОНЕАЛЬНЫХ МАКРОФАГОВ БАКТЕРИАЛЬНЫМ ЛИПОПОЛИСАХАРИДОМ

Институт микробиологии и паразитологии, Ростов-на-Дону

В настоящее время известно, что фагоцитирующие клетки являются мощными продуцентами активных форм кислорода [14]. Эти высокореак-

ционные агенты ответственны за фрагментацию ДНК, модуляцию активности ферментов, пероксидацию липидов [12]. Усиление продукции активных форм кислорода происходит после активации фагоцитов различными чужеродными веществами, микроорганизмами, бактериальными липополисахаридами (ЛПС) [11, 19, 20].

ЛПС, структурный компонент клеточной стенки грамотрицательных микроорганизмов, является одним из мощных индукторов перестройки метаболических процессов в фагоцитирующих клетках [3]. После взаимодействия ЛПС с макрофагами (МФ) в клетках повышается скорость окисления глюкозы, что сопровождается накоплением восстановленного НАДФ·Н. Последний используется при работе НАДФ·Н-зависимой оксидазы, осуществляющей одноэлектронное восстановление кислорода до супероксидного анион-радикала [15].

Механизм, посредством которого ЛПС вызывает резкое повышение активности НАДФ·Н-оксидазы МФ, локализованной в цитоплазматической мембране, окончательно не известен. Однако большинство авторов считают, что повышение внутриклеточного содержания свободных ионов кальция (Ca^{2+} внутри) является необходимым условием для передачи сигнала от места связывания ЛПС на мембране внутрь клетки [13].

С учетом вышеизложенного представляет интерес изучение влияния модуляторов Ca^{2+} внутри на хемилюминесцентный (ХЛ) ответ МФ, примированных ЛПС.

Методика. Эксперименты проводили на беспородных белых крысах-самцах массой 120–140 г, которым внутрибрюшинно вводили ЛПС (12 мг на 1 кг массы тела в 1 мл 145 мМ раствора NaCl). ЛПС был выделен из *K. pneumoniae* по методу [24]. Животным контрольной группы вводили 1 мл 145 мМ раствора NaCl.

Материалом исследования служили клетки перитонеального экссудата крыс, полученные по методу [6] через 4, 24, 48 ч и на 6-е сутки после введения ЛПС. Процедура выделения перитонеальных МФ включала интенсивное промывание брюшной полости крыс раствором Хенкса с 5 ЕД/мл гепарина с последующим центрифугированием смыва при 400 г в течение 10 мин. Полученный осадок клеток дважды промывали в охлажденном до 4 °С растворе Хенкса. Процент МФ при таком способе выделения составлял 75–80 %. Жизнеспособность клеток, оцененная по эксклюзии трипанового синего [16], составляла более 90 %.

Изучение ХЛ проводили на люминиметре 1251 (LKB, Швеция). Измерительная кювета содержала 900 мкл раствора Хенкса без красителя pH 7,4, 10^{-4} М люминола, 8 мМ NaH_2PO_4 , 50 мкл суспензии МФ в конечной концентрации $0,5 \cdot 10^6$ кл/мл. После записи спонтанной ХЛ в клеточной суспензии в течение 3 мин в кювету вносили 50 мкл (100 мкг/мл) опсонизированного зимозана (ОЗ) и регистрировали ХЛ-ответ стимулированных МФ. В ходе опыта измеряли ХЛ-ответ в присутствии и отсутствии препаратов до и после внесения ОЗ. Содержание Ca^{2+} внутри оценивали по способности МФ к повышению амплитуды ХЛ в ответ на добавку $0,5 \text{ мкМ}$ кальциевого ионофора А 23187 («Calbiochem», США). Об ингибирующем действии различных концентраций блокатора кальциевых каналов флупитипана на ХЛ-ответ МФ судили по степени гашения всплеск ХЛ, вызванных ОЗ.

Статистический анализ выполняли с помощью теста *t* Стьюдента.

Результаты и обсуждение. При инкубации МФ с ЛПС *in vitro* наблюдалось незначительное повышение амплитуды ХЛ в ответ на последующую стимуляцию МФ ОЗ. Этот эффект

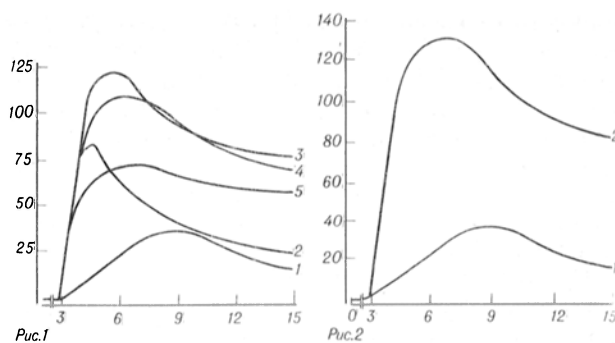


Рис. 1. Зимозан-опосредованная ХЛ МФ.

Здесь и на рис. 2 и 3: по оси абсцисс — время, мин; по оси ординат — X_0 — уровень спонтанной ХЛ и после добавки стимулятора (X) для каждой группы клеток. Суспензии клеток получены от интактных (1) животных и через 4 (2) ч, 24 (3) ч, 48 (4) ч и на 6-е сутки (5) после введения ЛПС.

Рис. 2. Эффекты калыцимидина на индуцированную ОЗ ХЛ интактных МФ.

Суспензии МФ после предварительной инкубации в среде, не содержащей (1) и содержащей (2) $1 \text{ мкМ}/10^6$ клеток кальциевого ионофора.

составлял 30 % от контрольного уровня при концентрации ЛПС $10 \text{ мкг}/10^6$ клеток и возрастал до максимума спустя 5 мин после начала инкубации. Дальнейшее повышение как концентрации ЛПС, так и времени его контакта с МФ усиления ХЛ не вызывало.

На рис. 1 представлены ХЛ-профилы в суспензиях интактных и примированных ЛПС МФ на ОЗ. ХЛ-ответы примированных МФ на ОЗ отличались повышенной амплитудой, укороченным временем достижения максимальной величины свечения и замедленной скоростью спада его интенсивности (см. рис. 1).

Наиболее быстрое появление пика ХЛ-ответов на ОЗ наблюдалось у макрофагов через 4 ч после инъекции ЛПС (см. рис. 1). Уровень ХЛ в этой клеточной суспензии более чем в 2 раза превышал контрольные значения, достигал максимума через 90 с после добавления специфического стимулятора и быстро снижался. Такой характер ХЛ-ответа МФ на ОЗ отражает состояние повышенной реактивности мононуклеаров и, вероятно, является следствием метаболической и структурной пере-

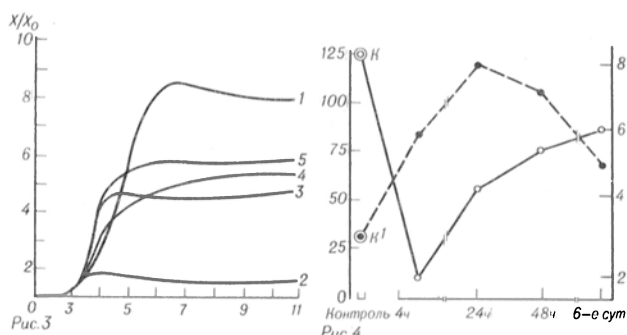


Рис. 3. ХЛ-ответы МФ на калыцимидин.

Суспензии клеток получены от интактных (1) животных и через 4 (2) ч, 24 (3) ч, 48 (4) ч и на 6-е сутки (5) после введения ЛПС.

Рис. 4. Максимальные амплитуды ХЛ-ответов на ОЗ и калыцимидин в суспензиях интактных (К, К') и примированных ЛПС МФ.

По оси ординат: справа — зимозано-опосредованная ХЛ ($X_{\text{макс}}/X_0$, темные кружки), слева — калыцимидин-индуцированная ХЛ ($X_{\text{стим}}/X_0$, светлые кружки).

стройки МФ, вызванной ЛПС [15]. Эти результаты хорошо согласуются с полученными нами ранее данными об усилении продукции супероксидного радикала лейкоцитами крови после внутрибрюшинной инъекции ЛПС экспериментальным животным [17]. Максимальная интенсивность свечения развивалась в суспензиях клеток, полученных от животных спустя 24 ч с момента введения примиряющего агента (см. рис. 1). Конфигурация ХЛ-профилей МФ этой группы становилась более пологой на высоте подъема и менее крутой в нисходящей фазе, хотя начальная скорость нарастания ХЛ оставалась высокой. Подобного рода ХЛ, так называемый быстрый тип ХЛ-ответа: высокий по амплитуде, с укороченным временем достижения максимума и быстрым понижением интенсивности свечения — по-видимому, отражает состояние сверхактивации МФ, сочетающееся с высокой вероятностью аутоповреждения клетки. Ранее подобный тип ХЛ-ответов был описан при действии на МФ некоторых особо агрессивных видов фиброгенной пыли [1]. На ХЛ-кривых МФ, выделенных от животных в более отдаленные сроки (48 ч и 6-е сутки), отмечалось постепенное понижение амплитуды и удлинение времени достижения максимума зимозан-опосредованной ХЛ МФ (см. рис. 1).

Данные литературы о синергичном действии ЛПС и кальциевого ионофора А 23187 на мононуклеарные клетки [2, 4] обусловили необходимость изучения характера ХЛ-ответов интактных МФ, примированных ионофором А 23187 на ОЗ. На рис. 2 показано, что предварительная инкубация резидентных МФ с кальциевым ионофором приводила к повышению амплитуды, сокращению времени достижения пика и замедлению скорости спада интенсивности ХЛ в ответ на стимуляцию клеток ОЗ. Максимальное усиление ХЛ наблюдалось после 6-минутной инкубации клеток с ионофором А 23187 в конечной концентрации $1 \text{ мкМ}/10^6$ клеток. В этом случае относительные величины амплитуды ХЛ-ответа МФ через 3—4 мин после добавления ОЗ в 4 раза превышали контрольные значения (см. рис. 2). Последующее увеличение концентрации кальциевого ионофора А 23187 вызывало зависимость от дозы понижение ХЛ, обусловленной ОЗ, что, вероятно, связано с детергентным действием высоких концентраций А 23187 [9].

Сходная конфигурация ХЛ-профилей и равная кратность повышения амплитуды ХЛ-ответов на ОЗ, полученных в суспензиях интактных МФ после предварительной инкубации с кальциевым ионофором А 23187 (см. рис. 2) и в клеточных суспензиях МФ, примированных ЛПС (см. рис. 1), позволили предположить, что в последнем случае наблюдаемые эффекты обусловлены изменением содержания Ca^{2+} внутри. Для проверки этого предположения была проведена серия опытов по изучению ХЛ-ответа на ионофор А 23187 у МФ, выделенных от животных в различные сроки после инъекции ЛПС.

Как показано на рис. 3, добавление кальциевого ионофора в суспензию интактных МФ в конечной концентрации $1 \text{ мкМ}/10^6$ клеток вызывала 8-кратное относительно фонового уровня увеличение интенсивности свечения. У примированных ЛПС МФ способность отвечать повышением ХЛ на

внесение ионофора А 23187 была значительно ослаблена (см. рис. 3). Максимальное понижение стимулирующего эффекта А 23187 наблюдалось в суспензиях клеток спустя 4 ч после введения животным ЛПС (см. рис. 3). В данный временной интервал интенсивность ХЛ незначительно превышала исходный фон и выходила на стационарный уровень через 2 мин. В последующем происходило постепенное повышение максимального уровня ХЛ в ответ на стимуляцию МФ кальциевым ионофором (см. рис. 3). Однако полного восстановления функциональной способности клеток не отмечалось. Эти результаты находятся в хорошем соответствии с данными литературы о выполнении ионами Ca^{2+} -функции вторичных мессенджеров [7, 8].

Учитывая наличие взаимосвязи между Ca^{2+} -внутри и активностью эффекторных механизмов фагоцитов [2], нами была проведена сравнительная характеристика интенсивности ХЛ-ответов в суспензиях МФ, стимулированных ОЗ и кальциевым ионофором А 23187 в различные сроки с момента инъекции животным ЛПС (рис. 4). Показано, что после введения ЛПС, за исключением интервала 4 ч — 1 сут, изменения в ХЛ-ответах носили разнонаправленный характер. Так, снижение ионофор А 23187-зависимой ХЛ в промежутке 1—6-е сутки коррелировало с увеличением амплитуды ХЛ-ответов на ОЗ и наоборот (см. рис. 4). Поскольку изменение показателей метаболической активности МФ носит антипатный характер, можно предположить возможный переход стимулированных МФ на новый уровень метаболизма с повышенным содержанием в клетке свободного Ca^{2+} . Однако некоторые отклонения в характере этой зависимости наблюдались спустя 4 ч после введения ЛПС (см. рис. 4). В суспензиях примированных МФ, полученных к этому сроку, отмечалось наименьшее повышение интенсивности свечения при стимуляции клеток ионофором А 23187, которое сочеталось с повышением индуцированной ОЗ ХЛ, в 2,3 раза относительно контроля. По-видимому, в ранние сроки имело место увеличение содержания Ca^{2+} внутри в основном за счет поступления Ca^{2+} извне, тогда как в последующем дополнительно активировались механизмы мобилизации Ca^{2+} из внутриклеточных депо, что и давало, вероятно, прирост в амплитуде ХЛ-ответов на ОЗ. Действительно, данное соображение подтверждается сообщениями [7, 8], в которых показано участие внутриклеточных органелл (эндоплазматического ретикула и митохондрий) в экстренной мобилизации Ca^{2+} внутри, а некоторые авторы отводят данному механизму основную роль в активации фагоцитирующих клеток [8, 10].

Несомненное участие Ca^{2+} -зависимых механизмов в примировании МФ ЛПС ставит вопрос о возможности регуляции происходящих в клетке метаболических перестроек с помощью различных веществ, являющихся по своей природе блокаторами Ca^{2+} -зависимых процессов [10, 21]. Результаты проведенного нами исследования с использованием блокатора кальциевых каналов флупатина иллюстрируют рис. 5 и 6. На рис. 5 представлена зависимость подавления амплитуды зимозан-обусловленной ХЛ МФ, полученных от интактных и инъецированных ЛПС животных, в присутствии

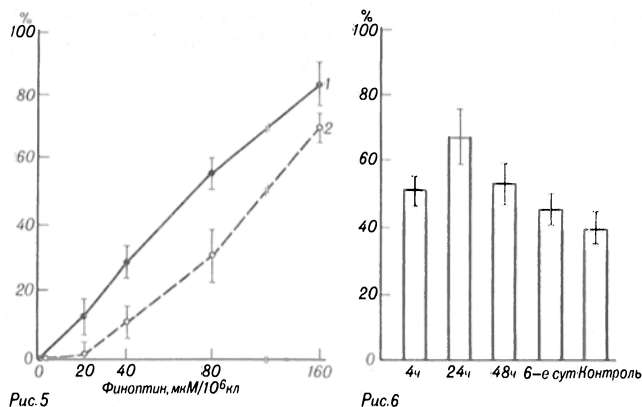


Рис. 5. Подавление зимозан-опосредованной ХЛ различными концентрациями финоптина в суспензиях интактных (1) и примированных (2) МФ, полученных от животных через 24 ч после инъекции ЛПС.

Рис. 6. Финоптинзависимая ингибция ХЛ-ответов на ОЗ в суспензиях МФ, полученных от контрольных животных и в различные сроки после инъекции ЛПС.

За 100 % приняты максимальные амплитуды ХЛ-ответов на ОЗ для каждой из групп МФ при инкубации в среде, не содержащей финоптина.

различных концентраций финоптина. Понижение интенсивности свечения носило выраженный дозозависимый эффект (см. рис. 5). Максимальное его проявление наблюдалось спустя 5 мин после начала инкубации МФ с финоптином. Конечная концентрация антагониста кальция, равная $20 \text{ мкМ}/10^6$ клеток, вызвала заметное подавление ХЛ-ответа интактных, но практически не изменяла интенсивности свечения примированных МФ (см. рис. 5). При дальнейшем повышении концентрации финоптина наблюдалось прогрессивное уменьшение амплитуды ХЛ в обеих исследуемых группах МФ. Однако равные концентрации финоптина в большей степени подавляли опосредованный зимозаном ХЛ-ответ интактных МФ и были менее эффективны в суспензии примированных МФ (см. рис. 5). Так, гашение максимальных пиков свечения в контрольной и опытной группах клеток составляло $59,4 \pm 3,9$ и $31,8 \pm 8,0$ % соответственно при инкубации МФ в среде, содержащей 80 мкМ финоптина. Данное различие может быть обусловлено специфичностью действия антагонистов кальция в области входных ворот кальциевых каналов цитоплазматической мембраны [22] и отсутствием такого влияния на выход Ca^{2+} из внутриклеточных депо [5]. Это подтверждает высказанное выше предположение об увеличении внутриклеточного содержания свободного кальция у примированных МФ и в большей степени за счет его высвобождения из внутриклеточных депо. Ранее было показано, что инозитол-3-фосфат, уровень которого в цитозоле перитонеальных МФ повышался после контакта клеток с ЛПС, ответствен за движение внутриклеточных запасов Ca^{2+} [18].

Поскольку подавление амплитуды ХЛ-ответов стимулированных ОЗ МФ носило дозозависимый характер, а различия в эффективности гашения ХЛ в суспензиях резидентных и примированных ЛПС МФ были максимальными при концентрации финоптина $80 \text{ мкМ}/10^6$ клеток, представляло интерес изучение финоптинзависимой ингибции ХЛ-ответов МФ на ОЗ в динамике эксперимен-

тальной эндотоксемии. Данные, представленные на рис. 6, свидетельствуют о том, что во всех исследованных суспензиях отмечалось понижение амплитуды ХЛ, выраженность которого зависела от времени, прошедшего с момента введения ДПС. В ранние сроки (4 ч) пики ХЛ-ответов примированных МФ не превышали $52,1 \pm 4,1$ % для максимальных значений зимозан-индуцированной ХЛ в этих же суспензиях без предварительной инкубации клеток с финоптином и достоверно отличались от соответствующих показателей для резидентных МФ (см. рис. 6). Наименее чувствительными к действию финоптина оказались суспензии МФ, полученные через 24 ч после введения ЛПС. Интенсивность свечения в этой группе МФ при стимуляции ОЗ составляла $68,2 \pm 8,0$ % (см. рис. 6). В последующем гашение ХЛ финоптином усиливалось, и к 6-м суткам отличия максимальной амплитуды свечения примированных и интактных МФ были недостоверными ($45,9 \pm 4,6$ и $40,6 \pm 3,9$ % соответственно; см. рис. 6). Следует отметить, что обнаруженное нами подавление ХЛ-ответов МФ финоптином находится в соответствии с данными некоторых авторов, показавших возможность модуляции активности МФ антагонистами внутриклеточного высвобождения Ca^{2+} [8, 10, 21].

Таким образом, проведенное нами исследование влияния ЛПС на перитонеальные МФ и сопоставление полученных результатов с данными литературы свидетельствуют об участии кальцийзависимых механизмов в модуляции ХЛ-ответов МФ. Потенцирующее эффекты ДПС действие на различные типы клеток, в том числе и на моноцитарно-макрофагальные, оказывают и низкомолекулярные продукты секреции активированных МФ. Так, последними исследованиями [23] показано, что фактор некроза опухоли, полученный после инкубации моноцитов с ЛПС, напрямую индуцирует продукцию супероксида лейкоцитами периферической крови человека. Данное свойство этих молекул можно рассматривать как синергичный механизм активации МФ в условиях бактериальной эндотоксемии.

Авторы выражают глубокую признательность доктору биол. наук Л. Г. Коркиной за помощь в проведении данного исследования.

ЛИТЕРАТУРА

1. Величковский Б. Т., Коркина Л. Г., Суслова Т. Б. и др. // Вестн. АМН СССР.— 1988.— № 1.— С. 7—14.
2. Маянский А. И., Маянский Д. И. Очерки о нейтрофиле и макрофаге.— Новосибирск, 1989.— С. 11—15.
3. Маянский Д. И., Цырендоржиев Д. Д. // Успехи соврем. биол.— 1990.— Т. 109, № 3.— С. 352—368.
4. Рахмилевич А. Л. // Там же.— С. 379—392.
5. Сперелакис Н. // Физиология и патофизиология сердца.— М., 1988.— С. 241—260.
6. Учитель И. Я. Макрофаги в иммунитете.— М., 1977.— С. 212.
7. Adams D. O., Hamilton T. A. // Ann. Rev. Immunol.— 1984.— Vol. 2.— P. 283—318.
8. Adams D. O., Hamilton T. A. // Ann. Inst. Pasteur. Immunol. (C).— 1986.— Vol. 137, N 2.— P. 229—234.
9. George M. N. // Toxicol. appl. Pharmacol.— 1982.— Vol. 66, N 3.— P. 349—351.
10. Goreckq-Tisera A. M., Snowdowne K. W. // Cell. Immunol.— 1986.— Vol. 100, N 2.— P. 411—421.
11. Griffin F. M., Mullinax P. J. // J. Immunol.— 1990.— Vol. 145, N 2.— P. 697—701.

12. Junod A. F. // Amer. Rev. resp. Dis.— 1987.— Vol. 135.— P. 32—34.
13. Lew D. P. // Europ. J. clin. Invest.— 1989.— Vol. 19.— P. 338—346.
14. Nathan G. F., Karnovsky V. L., David J. R. // J. exp. Med.— 1971.— Vol. 133.— P. 1356—1358.
15. Ogmundsdottir H. M., Weir D. M. // Clin. exp. Immunol.— 1980.— Vol. 40, N 2.— P. 223—234.
16. Phillips H. J. // Tissue Culture: Methods and Applications.— New York, 1973.— P. 26—34.
17. Polyakov V. M., Shepelev A. P., Uvarov V. D., Mezheva I. V. // Prtosp. of Infect. Dis.— Berlin, 1990.— P. 239—240.
18. Pripic-Uhing V., Weiel J. E., Somers J. D. et al. // J. Immunol.— 1987.— Vol. 139, N 2.— P. 526—533.
19. Rosenbaum J. T., Enkel H. B. // Yale J. Biol. Med.— 1987.— Vol. 60.— P. 391—396.
20. Shaso de R. D. // J. Allergy.— 1982.— Vol. 70, N 1.— P. 41—48.
21. Somers S. D., Weiel J. E., Hamilton T. A., Adams D. O. // J. Immunol.— 1985.— Vol. 136, N 11.— P. 4199—4201.
22. Sperelakis N. // The Coronary Artery.— Croom Helm, 1982.— P. 118—167.
23. Vittoz M., Weck A., Maly F. E. // Lymphokin. Res.— 1990.— Vol. 9, N 2.— P. 187—197.
24. Westphal O., Jann K. // Meth. Carbohydr. Chem.— 1965.— Vol. 5, N 1.— P. 823—90.

Поступила 27.10.91

INDUCTION OF Ca^{2+} -DEPENDENT CHEMILUMINESCENCE IN RESPONSE TO BACTERIAL LIPOPOLYSACCHARIDE IN PERITONEAL MACROPHAGES

V. D. Uvarov, A. P. Shepelev, V. M. Polyakov

Institute of Microbiology and Parasitology, Rostov-on-Don

A lipopolysaccharide preparation obtained from *Klebsiella pneumoniae* was shown to affect primarily the peritoneal macrophages after intraperitoneal administration. Transition of the macrophages to a new metabolic state in response to opsonized zymosan was responsible for a distinct increase in the rate of luminol-dependent chemoluminescence. At the same time, the macrophages produced chemiluminescence was only slightly increased in the presence of Ca^{2+} ionophore A23187. These dissimilar alterations observed suggest that the primary reaction of macrophages in response to the lipopolysaccharide occurred with the increase in content of intracellular free calcium. Administration of flunarizine (calcium influx inhibitor) into suspension of macrophages caused a decrease in the rate of chemiluminescence response.

НЕКРОЛОГ

УДК 577.1:92 ЯКОВЛЕВ

ПАМЯТИ НИКОЛАЯ НИКОЛАЕВИЧА ЯКОВЛЕВА



20 августа 1992 г. на 82 году жизни скончался один из крупнейших советских биохимиков, заслуженный деятель науки России профессор Николай Николаевич Яковлев.

Николай Николаевич Яковлев был одним из ведущих специалистов в области биохимии спорта в нашей стране и за рубежом. Он широко известен как педагог, блестящий лектор, исследователь-экспериментатор и организатор науки. Под руководством Николая Николаевича подготовлено большое число специалистов по биохимии спорта.

Его ученики работают во многих городах России и СНГ, а также за рубежом.

Перу профессора Н. Н. Яковлева принадлежат более 350 научных работ и обзоров, монография «Биохимия спорта», 4 учебных пособия и первый в мировой литературе учебник биохимии спорта для институтов физической культуры, выдержавший 4 издания, 13 монографий, а также многие научно-популярные книги, методические письма. Книги Николая Николаевича изданы не только в России, но также в Болгарии, Германии, Чехо-Словакии, Югославии, Румынии, Польше, Китае, Японии, Франции, США, на Кубе.

На протяжении долгого времени профессор Н. Н. Яковлев успешно представлял советскую науку за рубежом, являлся членом президиума рабочей группы ЮНЕСКО по биохимии упражнений.

В последние годы жизни Николай Николаевич особенно активно занимался обобщением и популяризацией достижений зарубежной биохимии спорта через журнал «Теория и практика физической культуры».

Трудовые заслуги Н. Н. Яковлева и его участие в Великой Отечественной войне были отмечены орденами «Отечественной войны», «Знак почета» и 11 медалями, в том числе золотой медалью Госкомспорта СССР.

Николай Николаевич был увлеченным, талантливым человеком с разносторонними интересами, настоящим русским интеллигентом. Он автор мемуаров, многочисленных рассказов, эссе, ярких, красочных акварелей.

Светлая память о Николае Николаевиче, ученом, учителе, доброжелателем, отзывчивом человеке, навсегда сохранится в сердцах его учеников.

Ученики профессора Н. Н. Яковлева