

ТОМ 41

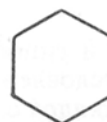
ВЫПУСК 4

ИЮЛЬ—АВГУСТ

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. БЕРЕЗОВ,  
Ю. В. БУКИН, А. В. ВАСИЛЬЕВ, Е. Н. ГЕРАСИМОВА, В. З. ГОРКИН, А. Д. ДУРНЕВ,  
И. Б. ЗБАРСКИЙ, В. Л. КОЗЕЛЬЦЕВ (ответственный секретарь), А. Н. КЛИМОВ,  
Б. Ф. КОРОВКИН, Л. А. ЛОКШИНА, В. Н. ОРЕХОВИЧ, Л. Ф. ПАНЧЕНКО,  
М. Ш. ПРОМЫСЛОВ, Ю. А. РОМАКОВ, В. А. САКС, В. Б. СПИРИЧЕВ, Е. А. СТРОЕВ

---

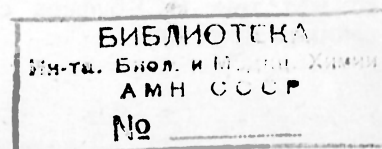
## РЕДАКЦИОННЫЙ СОВЕТ:

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

ТУРАКУЛОВ Я. Х. (Ташкент)  
ТЯХЕПЫЛД Л. Я. (Гарту)  
ЯСАЙТИС А. А. (Вильнюс)



МОСКВА · МЕДИЦИНА · 1995



Л. Г. ЛЕБЕДЕВА, С. С. АЛЕКСАНДРОВА, Ж. Г. КИСЕЛАРЬ,  
И. Д. КИРСАНОВА, С. А. ДЖАВАДОВ, А. Г. БАСНАКЬЯН, И. И. ВОТРИН

## ИЗУЧЕНИЕ СПЕКТРА ЯДЕРНЫХ ЭНДОДНКАЗ МИОКАРДА КРОЛИКА НА МОДЕЛЯХ ИШЕМИИ И САХАРНОГО ДИАБЕТА

Институт биомедицинской химии РАМН, Москва

Ишемия ткани и гипоксия клеток вызывают гибель клеток, обусловленную активацией эндонуклеаз клеточного ядра с последующей деградацией ДНК хроматина [9, 11]. Различают два типа гибели клеток: некроз, происходящий с нарушением целостности внутриклеточных мембран и проникновением лизосомальных ферментов в ядро, и апоптоз (программированная гибель клеток), как правило, начинающийся с активации эндогенных ядерных эндонуклеаз [2, 7]. Данные о том, какой из этих процессов преобладает при ишемии, в частности при ишемии миокарда, в литературе отсутствуют.

Проведенные ранее исследования спектра ядерных эндонуклеаз печени крыс показали присутствие в ткани нескольких ферментов, сильно различающихся по молекулярным массам [1, 3]. В качестве рабочей гипотезы было выдвинуто предположение о роли ограниченного протеолиза в регуляции активности и количества ядерных эндонуклеаз. В настоящее время имеются данные о роли  $\text{Ca}^{2+}$  во включении защитных клеточных механизмов и о том, что этот ион является кофактором протеаз [6]. Они могут не только активировать  $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$ -зависимую эндонуклеазу [12], но, возможно, и влиять на весь эндонуклеазный спектр. В связи с этим исследование тканей с нарушенным метаболизмом кальция представляет большой интерес.

Настоящая работа выполнялась как продолжение предыдущих с целью определения изменений, происходящих в молекулярно-массовом распределении ДНКазной активности ядерных экстрактов (ЯЭ) миокарда кролика при различных патологических состояниях.

**Методика.** В качестве модели был взят миокард новозеландских кроликов (самцы массой 1,7–2 кг) в норме и при патологии. Для проведения эксперимента мы использовали 54 полученных ранее ЯЭ, из которых 12 были контрольными (ЯЭ-Kr), по 6: ЯЭ сердец с 40-, 60-, 80-минутной ишемией (ЯЭ-I<sub>40</sub>, ЯЭ-I<sub>60</sub>, ЯЭ-I<sub>80</sub>), сердец животных, страдавших диабетом (ЯЭ-D), а также тех, у кого 40-минутная ишемия была вызвана на фоне сахарного диабета (ЯЭ-DI<sub>40</sub>), и реперфузированных сердец (ЯЭ-I<sub>40</sub>R<sub>37°C</sub>, ЯЭ-DI<sub>40</sub>R<sub>37°C</sub>). Экстракты, диализованные против 10 мМ трис-HCl-буфера с 50% глицерином, хранили при -20°C.

Для определения спектра ДНКаз в изучаемых нами ЯЭ был проведен электрофорез белков в 12,5% полиакриламидном геле (ПААГ), содержащем 0,1% SDS (0,15×12×12 см) при 30 мА нагель в трис-глициновом буфере pH 8,3 в течение 5 ч [4]. Для определения ДНКазной активности по окончании электрофореза треки геля с исследуемыми образцами разрезали на параллельные полосы по 2 мм. После отмывания их от SDS в течение ночи буфером, содержащим 10 мМ трис-HCl pH 7,7, 25 мкг/л бычьего сывороточного альбумина и 1 мМ DTT, при комнатной температуре каждую полосу помещали в инкубационный буфер, содержащий 2 мМ  $\text{Ca}^{2+}$  + 5 мМ  $\text{Mg}^{2+}$ , 5 мМ меркаптоэтанол и 2 мкг плазмидной ДНК pUC19. После инкубации при 37°C в течение 1 ч реакцию останавливали добавлением 0,2 объема 1% SDS и 1 М ЭДТА.

Активности тестировали в гелях 0,8% агарозы с последующим окрашиванием этидия бромидом (0,5 мкг/мл) и фотографировали при 254 нм. За единицу эндонуклеазной активности принимали такое количество белка ЯЭ, которое необходимо для превращения 50% (1 мкг) суперспиральной формы ДНК в открытую или кольцевую форму за 1 ч инкубации при 37°C. Концентрацию белка определяли по методу Седмака [8].

**Результаты и обсуждение.** Исследование спектра ДНКаз ЯЭ печени крыс, полученных с использованием PMSF и без него, а также обработанных трипсином в различных соотношениях к белку экстракта, показало, что набор ДНКаз каждого экстракта различается по молекулярным массам. В данной работе проводилось аналогичное изучение ДНКазного спектра ЯЭ миокарда кролика в норме и при патологии. Модель ишемии интересна из-за массовой гибели клеток, происходящей при этом процессе, а диабет является дисфункцией миокарда, при котором недостаток инсулина ведет к специфической форме поражения сердца. Ввиду противоречивости имеющихся на сегодняшний день данных о чувствительности сердец у страдающих диабетом к ишемии [5, 13] нами была также взята сопряженная модель.

Установлено, что ЯЭ контрольных сердец кролика содержали 5 активных эндонуклеаз с мол. м. 130, 75, 31, 18 и 15 кД. Во многих последующих тестируемых нами ЯЭ, кроме контрольных

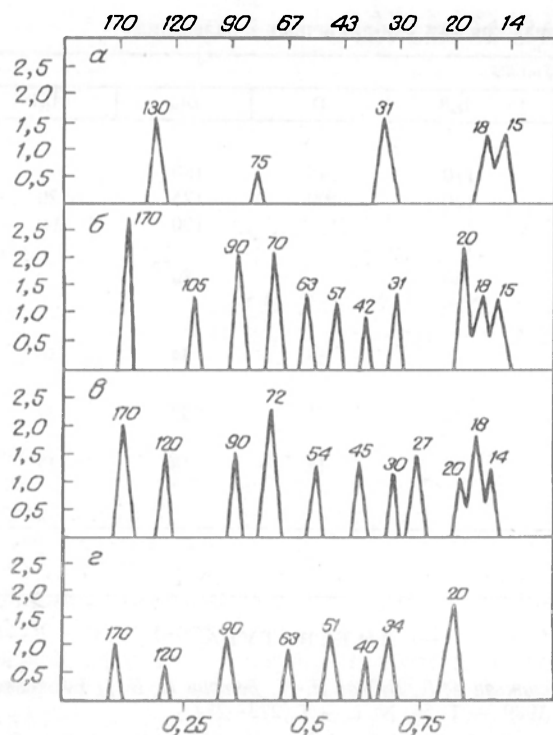


Рис. 1. Зимограмма в 12,5% SDS-ПААГ ДНКазной активности ядерных экстрактов (ЯЭ) миокарда кролика.

Здесь и на рис. 2 по оси абсцисс: сверху — молекулярная масса, кД, внизу — относительная подвижность; по оси ординат — активность, сл. а — контрольные (ЯЭ-Кг); б — с 40-минутной ишемией (ЯЭ- $I_{40}$ ); в — с 60-минутной ишемией (ЯЭ- $I_{60}$ ); г — с 80-минутной ишемией (ЯЭ- $I_{80}$ ).

ных, отмечено присутствие полипептида с мол. м. 170 кД, обладающего высокой нуклеазной активностью. В отличие от контрольных в ЯЭ из сердец кроликов с 40-минутной ишемией (ЯЭ- $I_{40}$ ) было обнаружено 11 нуклеаз, среди которых группа ферментов с мол. м. в диапазоне от 20 до 15 кД, уровень активности которых приближался к таковому у полипептида с мол. м. 170 кД (рис. 1).

В предыдущей работе было выявлено, что самый высокий уровень эндоДНКазной активности в присутствии  $Ca^{2+} + Mg^{2+}$  наблюдался в ЯЭ- $I_{40}$ , в ЯЭ- $I_{60}$  он снижался, в ЯЭ- $I_{80}$  приближался к уровню, наблюдаемому в ЯЭ-Кг, а в присутствии ионов  $Mn^{2+}$  самой высокой нуклеазной активностью обладал ЯЭ- $I_{60}$ . Исходя из ранее полученных данных о том, что  $Ca^{2+}/Mg^{2+}$ -зависимая нуклеазная активность превышает  $Mn^{2+}$ -зависимую в высокомолекулярной области (более 50 кД), а в низкомолекулярной наблюдается обратная картина [1], можно было предположить, что в спектре ДНКаз ЯЭ- $I_{40}$  будут преобладать высокоактивные формы с мол. м. более 50 кД, а в ЯЭ- $I_{60}$  — с более низкими молекулярными массами. И действительно, в ЯЭ- $I_{60}$  и ЯЭ- $I_{80}$  в отличие от ЯЭ- $I_{40}$  наблюдалось появление промежуточной формы с мол. м. 120 кД, а в ЯЭ- $I_{60}$  имелось большое количество низкомолекулярных нуклеаз с высокой активностью.

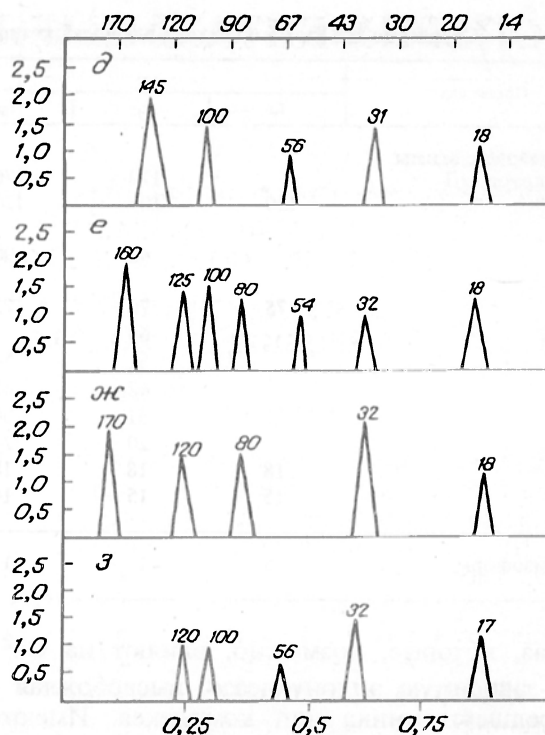


Рис. 2. Зимограмма в 12,5% SDS-ПААГ ДНКазной активности ЯЭ миокарда кролика.

д — страдавших диабетом (ЯЭ-Д); е — с 40-минутной ишемией, вызванной на фоне сахарного диабета (ЯЭ- $DI_{40}$ ); ж, з — реперфузированных сердец (ЯЭ- $I_{40}R_{37^{\circ}C}$ , ЯЭ- $DI_{40}R_{37^{\circ}C}$ ).

В ЯЭ миокарда сердец у больных диабетом (ЯЭ-Д) были обнаружены активные полипептиды с мол. м. 145, 100, 56, 31 и 18 кД, которые обладали ДНКазной активностью. Как видно на рис. 2, д, у высокомолекулярных форм активность была выше, чем у низкомолекулярных.

По мере развития на фоне диабета ишемии наблюдалось изменение нуклеазного спектра экстракта: появление нуклеазы с мол. м. 160 кД и промежуточных форм с мол. м. 125, 80 кД, что аналогично картине молекулярно-массового распределения нуклеаз в ЯЭ сердец с ишемией.

Известно, что в диабетических сердцах  $Ca^{2+}$  на 35% больше, чем в контрольных, возможно, в результате этого диабетические сердца более резистентны к ишемии, при которой наблюдается нарушение кальциевого гомеостаза. Очевидно, как нарушения в метаболизме кальция при ишемии, так и последующая кальциевая перегрузка цитоплазмы при диабете приводят к изменению активности ДНК-эндоуноклеазы.

При реперфузии сердец с 40-минутной ишемией и ишемией, вызванной на фоне сахарного диабета (рис. 2, ж, з), не происходило изменений в изоферментном спектре эндоДНКаз, хотя уровень эндоуноклеазной активности был выше по сравнению с тем, что мы наблюдаем при ишемии, вызванной на фоне диабета, и в ЯЭ- $I_{80}$ , но сравним с эндоДНКазной активностью в ЯЭ- $I_{60}$  и при сахарном диабете.

Для интерпретации полученных результатов интересен факт, что  $Ca^{2+}$  служит кофактором

Сравнение ДНКазного состава ядерных экстрактов (ЯЭ) миокарда кролика при различных заболеваниях

Показатель	Тип ЯЭ							
	Kr	I <sub>40</sub>	I <sub>60</sub>	I <sub>80</sub>	I <sub>40</sub> R	D	DI <sub>40</sub>	DI <sub>40</sub> R
Молекулярные массы ферментов, кД	130	170	170	170	170	145	160	
		105	120	120	120	100	125	120
							100	100
		90	90	90				
	75				80		80	
		70	72					
		63		63				
		51	54	51		56	54	56
	31	42	45	40				
		31	30	34	32	31	32	32
		20	20	20				
		18	18		18	18	18	17
Число изоформ	5	11	11	8	5	5	7	5

протсаз, которые, возможно, влияют на  $\text{Ca}^{2+}$ / $\text{Mg}^{2+}$ -зависимую эндонуклазу, высвобождая ее из предшественника или комплекса. Имеются данные о наличии в мышечной ткани протсаз с оптимальной активностью в нейтральной и щелочной среде и повышении активности щелочной протсазы, обнаруженной в составе миофибрилл сердца [10] при голодании, атрофии и диабете. Из тканей миокарда была выделена также высокоспецифичная  $\text{Ca}^{2+}$ -зависимая нейтральная протсаза [6].

Таким образом, полученные результаты показывают, что при сахарном диабете и ишемии наблюдается изменение спектра ядерных эндоДНКаз по сравнению с нормой, а также спектры этих энзимов в ЯЭ-I отличаются от таковых в ЯЭ-D. Если в ЯЭ-I среди 11 выявленных ДНКаз можно выделить группу из 5 низкомолекулярных пептидов с мол. м. в диапазоне от 30 до 15 кД, то в ЯЭ-D в этом диапазоне выявлена лишь нуклеаза с мол. м. 18 кД и количество активных полипептидов, обладающих ДНКазной активностью, было всего 5 (см. таблицу).

Изменение спектра ДНКаз при различных патологических состояниях: увеличение количества изоформ от 5 в ЯЭ-Kr до 11 в ЯЭ-I, отсутствие в контрольных экстрактах эндонуклазы с мол. м. 130 кД и появление большого количества низкомолекулярных форм (20–14 кД) в ЯЭ-I и фермента с мол. м. более 145 кД — предполагает наличие протсаз, способных включаться в метаболизм в процессе развития заболевания. Эти данные в совокупности с полученными ранее результатами по изменению спектра ДНКаз после обработки ЯЭ трипсином говорят в пользу высказываемой нами гипотезы о существовании высокомолекулярного предшественника эндоДНКаз. Количество и активность образующихся из него эндоДНКаз зависят, вероятно, от действия высокомолекулярных, по всей видимости,  $\text{Ca}^{2+}$ -зависимых протсаз.

## ЛИТЕРАТУРА

1. Баснакьян А. Г., Бубнов Н. В., Вотрин И. И. // Биохимия — 1989. — Т. 54, № 2. — С. 273–283.
2. Fesus L., Davies P. J. A., Piacentini M. // Eur. J. Cell. Biol. — 1991. — Vol. 56. — P. 170–177.
3. Hibino Y., Sugano N. // J. Biochem. — 1985. — Vol. 98, N 6. — P. 1583–1590.
4. Laemmli U. K. // Nature. — 1970. — Vol. 227. — P. 680–685.
5. Mochizuki I., Ishikawa S., Abe M. // Jap. Circulat. J. — 1984. — Vol. 48. — P. 255–265.
6. Reddy M., Etlinger J., Rabinowitz M. et al. // J. biol. Chem. — 1975. — Vol. 250. — P. 4278.
7. Schwartzman R. A., Cidlowski J. A. // Endocr. Rev. — 1993. — Vol. 14, N 2. — P. 133–151.
8. Sedmark T. T., Grossberg S. E. // Analyt. Biochem. — 1977. — Vol. 79. — P. 544–552.
9. Stoler D. L., Anderson G. R., Russo C. A. et al. // Cancer Res. — 1992. — Vol. 52. — P. 4372–4378.
10. Sue W., Wildenthal R. // J. molec. cell. Cardiol. — 1978. — Vol. 10. — P. 669.
11. Tomigana T., Kure S., Narisawa K., Yoshimoto T. // Brain Res. — 1993. — Vol. 608. — P. 21–26.
12. Trump B. F., Berezsky I. K. // Curr. Opin. Cell Biol. — 1992. — Vol. 4. — P. 227–232.
13. Vogel W. M., Apstein C. S. // Circulat. Res. — 1988. — Vol. 62. — P. 975–982.

Поступила 17.10.94

## EXAMINING THE SPECTRUM OF RABBIT MYOCARDIAL NUCLEAR endoDNAases ON ISCHEMIA AND DIABETES MELLITUS MODELS

L. G. Lebedeva, S. S. Aleksandrova, Zh. G. Kiselar, I. D. Kirsanova, S. A. Dzhabadov, A. G. Basnakyan, I. I. Votrin

Institute of Biomedical Chemistry, Russian Academy of Medical Sciences, Moscow

There were alterations in the spectrum of nuclear endoDNAases in the rabbit myocardium on experimental models of diabetes mellitus and other diseases where the perfused heart was involved, i.e. disappearance of the enzyme with 130 kDa from the control extracts was followed by a great increase in the content of low molecular forms in the nuclear preparations obtained from the ischemic heart, as well as that with 145 kDa in all the abnormalities under study.

Е. Е. САФРОНОВА, И. Н. ЛУНГА, С. С. ШИШКИН

**ЭКСПРЕССИЯ ТЕНАСЦИНА В ЛИМФОИДНЫХ КЛЕТКАХ  
И ЕЕ ИЗМЕНЕНИЯ ПОД ДЕЙСТВИЕМ МАЛЫХ ДОЗ  
РЕНТГЕНОВСКОГО ИЗЛУЧЕНИЯ**

Медико-генетический научный центр РАМН, Москва

Недавно обнаруженный онкофетальный белок тенасцин, обладающий весьма своеобразным стрессингом ("гексабрахион"), привлекает внимание многих исследователей [5, 10, 11]. Получены данные об экспрессии и секреции этого белка различными эмбриональными и опухолевыми клетками человека и животных. В частности, показано присутствие тенасцина в мезенхимных опухолях и строме карцином, включая глиомы, фибросаркомы, остросаркомы, меланомы, опухоли Вильмса, карциномы молочной железы, легкого и плоскоклеточные карциномы [14]. Соответственно определенный интерес вызывает вопрос о возможной экспрессии тенасцина в различных клетках лимфоидной природы, включая гибридомные клетки. Ранее было предложено использовать анализ экспрессии определенных генов в гибридных клонах для выявления генотоксического действия физических и химических факторов [6].

Проблема выявления генотоксических эффектов от действия различных по природе внешних факторов на столь сложный организм, как организм человека, представляется весьма многоплановой и, очевидно, не имеет пока общего удовлетворительного решения [1, 9]. Среди трудностей, возникающих при попытках получения объективных оценок, можно отметить реально существующее разнообразие доз, сложность их реконструкции при длительном характере воздействия, как, например, у жителей районов, загрязненных радионуклидами после аварии на ЧАЭС. Вместе с тем установление влияния того или иного фактора при определенном уровне доз на генетический аппарат имеет существенное значение в связи с возможными тяжелыми последствиями на клеточном и организменном уровне. Один из подходов в разработке данной проблемы связан с использованием модельных систем тестирования генотоксических эффектов.

В ряде исследований было показано, что удобной моделью для изучения данной проблемы, особенно при так называемых малых дозах, могут служить стабильные клеточные линии, в частности лимфоидные клетки [6, 7]. В настоящей работе представлены результаты, свидетельствующие об экспрессии тенасцина в некоторых лимфоидных клетках и о влиянии малых доз рентгеновского излучения на эту экспрессию.

**Методика.** В работе использовали препараты лимфоцитов человека и мыши, полученные из периферической крови, а также ряд культивируемых линий лимфоидных клеток различного

происхождения: НИК-1, представляющая собой иммортализованные лимфоциты человека, MOLT-4, оцениваемая как Т-клеточная плазмацитома человека, миелома мыши X-63; мышечные гибридомы MLC-1 и К-48. В отдельных экспериментах в качестве контроля анализировали также клетки культур эмбриональных фибробластов кожи человека. Некоторые линии культивируемых клеток были получены ранее в МГНЦ РАМН, а другие были любезно предоставлены для нашей работы сотрудниками Института цитологии РАН и Гематологического научного центра РАМН.

Препараты лимфоцитов человека получали из 10–30 мл гепаринизированной крови здоровых доноров ( $n = 30$ ) с помощью центрифугирования в градиенте фиколла–всрографина ( $1,077 \text{ г/см}^3$ ) при 400 g в течение 40 мин. Суспензии клеток трижды отмывали средой Хенкса и использовали для экстракции белков.

Лимфоидные клетки различных типов культивировали в среде DMEM с добавлением 15% прогретой сыворотки крупного рогатого скота и 80 мкг/мл гентамицина в пластмассовых флаконах ("Flow", Великобритания).

За 48 ч до выделения белков культуральную среду меняли на среду DMEM без сыворотки. Процедуру повторяли еще раз через 24 ч. Затем выделение белков из культуральной среды проводили, как описано [15], с некоторыми изменениями. Культуральную среду собирали, добавляли к ней этилендиаминтетраацетат натрия (ЭДТА) и фенилметилсульфонилфторид (PMSF) в конечных концентрациях 20 и 10 мМ соответственно. Образцы центрифугировали для удаления клеточных обломков 10 мин при 1000 g и 4–5°C. Супернатант собирали, добавляли к нему сухой сульфат аммония до 30% насыщения. Преципитация проходила при 4–6°C в течение 12 ч. Осадок собирали центрифугированием в течение 30 мин при 15 000 g.

Оставшийся клеточный монослой 3 раза промывали 0,9 М раствором NaCl с последующим центрифугированием при 100 g в течение 15 мин. Затем для экстракции белков добавляли 0,5% тритон X-100 и оставляли на 12 ч при 4–5°C. Клеточные обломки были отделены центрифугированием при 200 g в течение 15 мин.

Концентрацию общего белка в препаратах определяли по методу [8]. Содержание тенасцина в клеточных экстрактах и образцах культуральной среды оценивали с помощью иммуноферментного твердофазного анализа (ELISA). Для построения калибровочной кривой использовали пре-

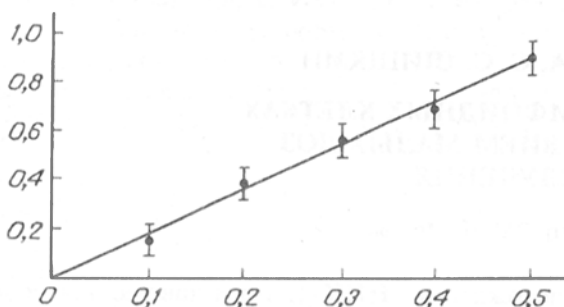


Рис. 1. Калибровочная кривая для определения концентрации тенасцина методом ELISA.

По оси абсцисс — концентрация тенасцина (в мкг/мл), по оси ординат — оптическая плотность (в ед. опт. пл.).

парат тенасцина ("Calbiochem", США). Перед анализом к полученным образцам добавляли 10 мМ карбонат-бикарбонатный буфер pH 9,5 до концентрации белка 1,0 мкг/мл и пробы по 100 мкл в лунку вносили в 96-луночные плашки ("Costar", США). Преинкубация длилась 12 ч при 4–5°C. Сайты неспецифического связывания блокировали 2% раствором бычьего сывороточного альбумина (BSA) в 0,1 М трис-HCl-буфере pH 7,25, содержащем 0,05% твин-20 (TBS), в течение 2 ч при 37°C. Далее для иммуноферментного анализа использовали моноклональные антитела к тенасцину BC-2, полученные из лаборатории проф. Л. Дзарди (Национальный центр исследования рака, Генуя, Италия). Препарат антител растворяли в 0,6% растворе BSA на TBS и использовали в разведении 1/1000. Инкубацию продолжали 2 ч при 37°C, затем к пробам добавляли антимышьи иммуноглобулины, конъюгированные с пероксидазой хрена в разведении 1/30 000. Препарат получен от фирмы "Агро-Бис" (РФ). Образовавшиеся иммунные комплексы выявляли после добавления 0,07% раствора ортофосфатдиамины в 0,1М цитратно-фосфатном буфере pH 5,2, содержащем 0,04% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> в качестве субстрата. Реакцию останавливали добавлением в лунку по 50 мкл 60% серной кислоты и измеряли оптическую плотность при 490 нм на денситометре "Titerteck MultiScan" ("Flow", Англия).

Облучение культивируемых клеток в дозе 2, 10, 15 сГр проводили на импульсной установке рентгеновского облучения "Арина-02" (напряжение на трубке 120 кВ). Для статистической обработки результатов использовали общепринятые методы [2].

**Результаты и обсуждение.** Метод ELISA обеспечивал получение линейной зависимости при анализе тенасцина в диапазоне концентраций 0,05–0,5 мкг/мл (рис. 1). Результаты определения тенасцина в различных лимфоидных клетках и культурах фибробластов приведены в таблице.

Как видно, в экстрактах лимфоцитов человека тенасцин обнаружен не был. Не удалось детектировать этот белок и в клетках НИК-1. Вместе с тем и внутриклеточный, и секретируемый тенас-

Концентрация тенасцина в лимфоидных клетках и эмбриональных фибробластах кожи человека

Тип клеток	Количество независимых экспериментов	Концентрация тенасцина, мкг/мл	
		в экстракте гомогената клеток	в культуральной среде
Лимфоциты человека	3	0,0	-
Лимфоциты мыши	3	0,0	-
НИК-1	3	0,0	0,0
MOLT-4	3	0,32-0,02	0,30-0,02
X-63	3	0,28-0,02	0,24-0,03
MLC-1	3	0,26-0,02	0,21-0,02
K-48	3	0,23-0,01	0,22-0,02
Эмбриональные фибробласты кожи человека	3	0,45-0,03	0,39-0,03

цин присутствовал в двух гибридных линиях MLC и K-48, а также в миеломных клетках. Учитывая роль миеломных клеток как родительских клеток при образовании гибридом, можно предположить, что трансформированный геном миеломных клеток определяет экспрессию тенасцина в гибридомах. Тенасцин был обнаружен также в лимфоидной линии MOLT-4. Это соответствует представлениям о возможном использовании тенасцина как маркера опухолевого перерождения клеток [10].

Обнаруженная способность ряда лимфоидных клеточных линий, в том числе гибридомных клонов, экспрессировать тенасцин открыла возможность для изучения влияния генотоксических факторов на этот маркер. Для указанной цели в качестве повреждающего агента было выбрано рентгеновское излучение, которое достаточно хорошо охарактеризовано как генотоксический фактор и может быть точно дозировано в диапазоне малых доз.

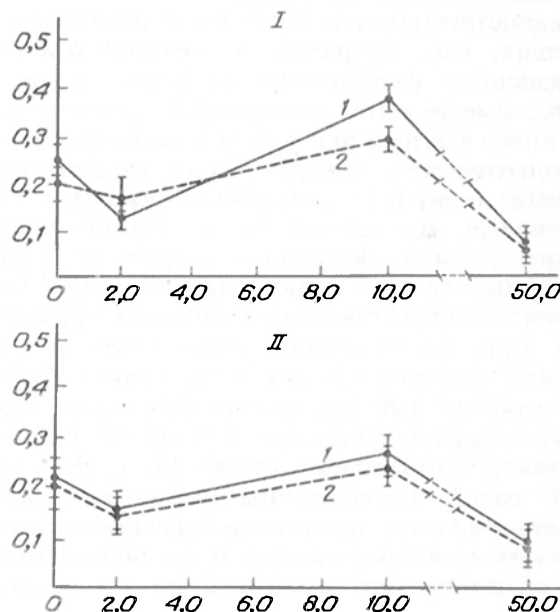


Рис. 2. Зависимость концентрации тенасцина в культуре гибридомы MLC-1 (I) и гибридомы K-48 (II) от дозы облучения.

По оси абсцисс — доза облучения (в сГр), по оси ординат — концентрация тенасцина (в мкг/мл). 1 — экстракт гомогената клеток, 2 — культуральная среда

Результаты измерений содержания тенасцина в клеточных экстрактах и образцах культуральной среды после облучения клеток в разных дозах представлены на рис. 2, I, II. Можно отметить, что для обеих линий гибридом обнаруженные зависимости носили сходный и нелинейный характер. В обеих системах доза облучения 2 сГр вызывала снижение количества тенасцина примерно 2 раза по сравнению с контролем. Однако после облучения в дозе 10 сГр концентрация тенасцина в образцах превышала контрольный уровень в 1,5 раза. Дальнейшее увеличение дозы до 50 мГр сопровождалось выраженным падением уровня тенасцина, еще более значительным, чем при дозе 2 сГр.

Наблюдавшаяся синхронность в изменениях внутриклеточного и секретируемого тенасцина даст основания для предположений о существовании сложных взаимоотношений между процессами деградации и биосинтеза этого белка в изучавшихся системах. Вместе с тем полученные данные свидетельствуют о весьма высокой чувствительности "тенасцинового показателя" в ответ на малые дозы облучения.

До настоящего времени более полно изучены эффекты радиации при значительно более высоких дозах, которые составляют сотни рад и достигают уровней облучения ведущих даже к смертельному исходу у высших организмов [12, 13]. Однако, если исключить аварийные ситуации, в подавляющем большинстве случаев контакты с источниками излучений сопровождаются получением так называемых малых доз, располагающихся в интервале от нескольких сГр до 1 Гр [4]. Исследования эффектов от таких воздействий сопряжены со значительными трудностями и фактически находятся лишь на начальном этапе, а их результаты часто оказываются неожиданными. Например, недавно обнаружены изменения ряда функциональных и морфологических параметров клеток крови под влиянием малых доз радиации [3]. Выявлены также изменения в иммунном статусе лиц, принимавших участие в работах по ликвидации последствий Чернобыльской аварии в 1986—1989 гг. [1]. Наблюдавшийся иммунодефицит был отнесен к клеточному типу и характеризовался в основном снижением Т-зависимого звена иммунитета. Кроме того, у облученных лиц определено статистически достоверное повышение уровня хромосомных аббераций, выявленное при цитогенетическом исследовании лимфоцитов.

Ряд исследователей считают, что в диапазоне малых доз облучения основной массив клеток организма отвечает на воздействие адаптивной реакцией [7]. Одним из проявлений этой адаптивной реакции могут быть изменения экспрессии различных генов, в том числе и тенасцино-

вого гена. В свою очередь возникшие в ходе адаптивной реакции морфофункциональные изменения генетического аппарата клеток возможно становятся предпосылками для различных грозных осложнений, таких как трансформация или апоптоз.

Таким образом, обнаружение чувствительной к малым дозам облучения экспрессии тенасцина в культивируемых лимфоидных клетках может обеспечить создание удобной модели для изучения эффектов от различных повреждающих агентов на клеточном уровне.

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Готлиб В. Я., Пелевина И. И., Конопля Е. Ф. // Радиобиология. — 1991. — Т. 31, № 3. — С. 318.
2. Лакин Г. Ф. Биометрия. — М., 1990.
3. Любченко П. Н., Боженко В. К., Масленникова В. Г. // Лаб. дело. — 1991. — № 8. — С. 47.
4. Оганесян Н. М., Оганджян Э. Е., Меликян И. Е. // Мед. радиол. — 1991. — № 10. — С. 36.
5. Сафронова Е. Е. // Бюл. exper. биол. — 1990. — № 9. — С. 276.
6. Снитковский Д. М., Лунга И. Н., Шишкин С. С. и др. // Вестн. Рос. АМН. — 1992. — № 4. — С. 39.
7. Талызина Т. А., Снитковский Д. М. // Радиобиология. — 1991. — Т. 31, № 4. — С. 606.
8. Bradford M. // *Analyt. Biochem.* — 1976. — Vol. 72. — P. 248.
9. Bucleson V. R., Chambers T. M. // *Environ. Mutagenes.* — 1982. — Vol. 4. — P. 469.
10. Chiquet-Ehrismann R., Mackie E. J., Pearson C. A. // *Cell.* — 1986. — Vol. 47. — P. 131.
11. Erickson H. P., Bourdon M. A. // *Ann. Rev. Cell Biol.* — 1989. — Vol. 5. — P. 71.
12. Feinendegen L. E., Bond V. P., Booz J., Muhlensiepen H. // *Int. J. Radiat. Biol.* — 1988. — Vol. 53. — P. 23.
13. Ishii K., Ayzawa M., Nisonoh J. // *Radiation Research Congress: Abstracts.* — Toronto, 1991. — Vol. 1. — P. 153.
14. Mackie E. J., Chiquet-Ehrismann R., Pearson C. A. // *Proc. nat. Acad. Sci. USA.* — 1987. — Vol. 84. — P. 4621.
15. Monique A., Poschl E., Martin V. K. et al. // *Eur. J. clin. Invest.* — 1988. — Vol. 18. — P. 207.

Поступила 17.10.94

#### LYMPHOID CELLULAR TENASCINE EXPRESSION AND ITS SMALL-DOSE X-RAY IRRADIATION-INDUCED CHANGES

Ye. Ye. Safronova, I. N. Lunga, S. S. Shishkin

Medical Genetic Research Center, Russian Academy of Medical Sciences, Moscow

The oncofetal protein tenascin was detected in some strains of lymphoid cells: murine myeloma X-63, murine hybridoma MLC-1 and K-48 and T-cell plasmacytoma MOLT-4. This effect was in agreement with the concept that tenascin serves as a marker of cell malignancy; such a concept allows one to use the marker in the studies of X irradiation impact on hybridoma clones. A non-linear correlation was found between the content of tenascin and the irradiation dosage, by using two hybridoma strains. There might be alterations in the expression of tenascin in the cultured lymphoid cells while detecting the genotoxic effect produced by different damaging agents.

М. Т. ГЕНГИН, А. Н. ВЕРНИГОРА, Н. Н. НИКИШИН, В. Ю. КЕРИМОВ

**ВЛИЯНИЕ ЭМОЦИОНАЛЬНОГО СТРЕССА НА АКТИВНОСТЬ КАРБОКСИПЕПТИДАЗЫ Н В ОТДЕЛАХ ГОЛОВНОГО МОЗГА КРЫС С РАЗЛИЧНОЙ УСТОЙЧИВОСТЬЮ К НЕМУ**

Кафедра химии Пензенского государственного педагогического института им. В. Г. Белинского

Устойчивые и неустойчивые к эмоциональному стрессу животные характеризуются различным уровнем некоторых нейропептидов в мозге [5, 6, 8]. Характер изменений уровня нейропептидов при стрессе зависит от эмоционального статуса животных [6]. Ферментативные механизмы, обеспечивающие различия в том и другом случае, остаются невыясненными. Известно, что уровень активных нейропептидов зависит от протолитических ферментов, участвующих как в их процессинге, так и в инактивации [9]. Одним из ключевых ферментов процессинга ряда нейропептидов является карбоксипептидаза Н (КФ 3.4.17.10), которая на последней стадии катализирует реакцию отщепления от пропептидов С-концевых основных аминокислот, что приводит к образованию активных форм пептидов [3].

В работе исследовали активность карбоксипептидазы Н в отделах головного мозга устойчивых и предрасположенных к эмоциональному стрессу крыс в норме и при стрессе.

**Методика.** Опыты проводили на белых беспородных крысах-самцах массой 150 — 200 г. По результатам тестирования в открытом поле [12] отбирали устойчивых и предрасположенных к эмоциональному стрессу животных. Однократный эмоциональный стресс вызывали погружением крыс с грузом (20% от массы тела) в сосуд с водой [4]. Для получения модели хронического эмоционального стресса животных в течение 10 сут раз в сутки подвергали вышеуказанному воздействию. Животных декапитировали через 1 и 18 ч после воздействия в случае однократного стресса и через 18 ч после последнего воздействия в случае хронического.

Активность карбоксипептидазы Н определяли по образованию дансил—Phe—Leu из дансил—Phe—Leu—Arg при pH 5,6 как активность, стимулируемую ионами кобальта (II), как описано ранее [2]. Белок определяли методом Лоури [10]. Активность фермента выражали в нмоль дансил—Phe—Leu, освободившегося за 1 мин, на 1 мг белка.

Полученные результаты обрабатывали статистически с использованием *t*-критерия Стьюдента.

**Результаты и обсуждение.** В стриатуме и гипоталамусе активность карбоксипептидазы Н у предрасположенных к эмоциональному стрессу крыс была выше, чем у устойчивых, на 40 и 29% соответственно, в сером веществе, среднем мозге и гипофизе достоверных различий в активности фермента не наблюдалось (см. таблицу).

Влияние эмоционального стресса на активность фермента исследовали в гипофизе — отделе, отвечающем за синтез и секрецию стресс-пептидов [11], гипоталамусе — отделе, регулирующем секрецию стресс-пептидов гипофиза и содержащем значительные количества пептида Δ-сна, вещества Р и энкефалинов, которые вовлекаются в регуляцию ответа на стресс [6 — 8], и стриатуме — отделе, богатом энкефалинами.

В гипофизе через 1 ч после однократного стресса достоверных изменений активности фермента не наблюдалось (см. рисунок, А), через 18 ч активность карбоксипептидазы Н у устойчивых к стрессу животных снижалась на 35% по сравнению с контролем, а у предрасположенных — повышалась на 69%. При этом активность у устойчивых животных составляла 35% от активности у предрасположенных. В условиях хронического стресса активность фермента была выше нормы и у устойчивых, и у предрасположенных животных на 175 и 85% соответственно. Если у устойчивых животных активность фермента при хроническом стрессе была на 322% выше, чем при однократном, то у предрасположенных она не отличалась от активности через 18 ч после однократного стресса.

В гипоталамусе в случае однократного стресса через 1 ч после воздействия активность карбоксипептидазы Н у устойчивых к стрессу животных повышалась на 57%, а у предрасположенных — снижалась на 43% по сравнению с контролем, через 18 ч активность у крыс обеих групп не отличалась от нормы. При воздействии хронического стресса активность фермента у устойчивых к стрессу животных не отличалась от контроля, а у предрасположенных была на 27% выше, чем в норме, и выше, чем через 18 ч после однократного стресса (см. рисунок, Б).

В стриатуме активность карбоксипептидазы Н у предрасположенных к стрессу крыс при стрессе не отличалась от нормы (см. рисунок, В). У устойчивых повышалась по сравнению с нормой на 142 и 40% через 1 и 18 ч после однократного воздействия и на 102% после хронического.

Таким образом, активность карбоксипептидазы Н в отделах головного мозга крыс при эмоциональном стрессе, как и в случае других видов стресса [1], повышается, что хорошо коррелирует с данными разных авторов о повышении уровня нейропептидов при стрессе, в том числе и при эмоциональном [5 — 9, 11]. Показано, что устойчивые и предрасположенные к стрессу животные различаются по активности фермента в гипоталамусе и стриатуме, т. е. в отделах, которые вовлекаются в регуляцию ответа на стресс [7, 11].

Активность карбоксипептидазы Н в отделах мозга крыс с различной устойчивостью к эмоциональному стрессу ( $M \pm m$ ,  $n = 5-6$ )

Отдел	Группа животных		% к устойчивым
	устойчивые к стрессу	предрасположенные к стрессу	
Гипофиз	$6,33 \pm 0,49$	$6,46 \pm 0,34$	102
Гипоталамус	$0,70 \pm 0,05$	$0,90 \pm 0,05^*$	129
Средний мозг	$0,54 \pm 0,05$	$0,53 \pm 0,04$	98
Стриатум	$0,47 \pm 0,03$	$0,66 \pm 0,06^*$	140
Серое вещество	$0,30 \pm 0,03$	$0,33 \pm 0,02$	110

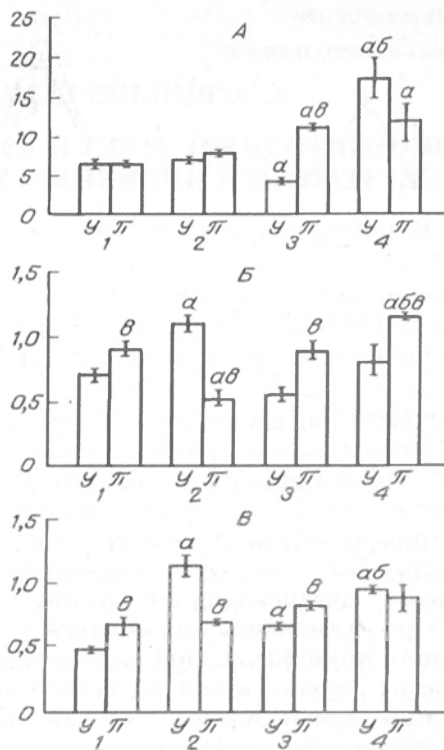
Примечание. Активность выражали в нмолях дансил—Phe—Leu, освобожденного за 1 мин, на 1 мг белка. Звездочка —  $p < 0,05$ .

Необходимо отметить, что активность карбоксипептидазы Н, как и уровень некоторых нейропептидов [6], в условиях эмоционального стресса у животных с различной устойчивостью к нему изменяется по-разному. Динамика изменения активности у устойчивых и предрасположенных к стрессу крыс в гипофизе отличается от таковой в гипоталамусе и стриатуме. Это, по-видимому, связано с тем, что в различных отделах карбоксипептидаза Н может участвовать в процессинге различных нейропептидов [3].

#### ЛИТЕРАТУРА

- Вернигора А. Н., Генгин М. Т., Макарова В. В. // Укр. биохим. журн. — 1992. — Т. 64, № 2. — С. 45 — 49.
- Вернигора А. Н., Генгин М. Т., Никишин П. П. // Биохимия. — 1992. — Т. 57, № 11. — С. 1712 — 1719.
- Вернигора А. Н., Генгин М. Т. // Укр. биохим. журн. — 1993. — Т. 65, № 1. — С. 3 — 12.
- Голова И. Д. // Алкоголизм. — М., 1989. — С. 53 — 54.
- Салиева Р. М., Коплик Е. В., Каменов З. А., Полегаев А. Б. // Бюл. экспер. биол. — 1988. — № 9. — С. 264 — 266.
- Салиева Р. М., Коплик Е. В., Каменов З. А., Полегаев А. Б. // Там же. — 1989. — № 10. — С. 464 — 465.
- Слепушкин В. Д., Лишманов Ю. Б., Залоев Г. К., Прум И. А. // Успехи физиол. наук. — 1985. — Т. 16, № 4. — С. 422 — 424.
- Юматов Е. А., Кириллова О. И., Поннайт М., Ратсак Р. // Журн. высш. нервн. деят. — 1987. — Т. 37, № 2. — С. 371 — 372.
- Hsueh W. A. // International Symposium "Proteases: Potent Role Health and Disease". — New York, 1984. — P. 141 — 151.
- Lowry O. N., Rosebrough N. J., Farr A. L., Randall R. J. // J. biol. Chem. — 1951. — Vol. 193, N 1. — P. 265 — 275.
- Makara G. B., Palkovits M., Szentagothai J. // Selye's Guide to Stress Research / Ed. H. Selye. — New York, 1980. — P. 280 — 337.
- Walsh R. N., Cummins R. A. // Psychol. Bull. — 1976. — Vol. 83, N 2. — P. 482 — 504.

Поступила 18. 07. 94



Влияние эмоционального стресса на активность карбоксипептидазы Н в отделах мозга крыс с различной устойчивостью к нему ( $n = 5-6$ ).

По осям ординат — активность карбоксипептидазы Н (в нмоль в 1 мин на 1 мг белка). А — гипофиз, Б — гипоталамус, В — стриатум. 1 — норма, 2 и 3 — 1 и 18 ч после однократного стресса, 4 — хронический стресс; У — устойчивые, П — предрасположенные к стрессу животные. а —  $p < 0,05$  к норме, б —  $p < 0,05$  к показателям через 18 ч после однократного стресса, в —  $p < 0,05$  между показателями у устойчивых и предрасположенных к стрессу животных.

#### ACTIVITY OF CARBOXYPEPTIDASE H IN VARIOUS BRAIN REGIONS OF RATS WITH VARIOUS RESISTANCE TO EMOTIONAL STRESS

M. T. Gengin, A. N. Vernigora, N. N. Nikishin, V. Yu. Kerimov

V. G. Belinsky Pedagogical Institute, Penza

The activity of carboxypeptidase H involved in metabolism of neuropeptides was studied in rats resistant and predisposed to emotional stress under normal and stress conditions. The enzymatic activity was higher in the striatum and hypothalamus of the rats predisposed to stress than that of stress-resistant animals. Emotional stress resulted in activation of the enzyme in these both groups of animals, while the dynamics of the enzyme activity depended on the resistance of animals to stress and the poststress interval. There was a correlation between the activity of carboxypeptidase H and the content of neuropeptides in animals with varying stress-resistance.

А. А. ВИШНЕВСКИЙ, Э. Я. ЯНГАЛЫЧЕВА, В. М. ЯКОВЛЕВ

**ФОСФОИНОЗИТИДНЫЙ ОТВЕТ И ИЗМЕНЕНИЯ В СУПРАОПТИКО-НЕЙРОГИПОФИЗАРНОЙ СИСТЕМЕ ПРИ ИНДИВИДУАЛЬНОЙ РЕЗИСТЕНТНОСТИ КРЫС К ГИПОКСИИ**

Институт физиологии и экспериментальной патологии высокогорья АН Кыргызской Республики, Бишкек

Приспособление на уровне клеток и субклеточных компартментов сводится к адекватной модификации структуры и функций макромолекул [1].

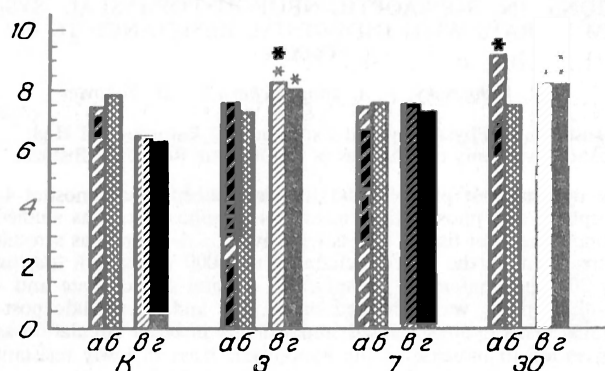
В ряде работ по клеточным, субклеточным и молекулярным основам адаптации в высокогорье показано, что в плазматических, микросомальных и митохондриальных мембранах происходят глубокие приспособительные изменения в составе фосфолипидов, в том числе в фосфатидилинозитоле (PI) — предшественнике полифосфоинозитидов. Эти изменения выражаются в сдвигах содержания, жирнокислотной композиции, насыщенности жирных кислот, особенных для каждого вида тканей, мембран и в каждый период адаптации [7, 9, 10, 15]. Однако сведения о динамике содержания полифосфоинозитидов — фосфатидилинозитол-4-фосфата (PIP) и фосфатидилинозитол-4,5-дифосфата (PIP<sub>2</sub>) — источников вторичных липидных мессенджеров (инозитолфосфатов и диацилглицерола) — в приспособительном процессе при длительных сроках адаптации к недостатку кислорода отсутствуют. Такая информация позволяла бы судить о характере модуляции информационных и регуляторных потоков в клетку, приводящих к активации мишеней вторичных мессенджеров — протеинкиназ и зависимых белков регуляторов, обеспечивающих в свою очередь адаптивные перестройки на уровне генома [14]. Параллельно прослежены изменения в супраоптико-нейрогипофизарной системе у крыс, различающихся по резистентности к барокамерной гипоксии, в условиях которой обнаружены сдвиги в аксональном транспорте нейросекрета [2].

**Методика.** Крысы-самцы линии Вистар массой 140 — 160 г, разделенные за 30 дней до экспозиции по признаку устойчивости к гипоксии по методу Т. Kugimiya и соавт. [13], подвергнуты действию барокамерной гипоксии, 6000 м над уровнем моря, по 6 ч в сутки в течение 30 дней. В каждый срок тренировки (3, 7 и 30-е сутки) забивали методом дскапитации по 6 животных. В тканях печени и головного мозга выделяли PIP и PIP<sub>2</sub> модифицированным методом Т. Nacamura и соавт. [16] — ткань мозга (печени), 800 мг, гомогенизировали дважды в гомогенизаторе типа тефлон—стекло в 8 мл смеси хлороформ—метанол (1:1). После центрифугирования к осадку добавляли 8 мл смеси хлороформ—метанол—конц. HCl (200:100:1,5), гомогенизировали и затем инкубировали 20 мин при 37°C, процедуру повторяли дважды, центрифугировали, супернатант промывали последовательно в 3 мл н. раствора HCl, в 3 мл смеси хлороформ—мета-

нол—0,2% раствор CaCl<sub>2</sub> (3:48:47) и в 3 мл смеси хлороформ—метанол—1 н. раствор HCl (3:48:47). После первых двух промывок удаляли верхнюю фазу, после третьей — верхнюю и среднюю фазы. Экстракт полифосфоинозитидов упаривали под вакуумом, затем проводили тонкослойную хроматографию на пластинах Silufol (Чехословакия), в системе пропанол—4 н. раствор аммиака (2:1). Проявление выполнено реактивом Васьковского—Костецкого. PI выделяли, как описано [8]. Количественную оценку фосфолипидов провели по содержанию неорганического фосфора [3, 12].

Гипоталамическую область мозга и гипофиз фиксировали в жидкости Буэна. Фронтальные и сагиттальные парафин-целлоидиновые срезы раскладывали на ступенчатые серии и окрашивали паральдсгидфуксином по Гомори — Габу с докрашиванием азокармином. Для оценки содержания РНК срезы окрашивали галлоцианином по Эйпорсону и метиловым зеленым — пиронином по Браше. Функциональное состояние супраоптико-нейрогипофизарной системы оценивали с помощью количественных и полуколичественных методик [5, 6, 11].

**Результаты и обсуждение.** Выяснилось, что в мембранах мозга произошло повышение содержания PI на 3-и сутки адаптации в барокамере — у высокоустойчивых крыс его уровень составил 121% ( $p < 0,01$ ), а у низкоустойчивых — 116% ( $p < 0,05$ ). На 7-е и 30-е сутки тренировки уровень PI был близок к контрольному, как в ткани мозга, так и в печени. Для полифосфоинозитидов мозга также отмечалось незначительное повышение содержания на 3, 7 и 30-е сутки. В печени наблюдалась более сложная картина (см. рисунок). У высокоустойчивых животных на 3-и сутки тренировки уровень PIP составил 8,2 мкг Р на 1 г ткани, в контрольной группе — 6,4 мкг Р на 1 г ткани ( $p < 0,02$ ), а PIP<sub>2</sub> — 8,0 мкг Р на 1 г ткани, в контроле — 6,2 мкг Р на 1 г ткани ( $p < 0,05$ ). На 7-е сутки содержание полифосфоинозитидов у высокоустойчивых крыс было несколько выше по сравнению с низкоустойчивыми. К 30-м суткам уровень PIP составил 8,1 и 9,1 мкг Р на 1 г ткани, в контроле — 6,4 и 7,4 мкг Р на 1 г ткани ( $p < 0,05$  и  $p < 0,05$ ) у высоко- и низкоустойчивых животных соответственно, у высокоустойчивых крыс содержание PIP<sub>2</sub> повысилось до 8,1 мкг Р на 1 г ткани ( $p < 0,02$ ). В низкоустойчивой группе не наблюдалось значительных изменений в содержании PIP<sub>2</sub> во все сроки тренировки, что наводит на мысль о более существенных сдвигах фосфоино-



Содержание полифосфоинозитидов в ткани печени крыс, различающихся по устойчивости к гипоксии при барокамерной тренировке (6000 м над уровнем моря, 6 ч в сутки в течение 30 дней).

K — контрольные группы. По оси абсцисс — дни тренировки; по оси ординат — мг: Р на 1 г ткани. Одна звездочка —  $p < 0,05$ , две —  $p < 0,02$ . а — уровень фосфатидилинозитол-4-фосфата у низкоустойчивых крыс; б — уровень фосфатидилинозитол-4,5-дифосфата у высокоустойчивых крыс; а и б — аналогичные показатели у высокоустойчивых крыс.

зитидного ответа у высокоустойчивых к гипоксии крыс. Вероятно, эти различия в модуляции уровней предшественников вторичных мессенджеров сказываются на формировании эффективного ответа клеток, на клеточных приспособительных возможностях.

При изучении сосудистых и тканевых реакций головного мозга крыс и изменений в супраоптико-нейрогипофизарной системе обнаружены расстройства в мозговом кровообращении во всех сериях опытов независимо от длительности экспозиции в барокамере, увеличение массы гипофиза у низкоустойчивых крыс в ранние сроки, а у высокоустойчивых — на 30-е сутки. У высокоустойчивых животных с первых дней тренировки относительное содержание нейросекреторного вещества в нейрогипофизе нарастает, но к 30-м суткам его содержание в обеих группах снижается до 0,5 — 1,0 балла, в контроле — до 2 — 3 баллов (табл. 1).

Наблюдалось изменение формулы популяций нейронов в супраоптическом ядре. Наряду с активно выводимыми нейросекрет нейронами Ia типа появляются нейроны Ib типа с умеренным темпом выведения, перинуклеарной локализацией. Секретообразование и секретовыведение в супраоптико-нейрогипофизарной системе в первые дни тренировки сменяется "истощением" на 30-е сутки, вероятно, происходит переход на адекватный новым условиям режим функционирования, о чем свидетельствуют данные карิโอметрии ядер и ядрышек нейронов супраоптического ядра, по которым можно судить об увеличении содержания РНК нейронов и элементов глии (табл. 2). Для низкоустойчивой группы крыс наблюдалось выраженное увеличение объема ядер и ядрышек, в обеих группах отмечены кистоподобные полости, наполненные большим количеством лейкоцитов, без окрашенного нейросекрета, что может быть следствием дегенерации терминалей аксонов.

Таблица 1

Содержание нейросекреторного вещества в нейрогипофизе при 30-дневных гипоксических тренировках крыс в барокамере (6000 м над уровнем моря, 6 ч в сутки в течение 30 дней)

Сроки тренировки	Содержание нейросекреторного вещества, баллы	
	низкоустойчивая группа (n = 6)	высокоустойчивая группа (n = 6)
Контроль	2,5 ± 0,5	2,5 ± 0,5
3-и сутки	1,7 ± 0,3	3,0 ± 0,3
7-е сутки	1,5 ± 0,3*	3,5 ± 0,5
30-е сутки	0,5 ± 0,2*	0,7 ± 0,3*

Примечание. Здесь и в табл. 2 звездочка — статистически достоверное различие.

Таблица 2

Данные карิโอметрии ядер и ядрышек нейронов супраоптического ядра при 30-дневных гипоксических тренировках крыс в барокамере (6000 м над уровнем моря, 6 ч в сутки в течение 30 дней)

Срок тренировки	Объемы ядер и ядрышек в супраоптическом ядре, мкм <sup>3</sup>			
	низкоустойчивая группа (n = 6)		высокоустойчивая группа (n = 6)	
	ядра	ядрышка	ядра	ядрышка
Контроль	410,7 ± 41,9	5,7 ± 0,3	431,8 ± 33,7	6,5 ± 0,3
3-и сутки	424,4 ± 23,7	6,7 ± 0,3*	422,2 ± 25,3	6,3 ± 0,2
7-е сутки	495,3 ± 36,5*	8,8 ± 1,0*	537,4 ± 17,2*	7,3 ± 0,3
30-е сутки	558,9 ± 12,5*	8,2 ± 0,3*	410,0 ± 4,6	6,7 ± 0,2

Таким образом, изменение активности фосфоинозитидной мессенджерной и супраоптико-нейрогипофизарной систем при адаптации к гипоксии свидетельствует о многоплановом характере перестройки: нейроэндокринного, клеточного и субклеточного звеньев регуляции. Механизмы регуляторных и корреляционных взаимодействий этих систем нуждаются в дальнейшем изучении.

Полученные данные свидетельствуют о различной стратегии приспособительных модификаций супраоптико-нейрогипофизарной системы и фосфоинозитидных источников мессенджеров клетки у крыс с неодинаковой устойчивостью к гипоксии, что подтверждает известное положение о возможности формирования индивидуальных адаптационных моделей в ответ на идентичное возмущающее действие [4].

## ЛИТЕРАТУРА

1. Введение в биомембранологию / Под ред. А. А. Болдырева. — М., 1990.
2. Закиров Д. З. Гипофизарно-адреналовая система при сложных формах адаптации. — Фрунзе, 1979.
3. Колб В. Г. Клиническая медицина. — Минск, 1976.
4. Медведев В. И. // Физиология человека. — 1981. — Т. 7, № 3. — С. 398.
5. Поленов А. А. // Арх. анат. — 1962. — № 9. — С. 3 — 16.
6. Поленов А. А. Гипоталамическая нейросекреция. — Л., 1971.
7. Терновой В. А., Яковлев В. М. // Вопр. мед. химии. — 1990. — № 1. — С. 58 — 61.
8. Финдлей Д., Эванс У. Биологические мембраны. — М., 1990. — С. 167 — 169.
9. Яковлев В. М., Терновой В. А., Михайлов И. В. // Изв. АН Кирг. ССР. — 1990. — № 2. — С. 99 — 104.

10. Яковлев В. М., Терновой В. А., Михайлов И. В. // Физиология человека. — 1992. — № 5. — С. 95 — 103.
11. Янгальчева Э. А. // Косм. биол. — 1989. — № 6. — С. 54 — 61.
12. Horrocks L. A., Sun G. Y. // N. Meris. R. R. — 1972. — Vol. 1. — P. 223.
13. Kugimiya T. et al. // J. exp. Med. — 1984. — Vol. 144. — P. 315 — 320.
14. Silvia I. et al. // Cell. — 1988. — Vol. 54. — P. 651.
15. Ternovoi V. A. et al. // Society of Pathophysiology. Congress: Abstracts. — Moscow, 1991. — P. 263.
16. Toshihiko Necamura et al. // Analyt. Biochem. — 1989. — Vol. 179. — P. 127 — 130.

Поступила 29.07.94

# THE PHOSPHOINOSITIDE RESPONSE AND ALTERATIONS IN SUPRAOPTIC-NEUROHYPOPHYSEAL SYSTEM IN RATS WITH INDIVIDUAL RESISTANCE TO HYPOXIA

A. A. Vishnevsky, E. A. Yangalycheva, V. M. Yakovlev

Institute of Physiology and Experimental Pathology of High Lands, Academy of Sciences of the Kirghiz Republic, Bishkek

The dynamics of phosphatidyl inositol, phosphatidyl inositol-4-phosphate and phosphatidyl inositol-4,5-diphosphate was studied in brain and liver tissues of rats with hypoxia developed as a result of treatment in the altitude chamber at 6.000 m, daily 6 hrs, on day 30. The content of phosphatidyl inositol-4-phosphate and -4,5-diphosphate was increased on days 3 and 30 altitude post-training. This hypoxia caused impairments in brain circulation as well as led to increase in the hypophysis mass in lowly resistant rats within early periods of treatment and in highly resistant animals on day 30.

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 1995

УДК 616.155.3-008.931:577.152.34]-02:612.014.482]-092.9-07

Г. Н. СУРКЕНОВА, Л. В. МАЛАХОВА, А. И. ГАЗИЕВ

## ИЗМЕНЕНИЕ ПРОТЕОЛИТИЧЕСКОЙ АКТИВНОСТИ ЯДЕР ЛЕЙКОЦИТОВ ВЕНОЗНОЙ КРОВИ $\gamma$ -ОБЛУЧЕННЫХ КРОЛИКОВ

Институт теоретической и экспериментальной биофизики РАН, Пущино Московской области

В настоящее время хорошо доказана локализация различных протсиназ в клеточном ядре млекопитающих [3, 5, 8, 10, 11, 14, 17]. Некоторые из этих протсиназ прочно ассоциированы с хроматином и имеют строгую специфичность к отдельным белкам [7, 9, 19]. Предполагается, что ядерные протеиназы играют роль в процессах регуляции экспрессии генов, репликации и репарации ДНК [2, 9, 16].

Изучение пострадиационной активности ядерных протсиназ в тканях млекопитающих представляет существенный интерес как для понимания механизмов гибели клеток, так и для оценки тяжести лучевого поражения организма. Ранее было показано, что в ядрах печени, тимуса и лейкоцитов периферической крови  $\gamma$ -облученных крыс значительно повышается активность протеиназ [1, 4, 6]. Активируемые в клетках облученных крыс протеиназы способны расщеплять казеиновый субстрат [1, 3, 5, 6], вместе с тем некоторые радиационно-активируемые протсиназы строго специфичны к гистонам [9]. В ядрах лейкоцитов  $\gamma$ -облученных крыс наблюдается повышение активности Са-зависимой протсиназы с оптимумом pH 8,5 и протеиназы с оптимумом pH 10,5. Повышенная активность этих протсиназ, определяемая с помощью казеинового субстрата, сохраняется на протяжении 48 ч от момента облучения крыс [5]. При определении активности ядерных протеиназ лейкоцитов у крыс кровь получали путем декапитации животных. Однако исследование протеиназной активности в ядрах лейкоцитов с целью определения лучевой реакции организма требует взятия крови у одного и того же объекта до и после облучения. Поэтому в настоящей работе мы изучали активность ядерных протеиназ в лейкоцитах венозной

крови у кроликов, взятой до и после их  $\gamma$ -облучения.

**Методика.** В работе использовали 20 белых кроликов-самцов новозеландской породы массой 2,5—3 кг. Животных облучали на установке  $^{60}\text{Co}$  (ГУБЭ) при мощности дозы 1,5 Гр/мин. Кровь (2 мл) брали из красной вены уха путем ее надреза в стеклянную центрифужную пробирку с холодным физиологическим раствором, содержащим гепарин в концентрации 5 ЕД/мл. Дальнейшую процедуру выделения ядер из общей фракции лейкоцитов проводили при 2°C, как описано в работе [6] с некоторыми модификациями. Кровь, смешанную с физиологическим раствором, центрифугировали 7 мин при 3000 об/мин, надосадочную жидкость осторожно сливали, а к оставшимся форменным элементам крови медленно при перемешивании стеклянной палочкой добавляли раствор сахарозы до конечной концентрации 0,25 М, содержащей 0,01 М трис-НСl pH 7,4, 0,005 MgCl<sub>2</sub>, 0,025 М KCl (буфер ТКМ) и 0,5% тритон X-100. Через 7 мин суспензию центрифугировали при 3000 об/мин 5 мин. Далее осадок ядерного материала дважды обрабатывали следующим образом: при перемешивании к ядрам добавляли 8 мл раствора 0,25 М сахарозы с 0,5% тритоном X-100 в буфере ТКМ, суспензию ядер гомогенизировали пятью движениями пестика в стеклянном гомогенизаторе и через 7 мин центрифугировали 5 мин при 3000 об/мин. Осадок промывали раствором 0,25 М сахарозы в буфере ТКМ и ресуспендировали в 0,2 мл физиологического раствора. Протеолитическую активность ядер определяли флуоресцентным методом, используя в качестве субстрата для ядерных протеиназ казеин с флуоресцентной меткой (флуоресцин-изотиоцианат) [20]. Флуоресценцию измеряли на

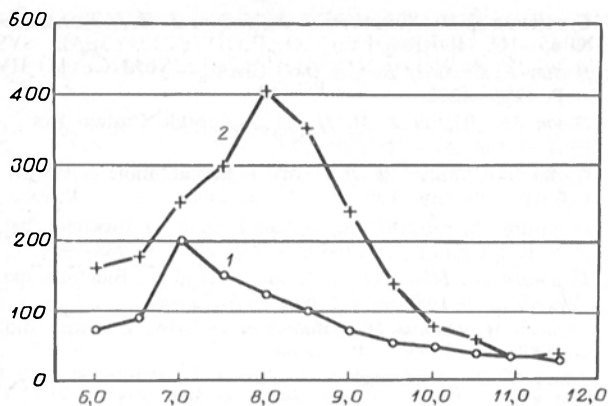


Рис. 1. Зависимость активности ядерных протеиназ лейкоцитов венозной крови кроликов от величины pH инкубационной среды в отсутствие  $\text{Ca}^{2+}$  (1) и в присутствии  $\text{Ca}^{2+}$  в концентрации 20 мМ (2).

По оси абсцисс — значение pH; по оси ординат — активность, ед. флуоресценции на 1 мг общего белка. Представлены типичные кривые, полученные в 5 опытах. В одном опыте использовали суспензию ядер лейкоцитов крови одного кролика.

спектрофлюориметре MPF-44B (“Perkin-Elmer”, США). Протеолитическую активность образцов ядер выражали в относительных единицах флуоресценции на 1 мг белка или в процентах от активности соответствующих контрольных препаратов, полученных от необлученных животных. Содержание белка в образцах ядер определяли по методу Лоури и соавт. [13].

Результаты и обсуждение. На рис. 1 показано изменение активности ядерных протеиназ лейкоцитов венозной крови необлученных кроликов в зависимости от величины pH, при которой ядерные препараты инкубировали с казеиновым субстратом. Из этих данных (кривая 1) видно, что оптимум ферментативной активности находится в нейтральной области. В ядрах лейкоцитов венозной крови кроликов при использовании казеинового субстрата не обнаруживается протеиназы с оптимумом pH в щелочной области, найденной нами в ядрах клеток периферической крови крыс [5]. В то же время при добавлении в инкубационную среду ионов  $\text{Ca}^{2+}$  максимум протеолитической активности смещается до значения pH 8,0, при котором протеолитическая активность в ядрах возрастает более чем в 3 раза (кривая 2). Исходя из этих результатов, в последующих основных экспериментах значения активностей протеолитических ферментов ядер лейкоцитов крови кроликов определяли при pH 7,0 и pH 8,0 + 20 мМ  $\text{Ca}^{2+}$  в инкубационной среде.

Поскольку анализы протеиназной активности ядер лейкоцитов проводили у одних и тех же животных до облучения и после облучения, для снижения возможного влияния эмоционально-болевых стрессов на результаты экспериментов интервалы между взятием крови из вены кролика составляли примерно 2 сут. На рис. 2 представлены результаты исследования протеиназной активности в ядрах лейкоцитов крови, взятой у кроликов за 48 ч до облучения и через 2, 48, 96 ч

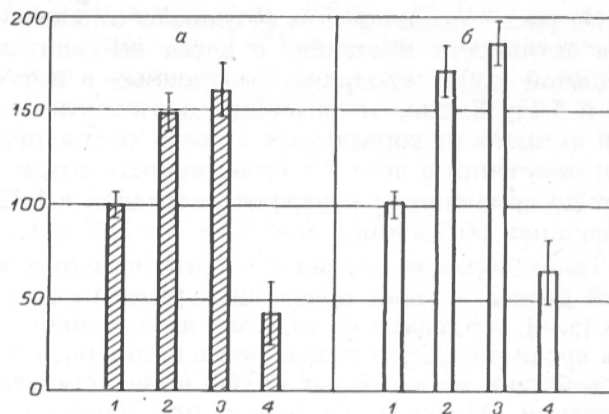


Рис. 2. Протеиназная активность в ядрах клеток крови кроликов, облученных в дозе 5 Гр.

По оси абсцисс — время: 1 — за 48 ч до облучения, 2, 3, 4 — соответственно через 2, 48, 96 ч после облучения; по оси ординат — активность, %. Ядра инкубировали при pH 7,0 (А), 8,0 + 20 мМ  $\text{Ca}^{2+}$  (Б). Здесь и на рис. 3 за 100% принята активность в ядрах необлученных животных.

после  $\gamma$ -облучения в дозе 5 Гр. Эти данные указывают, что у кроликов, облученных в дозе 5 Гр, через 2 и 48 ч после воздействия радиации наблюдается существенное повышение активности протеиназ в ядрах лейкоцитов по сравнению со значениями, полученными до облучения. А через 96 ч после облучения эта активность снижается в среднем до 40—60% от контрольного уровня, причем эти изменения в активности протеиназ ядер лейкоцитов регистрируются при pH среды 7,0 и 8,0 (в присутствии ионов  $\text{Ca}^{2+}$ ).

При проведении опытов, результаты которых представлены на рис. 2, была установлена незначительная разница в значениях протеолитических активностей ядер лейкоцитов крови необлученных отдельных особей. Желая полностью исключить возможное влияние на результаты анализов процедур получения крови и связанных с ними стресса и потери крови, мы провели еще одну серию экспериментов только с единственным взятием крови у каждого кролика через 48 ч после облучения. В этих экспериментах также удалось обнаружить повышение активности ядерных протеиназ, способных расщеплять казеин.

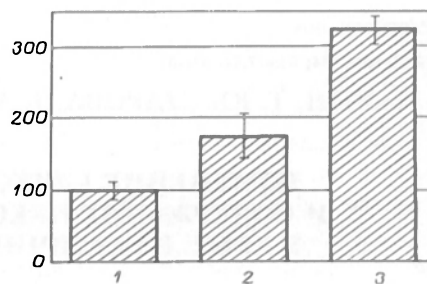


Рис. 3. Протеиназная активность в ядрах лейкоцитов венозной крови кроликов через 48 ч после их облучения  $\gamma$ -радиацией.

По оси абсцисс — доза облучения: 1 — 0 Гр, 2 — 2,5 Гр, 3 — 5 Гр; по оси ординат — активность, %. Определение активности в ядрах проводили при pH 7,0.

На рис. 3 представлены результаты определения активности протеиназ в ядрах лейкоцитов венозной крови кроликов, облученных в дозах 2,5 и 5 Гр. Видно, что величина протеолитической активности коррелирует с дозой облучения: при облучении в дозе 2,5 Гр активность возрастает по сравнению с контролем в среднем в 1,75 раза, а при облучении в дозе 5 Гр — в 3,25 раза.

Таким образом, результаты, представленные в этой работе, а также полученные ранее на крысах [5, 6], указывают на то, что в ядрах лейкоцитов крови повышается активность протеиназ при воздействии на животных *in vivo* ионизирующей радиации. Однако эта активация протеиназ в ядрах лейкоцитов облученных животных наблюдается только в первые часы и сутки пострадиационного периода. Механизмы повышения протеолитической активности в ядрах клеток облученного организма не выяснены. Несомненно, активация протеиназ в ядрах клеток имеет существенное значение в реализации радиационных повреждений. Как известно, ингибиторы протеиназ снижают частоту мутаций [21], подавляют малигнизационную трансформацию клеток, облученных ионизирующей радиацией [18], и увеличивают выживаемость облученных клеток и животных [12, 15]. Возможно, повышенная активность протеиназ в ядрах лейкоцитов  $\gamma$ -облученных животных, расщепляя белки хроматина этих клеток, способствует деградации ДНК нуклеазами и гибели клеток. С другой стороны, полученные результаты дают основание для изучения протеиназной активности ядер лейкоцитов периферической крови человека для оценки лучевых воздействий в условиях клиники.

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Газиев А. И., Малахова Л. В., Куций М. П. // Радиобиология. — 1987. — Т. 27, № 2. — С. 166—170.
2. Газиев А. И., Закржевская Д. Т., Казанцев А. П., Ким К. Х. // Там же. — С. 354—357.
3. Куций М. П., Малахова Л. В., Газиев А. И. // Биохимия. — 1987. — Т. 52, № 8. — С. 1315—1318.
4. Куций М. П., Закржевская Д. Т., Газиев А. И. // Там же. — 1992. — Т. 57, № 10. — С. 1548—1553.
5. Малахова Л. В., Суркенова Г. П., Газиев А. И. // Радиобиология. — 1990. — Т. 30, № 3. — С. 312—316.

6. Суркенова Г. И., Малахова Л. В., Газиев А. И. // Там же. — № 6. — С. 740—744.
7. Bartley J., Chalkley R. // J. biol. Chem. — 1970. — Vol. 245. — P. 4286—4292.
8. Dyson M., Walker J. M. // Int. J. Peptide Protein Res. — 1984. — Vol. 24. — P. 201—207.
9. Gaziev A. I., Kutsyi M. P. // Int. J. Radiat. Biol. — 1992. — Vol. 61. — P. 169—174.
10. Hagiwara H., Miyazaki K., Matuo Y. et al. // Biochem. biophys. Res. Commun. — 1980. — Vol. 94. — P. 988—994.
11. Hagiwara H., Miyazaki K., Matuo Y. et al. // Biochim. biophys. Acta. — 1981. — Vol. 660. — P. 73—82.
12. Korbelik M., Osmark M., Suhar A. et al. // Int. J. Radiat. Biol. — 1988. — Vol. 54. — P. 462—474.
13. Lowry O. H., Rosebrough N. J., Farr A. L., Randall R. J. // J. biol. Chem. — 1951. — Vol. 193. — P. 265—275.
14. Motizuki M., Tsurugi K., Ogata K. // Europ. J. Biochem. — 1984. — Vol. 138. — P. 39—43.
15. Palladino M. A., Galton J. E., Troll W., Thorbecke G. J. // Int. J. Radiat. Biol. — 1982. — Vol. 41. — P. 183—191.
16. Penner P. E. // Canad. J. Biochem. — 1979. — Vol. 57. — P. 1026—1029.
17. Strack P. R., Waynberg E. F., Waxman L., Fagen J. M. // Biomed. biochim. Acta. — 1991. — Vol. 50. — P. 479—481.
18. Troll W., Weisner R., Frankel K. // Advanc. Cancer Res. — 1987. — Vol. 49. — P. 265—283.
19. Tsurugi K., Ogata K. // J. Biochem. — 1986. — Vol. 99. — P. 237—241.
20. Twining S. S. // Analyt. Biochem. — 1984. — Vol. 143. — P. 30—34.
21. Umezawa K. // Proteinase Inhibitors: Medical and Biological Aspects / Eds. N. Katinuma et al. — Tokyo, 1983. — P. 77—83.

Поступила 07.06.94

#### CHANGES IN THE PROTEOLYTIC ACTIVITY OF VENOUS LEUKOCYTIC NUCLEI IN $\gamma$ -IRRADIATED RABBITS

G. N. Surkenova, L. M. Malakhova, A. I. Gaziyeu

Institute of Theoretical and Experimental Biophysics, Russian Academy of Sciences, Pushchino

In terms of their capacity to decompose a casein substrate, the activity of nuclear proteinases was studied in the leukocytes of the rabbit blood taken before and after their joint  $\gamma$ -irradiation. There was a substantial increase in the activity of proteinases in the leukocytic nuclei 2 and 48 hours after animals had been irradiated in a dose of 5 Gy as compared with those obtained prior to irradiation. Ninety six hours after irradiation the activity showed an average decrease to 40-60% of the control level. There was a correlation between the proteolytic activity and the irradiation dose: there were average 1.75- and 3.25-fold activity increases with 2.5 and 5.0 Gy, respectively. The findings provide a rationale for examining the proteinase activity of human peripheral leukocytic nuclei to clinically estimate radiation exposures.

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 1995

УДК 616-018+616.154+616.634]-02:612.014.43]-07

Л. Е. ПАНИН, Т. Ю. СТАРОВА, Т. А. ТРЕТЬЯКОВА, А. Р. КОЛПАКОВ, И. Е. КОЛОСОВА, В. Н. СОЛОВЬЕВ

#### ИЗМЕНЕНИЕ ГЛИКОЛИЗА И ГЛИКОГЕНОЛИЗА В ТКАНЯХ И СОДЕРЖАНИЕ НЕКОТОРЫХ ГОРМОНОВ В КРОВИ И МОЧЕ У КРЫС В РАЗЛИЧНЫЕ СРОКИ ХОЛОДОВОЙ АДАПТАЦИИ

Институт биохимии Сибирского отделения РАН, Новосибирск

Холодовое воздействие вызывает значительные изменения гормональной регуляции энергетического обмена. Это связано с увеличением продукции глюкокортикоидов, катехоламинов,

тиреоидных гормонов [10, 15]. Показано, что введение экспериментальным животным нордигалина, трийодтиронина (Т<sub>3</sub>) или инсулина с глюкозой повышает их термоустойчивость [1].

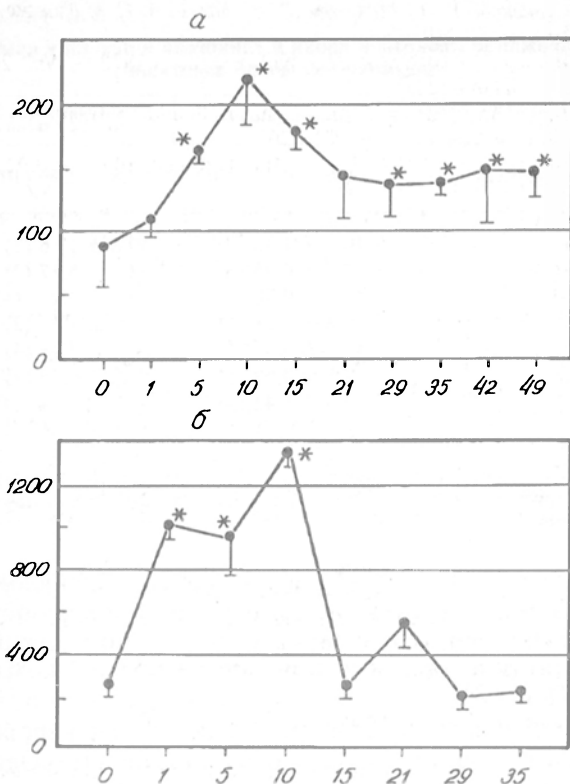


Рис. 1. Суточная экскреция с мочой А (а) и НА (б) у крыс при длительном холодовом воздействии.

По оси абсцисс здесь и на рис. 2, а, б — сутки, по оси ординат — уровень катехоламинов, нг. Звездочка —  $p < 0,05$  по сравнению с контролем, достоверность определена разностным методом.

Все перечисленные выше гормоны, кроме глюкокортикоидов, усиливают поглощение глюкозы тканями, что согласуется с увеличением скорости гликолиза при кратковременном или длительном воздействии холода на организм животных [4, 5, 16, 17].

Известно, что в энергетике организма при адаптации к холоду важную роль играют свободные жирные кислоты (СЖК) [11, 12], источником которых являются липопротеины очень низкой плотности (ЛПОНП). Известно также, что содержание последних в крови под влиянием холода существенно возрастает [9]. По-видимому, в этих условиях можно говорить о фазовых изменениях скорости гликолиза в тканях и относительном вкладе его в теплопродукцию.

В данном исследовании впервые предпринята попытка проследить фазовые изменения продукции адаптивных гормонов, а также состояния ключевых ферментов гликолиза и гликогенолиза в тканях у крыс в динамике холодовой адаптации.

**Методика.** Работа выполнена на белых крысах-самцах линии Вистар. Холодовую адаптацию изучали в модели Харта. Животных опытной (1-й) группы содержали в изолированных клетках при температуре 5°C, контрольной (2-й) — при 26°C. В помещениях поддерживался искусственный световой режим: 12 ч — день, 12 ч — ночь. Пищу давали 2 раза в сутки — утром и вечером. Доступ к воде не ограничивался.

Животных 1-й группы декапитировали на 1, 5, 10, 15, 21, 28, 42 и 49-е сутки экспозиции. Животных 2-й группы брали в эксперимент в те же сроки по 1—2 крысы, которые затем были объединены в общий контроль.

После декапитации у животных для исследования брали печень и мышцы бедра. Ткани измельчали ножницами на холоду и гомогенизировали в стеклянном гомогенизаторе в 0,002 М растворе трис-НСI-буфера. Гомогенат центрифугировали 20 мин при 12 000 g и 4°C. В надосадочной фракции определяли скорость гликолиза и гликогенолиза в реконструированной системе, включающей все необходимые кофакторы и активаторы в оптимальных концентрациях [13], и содержание белка по Лоури. Для оценки ключевых звеньев процессов гликолиза и гликогенолиза использовали в качестве субстратов глюкозу, гликоген, глюкозо-6-фосфат (Г-6-Ф) и фруктозо-1,6-дифосфат (ФДФ). Ранее нами было показано, что при использовании глюкозы лимитирующим ферментом гликолиза является гексокиназа, гликогена — фосфорилаза, Г-6-Ф — фосфофруктокиназа (ФФК), ФДФ — фермент, идущий в гликолитической цепи ниже ФФК, вероятно, пируваткиназа [8, 14]. Количество образовавшегося лактата определяли энзиматически по НАДН<sub>2</sub> [18]. Содержание глюкозы в крови оценивали глюкозооксидазным методом с помощью стандартных наборов, гликогена в печени — по методу [19] после фиксации ткани в жидком азоте. Адреналин (А) и норадреналин (НА) определяли флюорометрически [3] в суточной моче. Последнюю собирали индивидуально от каждой крысы и хранили при -20°C. Концентрацию инсулина, Т<sub>3</sub> и тироксина (Т<sub>4</sub>) в сыворотке крови определяли с помощью радиоиммунологических наборов отечественного производства. Достоверность полученных результатов оценивали с применением *t*-критерия Стьюдента.

**Результаты и обсуждение.** Особый интерес представляют фазовые изменения продукции катехоламинов. Это связано с рядом причин. Во-первых, катехоламины повышают скорость гликогенолиза в мышцах, что обусловлено увеличением образования цАМФ [8]. Во-вторых, они способствуют усилению жиромобилизующего эффекта и повышению содержания СЖК в крови [2]. В-третьих, увеличивают потребление кислорода (не у всех видов) и теплопродукцию в тканях [7].

Нами показано, что образование А у крыс увеличивалось в первые 10 сут адаптации к холоду (рис. 1, а). На 15-е и особенно на 21-е сутки оно значительно снижалось, но оставалось до конца эксперимента на 50—60% выше исходного уровня. Образование НА также резко возрастало в первые 10 сут (рис. 1, б). На 15-е сутки оно снижалось до нормы и практически не изменялось в дальнейшем.

Целесообразность увеличения продукции тиреоидных гормонов при адаптации к холоду не вызывает сомнений. Хорошо известно, что гормоны щитовидной железы увеличивают скорость

Таблица 1

Содержание глюкозы в крови и гликогена в печени у крыс в динамике холодовой адаптации

Продолжительность адаптации, сутки	Глюкоза, ммоль/л	Гликоген, мг на 1 г ткани
Контроль	$8,6 \pm 0,51$ (10)	$57,8 \pm 3,99$ (10)
1	$10,5 \pm 1,48$ (3)	$49,8 \pm 13,6$ (3)
5	$7,4 \pm 0,75$ (3)	$62,7 \pm 5,17$ (2)
10	$10,1 \pm 0,48$ (4)	$30,2 \pm 4,24^*$ (4)
15	$9,8 \pm 0,85$ (4)	$58,6 \pm 1,80$ (2)
21	$13,2 \pm 0,56^*$ (3)	$58,5 \pm 7,18$ (4)
28	$12,8 \pm 0,62^*$ (4)	$67,5 \pm 6,15$ (4)
42	$9,8 \pm 1,42$ (4)	$34,6 \pm 3,03^*$ (4)
49	$9,8 \pm 0,61$ (4)	$48,8 \pm 3,36$ (4)

Примечание. Звездочка —  $p < 0,01$  по сравнению с контролем; здесь и в табл. 2 в скобках указано число наблюдений.

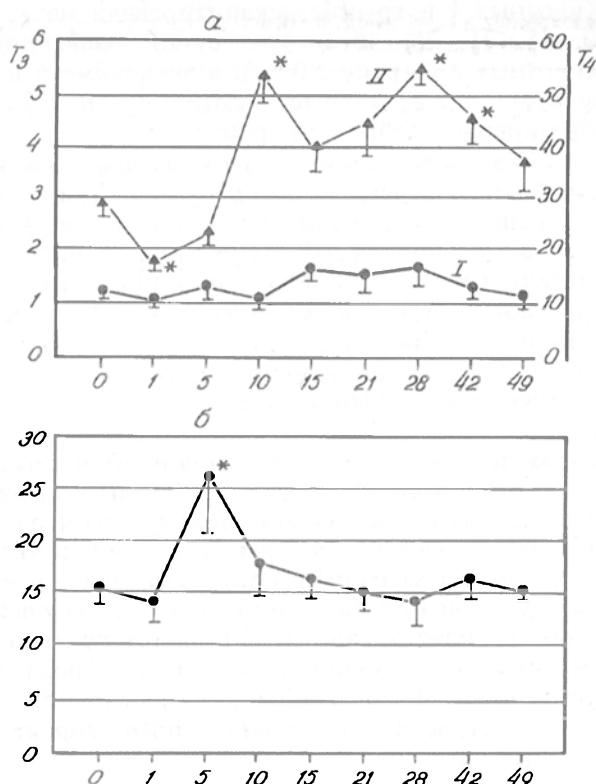


Рис. 2. Содержание гормонов в сыворотке крови крыс при адаптации к холоду.

*a* — содержание  $T_3$  (I) и  $T_4$  (II). По осям ординат — содержание  $T_3$  и  $T_4$ , нмоль/л. Звездочка —  $p < 0,05$  по сравнению с контролем. *б* — содержание инсулина, мкЕД/мл (ось ординат).

потребления кислорода тканями и термогенез в них. Оказалось, что содержание  $T_4$  в 1-е сутки холодовой адаптации снижалось, на 5-е сутки достоверно не отличалось от контроля, а на 10-е сутки значительно возрастало (рис. 2, *a*). В дальнейшем, вплоть до 49-х суток, оно продолжало оставаться повышенным с некоторыми вариациями в сторону снижения или увеличения. Уровень  $T_3$  в сыворотке крови во все сроки холодовой адаптации практически не изменялся (рис. 2, *a*). Содержание инсулина достоверно увеличивалось только на 5-е сутки исследования (рис. 2, *б*). Во все остальные сроки оно существенно не отличалось от контроля.

Таким образом, на основе эндокринологических исследований можно выделить 3 фазы адаптации к холоду в модели Харта: 1) фаза острой адаптации — первые 10 сут, которая характеризуется прогрессирующим увеличением продукции катехоламинов, тироксина и инсулина; 2) фаза неустойчивой адаптации — 11–21-е сутки, которая характеризуется снижением продукции всех гормонов; 3) фаза устойчивой адаптации, которая характеризуется переходом организма на новый уровень регуляции. Она включает 4–7 нед эксперимента. В этот период стабильно высоким остается содержание А в моче и  $T_4$  в крови. Остальные гормоны находятся в пределах нормы.\*

Выраженная реакция симпатико-адреналовой системы в первую фазу адаптации к холоду обусловлена необходимостью не только мобилизации энергетических ресурсов организма (глюкозы и СЖК), но и повышения сосудистого тонуса, что обеспечивает перераспределение крови к поверхности тела и увеличению теплопотерь [6]. Однако долго поддерживать такое состояние организму невыгодно. В третью фазу продукция А остается повышенной, а НА снижается до нормы. Повышенным остается и содержание  $T_4$  в крови. Это способствует снижению теплопотерь и усилению теплопродукции в тканях. Последнее связано с активным окислением СЖК и развитием разобщающего эффекта в митохондриях [12]. Вторая фаза адаптации рассматривается нами как переходное состояние организма между первой и третьей фазой.

Определяемые в работе гормоны оказывали выраженное влияние на такие показатели углеводного гомеостаза, как содержание глюкозы в крови и уровень гликогена в печени (табл. 1). Полученные нами результаты говорят о том, что небольшое снижение концентрации глюкозы в крови отмечалось на 5-е сутки, когда было повышенным содержание инсулина. Развитие умеренной гипергликемии отмечалось на 21–28-е сутки, вероятно, в тот период, когда происходит переклассификация углеводного типа энергетического обмена на липидный. Содержание гликогена в печени достоверно снижалось дважды: на 10-е и 42-е сутки, что, вероятно, связано со смещением соотношения процессов синтеза гликогена и гликогенолиза в сторону последнего.

Состояние углеводного обмена в организме наиболее точно отражает изменение гликолиза и гликогенолиза в тканях. Показано, что ферментом, лимитирующим скорость гликолиза как в печени, так и в мышцах, является гексокиназа, а гликогенолиза — фосфорилаза. Это согласуется с полученными нами ранее данными [8, 14]. При адаптации к холоду скорость гликогенолиза в печени значительно снижалась на протяжении всего срока адаптации начиная с первых суток (табл. 2). Изменения отсутствовали только на 42-е

Скорость процессов гликолиза и гликогенолиза в печени и скелетной мышце белых крыс в динамике холодовой адаптации (в нмоль лактата на 1 мг белка в 1 мин)

Продолжительность адаптации, сутки	Субстрат гликолиза			
	гликоген	глюкоза	Г-6-Ф	ФДФ
Печень				
Контроль	18,5 ± 2,4	6,9 ± 0,7	36,6 ± 2,8	85,2 ± 2,7
1 (5)	9,9 ± 1,9*	5,0 ± 1,1	28,0 ± 3,5	73,4 ± 7,4
5 (4)	12,2 ± 1,2*	6,0 ± 0,9	27,4 ± 7,8	98,7 ± 2,9**
10 (5)	12,2 ± 1,4*	7,4 ± 0,8	31,7 ± 2,6	88,0 ± 7,0
15 (4)	8,8 ± 1,3**	6,6 ± 0,9	23,4 ± 3,1**	83,3 ± 1,2
21 (4)	11,6 ± 2,4	5,2 ± 0,8	28,7 ± 2,0*	75,7 ± 2,8*
28 (5)	8,1 ± 2,1**	2,6 ± 0,6***	14,9 ± 3,0***	76,4 ± 9,4
42 (6)	18,7 ± 3,6	6,9 ± 1,6	36,7 ± 6,6	66,2 ± 12,8
49 (6)	8,9 ± 0,7**	5,5 ± 1,1	35,1 ± 5,1	36,5 ± 2,1***
Скелетная мышца				
Контроль (14)	224,0 ± 10,6	31,6 ± 3,3	345,8 ± 23,3	554,9 ± 36,6
1 (5)	284,1 ± 26,2*	17,4 ± 3,0**	388,9 ± 8,8	628,4 ± 14,7
5 (4)	232,3 ± 12,4	34,1 ± 1,5	446,9 ± 8,7***	631,6 ± 21,3
10 (5)	253,1 ± 19,6	39,6 ± 4,7	383,3 ± 14,8	646,5 ± 12,1*
15 (4)	220,7 ± 8,5	33,3 ± 4,8	383,6 ± 17,7	580,7 ± 47,7
21 (4)	188,0 ± 17,0	34,6 ± 4,1	348,2 ± 8,6	481,2 ± 6,5
28 (5)	191,1 ± 27,7	8,9 ± 2,0***	258,6 ± 33,5*	630,7 ± 17,3
42 (6)	255,5 ± 22,0	35,6 ± 2,6	268,2 ± 25,5*	385,8 ± 35,4**
49 (6)	51,9 ± 4,3***	15,2 ± 6,4*	384,0 ± 13,8	311,6 ± 49,4***

Примечание. Одна звездочка —  $p < 0,05$ ; две —  $p < 0,01$ ; три —  $p < 0,001$  по сравнению с контролем.

сутки. В мышцах картина была иной. На 1-е сутки отмечалось увеличение гликогенолиза, затем, вплоть до 42-х суток, изменений не было, а на 49-е сутки отмечалось его резкое снижение.

Гликолиз в печени достоверно ингибировался только на 28-е сутки, а в мышцах — на 1, 28 и 49-е сутки. Скорость анаэробного окисления углеводов в мышцах почти на порядок больше, чем в печени, однако вклад его в энергетику организма при адаптации к холоду не увеличивался. Более того, в определенные сроки адаптации отмечалось значительное ингибирование данного процесса в обоих органах. Это в большей степени проявлялось на 49-е сутки, когда адаптация к холоду считается завершённой.

Интересные изменения выявлены и в других звеньях гликолиза. Так, скорость гликолиза на Г-6-Ф в печени ингибировалась на 15, 21 и 28-е сутки. На ФДФ скорость гликолиза монотонно снижалась начиная с 21-х суток, так что на 49-е сутки она на обоих субстратах была одинаковой. В мышцах обнаружена фаза активации гликолиза на Г-6-Ф и ФДФ в период с 5-х по 10-е сутки. Однако в дальнейшем здесь выявлена та же направленность изменений, что и в печени, т. е. снижение скорости гликолиза на ФДФ до величин, равных скорости гликолиза на Г-6-Ф.

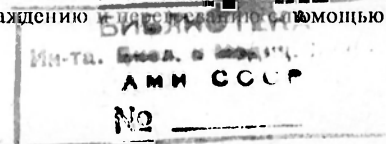
Полученные результаты говорят о том, что в гликолизе и гликогенолизе при адаптации к холоду проявляют себя как гормональные, так и аллостерические механизмы регуляции. Так, усиление гликогенолиза в мышцах в 1-е сутки (эта тенденция сохранялась вплоть до 10-х суток)

объясняется повышением продукции катехоламинов. Однако начиная с 15-х суток этот эффект в мышцах не проявлялся, а на 49-е сутки отмечалось резкое ингибирование гликолиза. Вероятно, в гормональные механизмы регуляции вмешиваются аллостерические, которые модулируют эффект первых. В печени ингибирование было выражено в большей степени и проявлялось уже с 1-х суток. Ранее на переживающих срезах печени крыс показано ингибирование гликолиза и гликогенолиза под влиянием А и гидрокортизона [8]. Не обнаружено нами активации гликолиза в мышцах и печени и под влиянием повышенного содержания инсулина на 5-е сутки адаптации к холоду. Влияние аллостерических механизмов регуляции наиболее проявляется на 49-е сутки, когда скорость анаэробного окисления углеводов снижается не только в печени, но и в мышцах, а скорость окисления ФДФ становится равной скорости окисления Г-6-Ф. Аналогичные результаты были получены нами у людей при адаптации их к экстремальным факторам высоких широт [8].

Таким образом, активация симпатико-адреналовой системы при холодовой адаптации направлена на усиление жирового обмена (жиромобилизирующий эффект А) и усиление калоригенного эффекта под влиянием как НА и А, так и Т<sub>4</sub>, а не на активацию углеводного обмена.

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Исрафилова З. Т. О повышении термоустойчивости животных к охлаждению с помощью гормо-



- нальных и фармакологических препаратов: Автореф. дис. ... канд. биол. наук. — Ашхабад, 1986.
2. Карльсон Л., Леви Л., Уре Л. // Эмоциональный стресс. — Л., 1970. — С. 152—160.
  3. Меньшиков В. В. // Методы клинической биохимии гормонов и медиаторов. — М., 1974. — Ч. 2. — С. 24—29.
  4. Мишукова Е. А. // Вопр. мед. химии. — 1966. — № 6. — С. 302—309.
  5. Мишукова Е. А. // Всесоюзный биохимический съезд, 2-й. — Ташкент, 1969. — С. 24.
  6. Мошкин М. И. // Проблемы терморегуляции и температурной адаптации / Под ред. Н. К. Поповой. — Новосибирск, 1992. — С. 141—157.
  7. Мошкин М. И., Жигулина Е. И. // Система терморегуляции при адаптации организма к факторам среды. — Новосибирск, 1990. — С. 102—103.
  8. Панин Л. Е. Энергетические аспекты адаптации. — Л., 1978.
  9. Панин Л. Е. // Механизмы адаптации человека в условиях высоких широт. — Л., 1980. — С. 87—97.
  10. Пастухов Ю. Ф. // Проблемы терморегуляции и температурной адаптации. — Новосибирск, 1992. — С. 158—172.
  11. Скулачев В. П. Соотношение окисления и фосфорилирования в дыхательной цепи. — М., 1962.
  12. Скулачев В. П., Маслов С. П. // Биохимия. — 1960. — Т. 25. — С. 1058—1065.
  13. Третьякова Т. А., Панин Л. Е. // Новое в методах научных исследований, диагностики и лечения. — Новосибирск, 1978. — С. 7—8.
  14. Третьякова Т. А. // Механизмы адаптации гомеостатических систем при действии на организм субэкстремальных и экстремальных факторов. — Новосибирск, 1980. — С. 7—18.

15. Хаскин В. В. Энергетика теплообразования и адаптация к холоду. — Новосибирск, 1975.
16. Hannon J. P. // Fed. Proc. — 1960. — Vol. 19, N 4. — Pt 2. — P. 44—139.
17. Hannon J. P. // Ibid. — 1963. — Vol. 22. — P. 856.
18. Hohorst H.-J. // Methoden des enzymatischen Analyse / Hrsg. H. U. Bergmeyer. — Berlin, 1970. — Bd 27. — S. 1425—1429.
19. Lima F. B., Hell N. S., Timo C. et al. // Physiol. and Behav. — 1987. — Vol. 27. — P. 115—123.

Поступила 25.06.94

# TISSUE GLYCOLYTIC AND GLYCOGENOLYTIC CHANGES AND CONTENT OF SOME BLOOD AND URINE HORMONES IN RATS IN DIFFERENT PERIODS OF COLD ADAPTATION

L. Ye. Panin, T. Yu. Starova, T. A. Tretyakova, A. R. Kolpakov, I. Ye. Kolosova, V. N. Solovyev

Institute of Biochemistry, Siberian Branch of the Russian Academy of Medical Sciences

The production phase changes of adaptive hormones and the activity of key glycolytic and glycogenolytic enzymes were studied in Wistar rats exposed to a long-term (1-49 day) cold (+5°C) exposure. The allosteric mechanisms responsible for regulating carbohydrate metabolism were shown to interact with endocrine ones and to modulate their effects. In cold acclimation, activation of the sympathoadrenal system aimed not only at increasing carbohydrate metabolism, but at enhancing the metabolism of fats and calorogenic effects.

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 1995

УДК 612.124:547.96].014.46.08

В. В. ИВАНОВ, К. ХАШИМОТО, К. ИНОМАТА, Т. КАВАИ, К. МИЗУНУМА,  
Л. Г. КЛИМАЦКАЯ

## БИОЛОГИЧЕСКИЙ МОНИТОРИНГ ВОЗДЕЙСТВИЯ АЛКИЛИРУЮЩИХ КСЕНОБИОТИКОВ ПУТЕМ ИХ ОПРЕДЕЛЕНИЯ В СОЕДИНЕНИЯХ С БЕЛКАМИ ПЛАЗМЫ, ГЕМОГЛОБИНОМ, МЕРКАПТУРОВЫХ КИСЛОТАХ МОЧИ КРЫС И ПРОМЫШЛЕННЫХ РАБОЧИХ.

### 1. АКРИЛОНИТРИЛ

Красноярский медицинский институт, Университет г. Канава и Центр промышленной медицины г. Осака (Япония)

Акрилонитрил, или цианоэтилен (ЦЭ) — широко используемый промышленный мономер, загрязняющий окружающую среду, — является мутагеном, канцерогеном для животных и вероятным канцерогеном для человека [1]. Биомониторинг рабочих, подверженных воздействию ЦЭ, осуществляется путем определения в моче содержания самого мономера или его меркаптуровых кислот [1]. Эти показатели отражают уровень ЦЭ в окружающей среде, но содержание ЦЭ в моче быстро падает уже до начала следующего рабочего дня [11]. В противоположность этому ксенобиотики, ковалентно-связанные с белками, так называемые аддукты, отражают уровень ксенобиотиков в окружающей среде более продолжительно, так как период полужизни человеческого альбумина равен 30 дням, а гемоглобин (Hb) связан с таковым для эритроцитов и равен 126, 45—65 и 25—45 дням для человека, крыс и мышей соответственно [4]. <sup>14</sup>C-ЦЭ образует *in vivo* стабильную связь с Hb [10], а также с ДНК [13].

Однако зависимость доза—эффект и период полужизни аддуктов ЦЭ с белками, так же как их природа, не изучены. Вместе с тем показано, что аддукты Hb служат непрямым показателем образования подобных аддуктов с ДНК рядом канцерогенов [6]. Поэтому исследование связывания ЦЭ с белками грызунов и человека может быть полезным с точки зрения оценки его канцерогенной опасности для человека. Не вызывает сомнения необходимость параллельных исследований людей и экспериментальных животных при сходных условиях воздействия ЦЭ с использованием одинаковых методов определения аддукта.

До настоящего времени количественное определение аддуктов алкилирующих ксенобиотиков проводится с помощью техники газовой хроматографии — масс-спектрометрии (ГХ—МС). Этот метод включает в основном гидролиз белков сильными минеральными кислотами или щелочами с получением смеси аминокислот, в

том числе ковалентно связавших ксенобиотик с их последующими изоляцией, дериватизацией и измерением. Техническая и аналитическая сложность метода создаст значительное препятствие его внедрению в практику токсикологии и промышленной, экологической медицины. В настоящей работе предпринята попытка развить новый простой и чувствительный метод определения ЦЭ в аддуктах белков плазмы, Hb и меркаптуровых кислотах мочи, используя капиллярную ГХ.

**Методика. Химические реагенты.** ЦЭ 99,98% чистоты получен от "Mitsui Toatsu Chem. Co" (Токио, Япония). Все другие реагенты были марки "чистый для лабораторного анализа".

**А. Синтез S-(2-цианоэтил)-L-цистеина (ЦЭЦ)** был проведен по модифицированной нами методике с использованием эквимольных количеств ЦЭ и цистеина [9]. Синтез N-ацетил-S-(2-цианоэтил)-L-цистеина (N-ацетил ЦЭЦ) был проведен, как описано ранее [16].

**Б. В острых опытах** использовали самцов линии Вистар массой 470—530 г, в подострых — массой 250—300 г, полученных от SLS Co ("Shizuoka", Япония). Животные имели свободный доступ к пище и воде. Водный раствор ЦЭ в объеме 1 мл на 1 кг массы тела вводили внутрибрюшинно в остром эксперименте в дозах 1—50 мг/кг, в подостром опыте 1—10 мг/кг один раз в день в течение 6 дней. Тиосульфат натрия (500 мг/кг внутрибрюшинно) вводили за 10 мин до ЦЭ в дозах 25 и 50 мг/кг. Контрольные животные получали внутрибрюшинно 0,9% раствор NaCl (1 мл/кг).

**В. Отбор проб крови и мочи.** Под нембуталовым наркозом 2—8 мл крови брали в гепаринизированный шприц путем пункции сердца через 24 ч от введения ЦЭ в остром опыте и через 1, 2 и 4 нед после последней инъекции ЦЭ в подостром эксперименте. Образцы венозной человеческой крови (10 мл) были получены во время периодического медосмотра от 12 операторов и аппаратчиков (6 мужчин и 6 женщин в возрасте 20—45 лет), имеющих производственный контакт с ЦЭ в течение 1—10 лет на заводе синтетического каучука (Красноярск). Средняя концентрация ЦЭ в воздухе рабочей зоны была 13—20 мг/м<sup>3</sup>. Контролем были образцы крови, взятые у 30 человек, не подверженных воздействию ЦЭ, без разделения на курящих и некурящих прошедших обычное медицинское обследование.

Пробы мочи крыс собирали в течение 1 или 2 дней от последней инъекции ЦЭ в подостром опыте и анализировали после концентрации на роторном вакуумном испарителе при 80°C.

**Г. Выделение глобина.** Свежую кровь крыс и людей центрифугировали при 900 g 5 мин. После удаления плазмы эритроциты трижды отмывали взвешиванием в 0,9% NaCl (3 мл на 1 мл эритроцитов) и затем лизировали добавлением равного объема воды в течение 30 мин. В пробу вносили 1 M NaCl (1 мл на 10 мл взвеси эритроцитов) и разрушенные мембраны удаляли центрифугированием при 20 000 g 10 мин. Глобин, осаждаемый

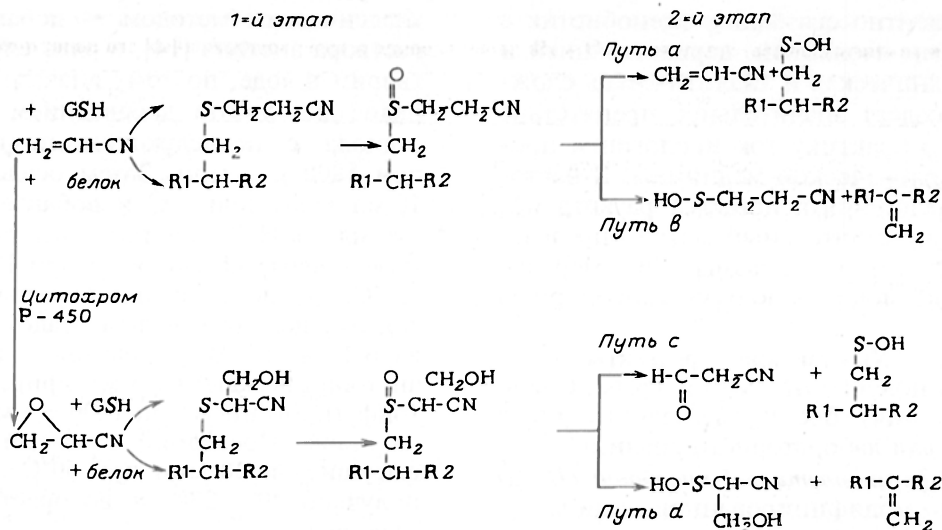
классическим методом — добавлением кислого раствора ацетона [14], в ряде случаев был нерастворим в воде, поэтому вначале осаждали Hb из надосадка лизата добавлением 4 объемов 96% этанола с последующим центрифугированием при 1800 g 5 мин. Затем осадок взвешивали в 10 мл воды при 4°C и добавляли по каплям к 200 мл 1% HCl в ацетоне, охлажденном до -20°C. Взвесь центрифугировали при 1800 g 10 мин при -20°C. После сливания коричневого надосадка, содержащего гем, белый осадок глобина промывали 15 мл 1% HCl в ацетоне (однократно), 15 мл ацетона (дважды) и 15 мл эфира (дважды) с центрифугированием при 1800 g 5 мин после каждого этапа. Последний отмытый эфиром осадок высушивали 30 мин при 50°C на водяной бане, получено 100—500 мг водорастворимого белого порошка.

**Белки плазмы.** Осаждали добавлением 4 объемов 96% этанола к плазме крови и очищали от сорбированных молекул ЦЭ, как и в случае с осадком глобина. Полученные порошки белков хранили при -18°C. Белок определялся по Лоури.

**Д. Определение ЦЭ в аддуктах.** Метод включал 2 основных этапа: а) окисление S-атома в ЦЭЦ, его ацетилированном производном или белках до сульфоксида; б) освобождение ЦЭ из связи с окисленными производными цистеина проводили высокотемпературным нагреванием при 250°C в инжекторе газового хроматографа. Далее ЦЭ прямо переносили в колонку с газовой фазой. Инкубационная смесь общим объемом 0,5 мл включала 0,25 мл водного раствора либо ЦЭЦ, или N-ацетил ЦЭЦ (1—116 мкг), 10 мг глобина, 10 мг белков плазмы, либо 0,25 мл мочи и 0,25 мл 3% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Смесь инкубировали при 30°C в течение 30 мин и энергичном встряхивании. Реакцию останавливали добавлением каталазы (484 ME) и 5 мкл n-октанола для предотвращения интенсивного пенообразования.

**Е. ГХ—МС.** Для количественного определения ЦЭ использовали газовый хроматограф "Shimadzu 14A", оснащенный капиллярной колонкой DB-WAX (30 м × 0,5 мм с толщиной слоя твердой фазы 1 мкм). 2 мкл образца вводили в сплит-инжектор. Температура колонки поддерживалась при 40°C, инжектора и FTD-детектора — при 250°C. Гелий использовали в качестве газ-носителя (0,5 кг/см, скорость потока 2 мл/мин). Площадь хроматографических пиков измеряли с помощью программированного процессора "Chromatopac C-RGA, Shimadzu". Нижний предел определения содержания ЦЭ этим методом равен 0,1 ppm. Количество ЦЭ в аддуктах определяли по калибровочной кривой, построенной путем анализа 10 мг водного раствора глобина контрольных животных или человека с добавлением 0—125 нмоль ЦЭ. Выход ЦЭ при этом составлял 86%.

Для идентификации ЦЭ использовали ГХ совместно с избирательной МС. Ионизацию осуществляли с помощью аппарата "Huellet-Paccard 5890/HP 5770B". Рабочие температуры: 250°C (сплит-инжектор), 250°C (источник ионов). В ка-



Последовательность анализа определения ЦЭ в аддуктах.

1-й этап — окисление атома серы в тиозфире ЦЭ; 2-й — освобождение ЦЭ из связи с окисленным цистеином. (А) — цианоэтиленоксид; R1, R2 — места пептидной связи; GSH — восстановленный глутатион.

чество газа-носителя использовали гелий со скоростью потока 1 мл/мин. Температурный режим капиллярной кремниевой колонки марки PONA (50 м × 0,25 мм, толщина слоя твердой фазы 1 мкм) программировался от 40°C (16 мин) до 200°C (5 мин) со скоростью подъема 30°C в 1 мин. Масс-спектр регистрировали и обрабатывали с помощью системы HP 59970C MS chem-station.

Результаты и обсуждение. Дальнейшая оптимизация метода возможна. Однако полученные данные свидетельствуют, что процедура, описанная в разделе "Методика" (В, Г, Д), уже может быть использована для определения ЦЭ, ковалентно связанного с белками и глутатионом (см. рисунок). Данные табл. 1 указывают на линейную зависимость количества освобожденного ЦЭ от концентрации алкилированных производных ЦЭ и N-ацетил ЦЭ.

Анализ данных капиллярной ГХ и МС подтверждает идентичность пика ЦЭ, освобожденного из состава аддуктов, синтезированному нами, судя по совпадению времени удержания в колонке и ионной спектрограмме.

В пробах Нб от контрольных животных, как и от курящих и некурящих людей, не подверженных действию ЦЭ, он не был выявлен. Пропор-

циональность между введенной дозой ЦЭ и количеством мономера, обнаруженным в его аддуктах с Нб и белками плазмы, отчетливо видна из данных табл. 2. Количество аддуктов ЦЭ в белках плазмы отравленных крыс было в 8,3 раза меньше, чем в Нб, в диапазоне доз ЦЭ от 25 до 50 мг/кг и вовсе не обнаруживалось при более низких дозах. Алкилирующая активность ЦЭ, определяемая по индексу связывания с Нб (НБИ), приведена в табл. 3. Оценочно количество связавшегося ЦЭ составляет 8,7% от введенной дозы в случае Нб и 0,1% для белков плазмы (см. табл. 2). Эти величины получены с учетом того, что на 100 г массы тела крысы приходится 0,945 г Нб и 0,098 г альбумина [17].

Анализ проб, взятых из крови рабочих завода синтетического акрилонитрильного каучука, показывает, что 57% обследованных имеют аддукты ЦЭ с Нб при выраженных индивидуальных различиях (см. табл. 3). Этот показатель не зависел от продолжительности контакта с ЦЭ.

В другом эксперименте была проанализирована моча 3 крыс, получивших повторные инъекции 5 и 10 мг/кг ЦЭ. Данные табл. 4 указывают, что свободный ЦЭ в этих пробах не регистрировался, в то же время ясно видны взаимосвязи доза—эффект и время—эффект для ЦЭ, обнаруживаемого в тиоловых конъюгатах мочи. Пики ЦЭ,

Таблица 1

Освобождение ЦЭ (в мкмоль/л) из его меркаптуровой кислоты и S-(2-цианоэтил)-1-цистеина

Цианоэтилированное производное	Концентрация CN-производного, мкмоль/л		
	8,86	88,6	886
N-ацетил-S-(2-цианоэтил)-1-цистеин	8,6 ± 0,5	80 ± 8,1	731 ± 90
Выход ЦЭ, %	97	90	92
ЦЭЦ	8,3 ± 1,5	77 ± 6,2	800 ± 24
Выход ЦЭ, %	93	86	90

Примечание. Приведены средние величины по данным из 3 опытов.

Таблица 2

Содержание ЦЭ, определяемое в Нб и белках плазмы крыс через сутки после его однократного внутрибрюшинного введения

Доза ЦЭ, мг на 1 кг массы тела	Вид белка крови	Содержание ЦЭ, мкмоль на 1 г белка
1	Нб	0,14 ± 0,03
5	Нб	0,77 ± 0,07
25	Нб	4,35 ± 2,47
	Белки плазмы	0,56 ± 0,23
50	Нб	9,73 ± 0,70
	Белки плазмы	1,15 ± 0,10

Примечание. В серии 3-6 животных.

Сравнительный анализ содержания аддуктов ЦЭ в Hb крови рабочих и крыс подверженных его подострому воздействию

Объект исследования	Уровень или доза воздействия	Длительность воздействия	ЦЭ (в ммоль)/Hb (в моль)	HbI* (гемоглобин-связывающий индекс)
Рабочие производства синтетического каучука	6-9 ppm (эквивалентно ежедневному воздействию 1,3 мг/кг ЦЭ**	1-5 лет 5-10 лет	4,5-33,5 3,9-17,4	627 443
Крысы	1 мг/кг внутрибрюшинно ежедневно	1 нед	5,2-15,6	500

$$* \text{HbI} = \frac{\text{ммоль ксенобиотика/г Hb}}{\text{ммоль ксенобиотика/кг массы тела}}$$

\*\* Расчетная величина.

зарегистрированные в описанных выше пробах Hb и мочи от отравленных им животных и рабочих производства каучука, идентичны времени удержания и масс-спектру стандарта ЦЭ.

ЦЭ образует при попадании в организм стабильные ковалентные связи с глутатионом, белками (см. рисунок). Мы предположили, что окисление в их составе цианоэтилированного цистеина может привести к образованию его сульфокиси. Исходная молекула ЦЭ должна в этом случае отделяться при высокотемпературном воздействии, например в инжекторной камере газового хроматографа. Хотя химически эта реакция принципиально возможна, она не была исследована ранее.

Образование необратимой связи с белками меченого  $^{14}\text{C}$ -ЦЭ описано *in vitro* [10], но химическая природа радиоактивного продукта, связанного с макромолекулами, оставалась неизвестной. Разработанная методика позволяет определить, могут ли белки быть модифицированы ЦЭ. Дело в том, что показано окисление ЦЭ до высокоактивной эпокиси цитохромом P-450 микросом [2], обнаружено ее присутствие в крови крыс в первые 4 ч после внутрижелудочного введения ЦЭ [15]. С химической точки зрения (см. рисунок) очевидно, что только ЦЭ, но не его эпокись может быть освобожден предложенным методом из цианоэтилированных соединений цистеина.

Разработанный метод действительно позволяет определить ЦЭ в модельных алкилированных аминокислотах с выходом 91%. Вероятно, часть ЦЭ теряется в побочной реакции (см. рисунок, путь б) и из-за хорошо известного эпоксидирования ЦЭ [13].

Полученные данные позволяют сделать вывод о том, что ЦЭ может алкилировать SH-содержащие пептиды и белки в кровяном русле и органах *in vivo* также и без метаболической активации.

Таблица 4

Содержание свободного ЦЭ и в составе его меркаптуровых кислот в моче крыс через 24-48 ч после его однократного внутрибрюшинного введения

Доза ЦЭ, мг/кг	Содержание ЦЭ в моче, мкМ	
	свободного	в составе меркаптуровых кислот
0	0	0
5	0	52 ± 10
10	0	93 ± 20

Примечание. В серии 2 животных.

ции. Ковалентное связывание ЦЭ и его эпокиси с клеточными антиоксидантными SH-группами имеет значение для его острой токсичности, возможно, в результате последующей стимуляции перекисного окисления липидов [7, 12] в тканях-мишенях.

Отсутствие аддуктов ЦЭ в норме делает предлагаемый метод специфичным для мониторинга воздействия ЦЭ и ненужной дифференциацию между курящими и некурящими, как в случае мониторинга по уровню тиоцианата в крови и моче [1]. Возможность обнаружения ЦЭ в аддуктах Hb проб человеческой крови показала пригодность метода для применения в клинических исследованиях. Отсутствие различий в уровне аддуктов ЦЭ-Hb среди рабочих со стажем производственного контакта с ЦЭ 1—5 и 6—10 лет согласуется с тем, что при хроническом воздействии, превышающем продолжительность жизни эритроцита (4 мес), степень алкилирования Hb должна достичь устойчивого уровня через 2 мес. Важно отметить, что экспозиционная доза, выбранная нами для подострых экспериментов с животными, была близка таковой на рабочем месте (см. табл. 3). В целом, по данным литературы, используемые в эксперименте концентрации ксенобиотиков значительно выше [6].

Предлагаемый рядом авторов биомониторинг воздействия как акриламида [3], так и ЦЭ [8] с помощью определения S-(2-карбоксиэтил)цистеина ставит преграду для использования этого показателя в случае их комбинированного воздействия, так как известно, что гидролиз белков S-алкилированных ЦЭ, акриламидом, метилакрилатом во всех случаях даст S-(2-карбоксиэтил)цистин [5]. Преимущество предлагаемого метода в том, что он позволяет не только различать ЦЭ и его эпокись (см. рисунок) в аддуктах, но и исключить потерю анализируемого компонента на стадии дериватизации, так как ЦЭ освобождается непосредственно в инжекторе газового хроматографа. Кроме того, нет необходимости в процедуре выделения алкилированного продукта из гидролизата белка, что экономит время анализа (30 мин вместо многих часов) и значительно удешевляет его. Следует подчеркнуть, что использование подхода молекулярной дозиметрии (см. табл. 3) уже сейчас делает возможным выделение тех индивидуумов, которые при данном уровне содержания ЦЭ в окружающей среде имеют большую тканевую (внутрен-

нюю) дозу ЦЭ и в этом смысле подвержены большому риску.

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Акрилонитрил. (Гигиенические критерии состояния окружающей среды. № 28). — М., 1984.
2. Иванов В. В., Жирнов Г. Ф., Арчаков А. И. // Вопр. мед. химии. — 1982. — № 2. — С. 95—98.
3. Bailey E., Farmer P., Bird I. et al. // *Analyt. Biochem.* — 1986. — Vol. 157. — P. 241—248.
4. Biological Reference Data Book on Experimental Animals / Ed. Y. Tajima. — Tokyo, 1989. — P. 396.
5. Cavins D., Friedman M. // *J. biol. Chem.* — 1968. — Vol. 243. — P. 3357—3360.
6. ECE/OC. DNA and Protein Adducts: Evaluation of their Use in Exposure Monitoring and Risk Assessment. — Brussels, 1989. — Vol. 13. — P. 32—72.
7. Farooqui M., Mumtaz M., Ghanayem B. et al. // *J. Biochem. Toxicol.* — 1990. — Vol. 5. — P. 221—227.
8. Fennell T., Mac Neela J., Turner M. et al. // *Toxicologist.* — 1989. — Vol. 9. — P. 509.
9. Friedman M., Cavins J., Wall J. // *J. Amer. Chem. Soc.* — 1985. — Vol. 87. — P. 3672—3681.
10. Hashimoto K., Kanai R. // *Biochem. Pharmacol.* — 1972. — Vol. 21. — P. 635—640.
11. Houthuijs D., Remijn D., Willems H. et al. // *Amer. J. Industr. Med.* — 1983. — Vol. 3. — P. 313—320.
12. Ivanov V., Rahier J., Lauwerys R. // *J. appl. Toxicol.* — 1989. — Vol. 9. — P. 353—358.
13. Peter H., Schwarz M., Mathiasch B. et al. // *Carcinogenesis.* — 1983. — Vol. 4. — P. 235—237.
14. Riggs A. // *Meth. Enzymol.* — 1981. — Vol. 76. — P. 5—29.
15. Roberts A., Kedderis G., Turner M. et al. // *Carcinogenesis.* — 1991. — Vol. 12. — P. 401—404.
16. Vogel A. *Textbook of Practical Organic Chemistry.* — London, 1959.
17. Waynforth II. *Experimental and Surgical Technique in the Rat.* — New York, 1980.

Поступила 25.09.93

#### BIOLOGICAL MONITORING OF EXPOSURE TO ALKYLATING XENOBIOTICS THROUGH THEIR DETECTION IN THE COMPOUNDS HAVING PLASMA PROTEINS, HEMOGLOBIN, AND URINARY MERCAPTURIC ACIDS IN RATS AND IN INDUSTRIAL WORKER. I. ACRYLONITRILE

V. V. Ivanov, K. Hashimoto, K. Inomata, T. Kawai, K. Mizunuma, L. G. Klimatskaya

Medical Institute, Krasnoyarsk, Russia; Kanazawa University and Osaka Occupational Health Center, Japan

A parent molecule of acrylonitrile (cyanoethylene. CE) may be isolated from its the model compound S-(2-cyanoethylene)-l-cysteine, as well as from its N-acetyl derivative and hemoglobin (Hb) and plasma proteins from the intoxicated animals and workers engaged in manufacturing synthetic rubber made from acrylonitrile. The developed procedure consists in the 1.5% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> oxidation of a CE adduct for 30 min, followed by addition of a sample into the gas chromatographic injector at 250°C, resulting in the release of CE from the adducts and in the current ingress of carrier gas into the capillary column in order to separate and determine with a FID detector. There was a dose-response relationship between the formation of CE adducts with rat blood proteins, urinary mercapturic acids when the poison was given in a dose of 1-50 mg/kg. CE covalently bound to Hb was detected in the workers exposed to its monomer in working places.

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 1995

УДК 613.632-07:616.153.962.4

К. ХАШИМОТО, В. В. ИВАНОВ, К. ИНОМАТА, Т. КАВАИ, К. МИЗУНУМА,  
Л. Г. КЛИМАЦКАЯ, Ю. А. ФЕФЕЛОВА

#### БИОЛОГИЧЕСКИЙ МОНИТОРИНГ ВОЗДЕЙСТВИЯ АЛКИЛИРУЮЩИХ КСЕНОБИОТИКОВ ПУТЕМ ИХ ОПРЕДЕЛЕНИЯ С ПОМОЩЬЮ НОВОГО АНАЛИТИЧЕСКОГО ПОДХОДА В СОЕДИНЕНИЯХ С ГЕМОГЛОБИНОМ, БЕЛКАМИ ПЛАЗМЫ И МЕРКАПТУРОВЫХ КИСЛОТАХ МОЧИ. И АКРИЛАМИД.

Красноярский медицинский институт, Университет г. Канава и Центр промышленной медицины г. Осака (Япония)

Наряду с хорошо известной токсичностью акриламида, или пропионамида (ПА), для периферической нервной системы человека и животных недавно обнаружены его канцерогенные свойства для крыс и мышей [10]. Значительное количество людей потенциально подвержены воздействию ПА в производстве полимеров, строительстве дамб и туннелей, где он используется в качестве стабилизатора почвы, а также в результате выхода испаряющихся молекул ПА из полиакриламида, используемого для очистки питьевой воды. Оценочно около 20 тыс. рабочих и 100—200 тыс. лаборантов подвергаются воздействию ПА только в США [13].

Развитие методов биологического мониторинга ПА рекомендовано Международной программой по химической безопасности [10], так как пока отсутствуют способы определения содержания метаболитов ПА в моче. Радиоактивная мет-

ка вводимого крысам <sup>14</sup>C-ПА обнаружена в связи с гемоглобином (Hb), однако химическая природа этого соединения не установлена [9]. В то же время определение ковалентно связанных ксенобиотиков или их продуктов с нуклеофильными атомами функциональных групп аминокислот Hb — самый современный метод слежения за внутренней дозой ядов, наиболее точно отражающий уровень их внешнего воздействия [4, 8, 12, 14].

Для ПА и его генотоксичного микросомального метаболита [15] — глицидамида образование аддуктов с Hb было показано путем обнаружения S-(2-карбоксиэтил)-l-цистеина [2] и S-(2-карбокси-2-гидроксиэтил)-l-цистеина [6] соответственно. Доказано, что оба этих производных — результат ковалентного связывания ПА с одной из SH-групп в белках. Авторы применяли гидролиз белков крепкой кислотой для выделе-

ния цистеиновых конъюгатов ПА и глицидамида с последующей изоляцией, дериватизацией и количественным измерением. Техническая и аналитическая сложность метода затрудняет его использование в практике токсикологии и промышленной медицины. В настоящем исследовании сделана попытка разработать новый, простой и специфичный метод определения ПА в аддуктах с Hb и белками плазмы, меркаптуровых кислотах мочи, используя метод капиллярной газовой хроматографии (ГХ).

**Методика. Реагенты.** ПА 99,9% чистоты получен от "Mitsui Toatsu Chem. Co" (Токио, Япония), каталаза бычьей печени — от "Sigma Chemical Co" (St. Louis, MO, США), L-цистеина монохлорид — от "Wako Pure Chem. Industry Ltd." (Осака, Япония), все другие реагенты были марки "для лабораторного анализа".

**Синтез N-ацетил(S-пропионамида)-l-цистеина (N-Ац-ПАЦ)** проведен по Dixit и соавт. [7]. Продукт получен в виде бесцветной вязкой жидкости со 100% выходом после выпаривания воды под пониженным давлением.

**Эксперименты на животных.** Крысы-самцы линии Вистар массой 350—400 г в остром и 350 г в подостром опытах получены от "SLC CO" (Shizuoka, Япония). Животных содержали при  $20 \pm 2^\circ\text{C}$  с 12-часовым режимом день—ночь и имели свободный доступ к пище и воде. ПА вводили однократно внутрибрюшинно в объеме 1 мл на 1 кг массы в дозе 25 мг/кг при остром отравлении. В подострых опытах ПА вводили внутрибрюшинно 1 раз в день 5 раз в течение 1 нед и с 1-дневным интервалом в течение 2-й и 3-й недель. В дозе 75 мкг/кг ПА вводили через день в течение 2 нед. Контрольным животным вводили внутрибрюшинно равный объем физиологического раствора.

**Отбор проб крови.** Под нсмбуталовым наркозом 5 мл крови брали в гепаринизированный шприц путем пункции сердца спустя 24 ч от инъекции ПА. Мочу крыс собирали в течение 24 ч после 7-й инъекции ПА в дозе 5 и 25 мг/кг в подостром опыте и концентрировали на ротонном вакуумном испарителе при  $87^\circ\text{C}$  с последующим разведением в 2 мл дистиллированной воды.

**Выделение глобина** проводили, как описано ранее [2].

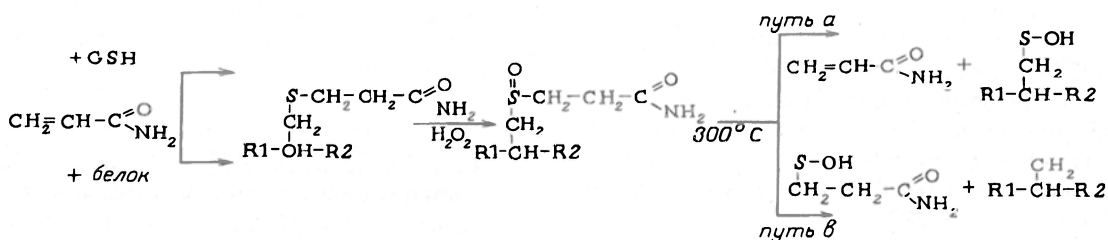
ПА в аддуктах определяли следующим образом:

производным цистеина; его проводили высокотемпературным нагреванием при  $300^\circ\text{C}$  в инжекторе газового хроматографа и далее ПА прямо переносили в колонку потоком газовой фазы. Инкубационная смесь общим объемом 0,5 мл включала 0,25 мл водного раствора 10 мг N-Ац-ПАЦ или глобина, 10 мг белков плазмы и 0,25 мл 3%  $\text{H}_2\text{O}_2$ , смесь инкубировали при  $30^\circ\text{C}$  в течение 30 мин при энергичном встряхивании. Реакцию останавливали добавлением каталазы (484 МЕ) и 5 мкл n-октанола для предотвращения интенсивного пенообразования.

**Реакция ПА с эритроцитами крыс in vitro.** Отмытые эритроциты инкубировали 60 мин с 3 мм ПА при  $37^\circ\text{C}$  в 0,15 М физиологическом растворе — фосфатном буфере, pH 7,2. Инкубацию останавливали добавлением 3 мл воды при  $0^\circ\text{C}$ . После центрифугирования осадок тщательно промывали с выделением глобина.

**ГХ и масс-спектроскопия (ГХ—МС).** Для количественного определения ПА использовали газовый хроматограф "Shimadzu 14A", оснащенный капиллярной колонкой DB-WAX (30 м × 0,5 мм внутреннего диаметра с толщиной слоя твердой фазы 1 мкм) и пламенным термоионным детектором (FTD). 2 мкл пробы вводили в сплит-инжектор. Температура колонки была  $150^\circ\text{C}$ , инжектора и детектора —  $300^\circ\text{C}$ . Гелий использовали в качестве газа-носителя (0,5 кг/см, скорость потока 2 мл/мин). Площадь хроматографических пиков определяли с помощью программированного процессора "Chromatorac C-RGA, Shimadzu". Нижний предел определения ПА этим методом равен 6 мкмоль/л. Для идентификации ПА использовали ГХ—МС. Ионизацию проводили с помощью аппарата "Hewlett-Packard 5890/HP 5770B". Рабочие температуры:  $300^\circ\text{C}$  для инжектора,  $250^\circ\text{C}$  для источника ионов. Газ-носитель гелий со скоростью потока 1 мл/мин. Температурный режим капиллярной кремниевой колонки марки DB-WAX (30 м × 0,5 мм внутреннего диаметра, толщина слоя твердой фазы 1 мкм) при  $150^\circ\text{C}$ . Масс-спектр регистрировали и обрабатывали с помощью системы HP 59970 MS chemstation.

**Результаты и обсуждение.** Общая ионохроматограмма и масс-спектр стандарта ПА и окисленного N-Ац-ПАЦ позволяют идентифицировать ПА, освобождаемый предложенным методом (см. выше) из его меркаптуровой кислоты, судя по одинаковому времени удержания на хроматограмме и величине m/z общей ионограм-



**Примечание.** R1, R2 — места пептидной связи, CSH — восстановленный глутатион. Метод включал 2 основных этапа: а) окисление до сульфоксида S-атома в цистеине алкилированным ПА, б) освобождение ПА из связи с окисленным

мы. Выход ПА из N-Ац-ПАЦ в среднем составлял  $87 \pm 5\%$  в трех исследованных концентрациях Ац-ПАЦ (табл. 1).

Таблица 1

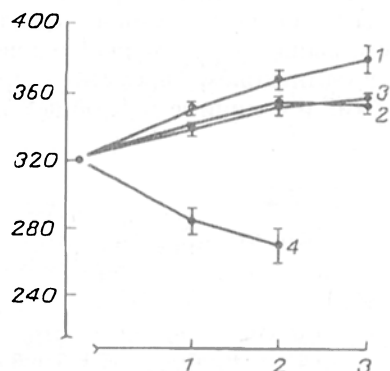
## Освобождение ПА из его меркаптуровой кислоты

Н-ацетил-S-(2-пропионамид)-L-цистеин, мкмоль/л	Освобожденный ПА, мкмоль/л
29,1	23,9 ± 2,8
58,3	54,4 ± 6,5
116	101 ± 2,8

Примечание. Приведены средние величины по данным 3 анализов.

Увеличение дозы введенного крысам внутрибрюшинно ПА от 1 до 75 мг/кг (табл. 2) приводило к линейному увеличению содержания ПА в аддуктах с Нб в соответствии с его кумулятивной дозой. Коэффициент корреляции равен 0,9 ( $p < 0,001$ ). Индекс связывания ПА с Нб (НВ1): отношение ммоль связавшегося ксенобиотика к 1 моль Нб на 1 моль введенного ксенобиотика на 1 кг массы тела равно 163 для однократной дозы ПА 25 мг/кг. В опытах с подострым отравлением ПА обнаруживается прогрессирующее снижение скорости нарастания массы тела животных (см. рисунок). У крыс развивалась атаксия через 5 инъекций (1,5 нед) при дозе 75 мг/кг. Количество ПА, определяемое в белках плазмы, значительно ниже, чем в глобине (см. табл. 2) и не обнаруживается у крыс, получавших 2 наименьшие дозы ПА (данные для 1 мг/кг не показаны). После 7-й последовательной инъекции ПА в двух различных дозах общее содержание ПА, определяемое в моче, изменялось в соответствии с зависимостью доза—эффект. ГХ—МС показала полную идентичность ПА в аддуктах с Нб стандарту мономера.

Таким образом, в работе показана применимость нового разработанного метода для определения в аддуктах Нб, белков плазмы нейротоксического мономера ПА. Принятый до сих пор способ гидролиза белка до составляющих аминокислот с последующей очисткой, дериватизацией и определением аминокислоты, связанной с ксенобиотиком [2, 4, 6, 7, 12], приводит к значительной потере ПА в анализируемом материале.



Влияние подострого внутрибрюшинного введения (5 раз в неделю в 1-ю неделю, 3 раза в неделю в течение 2, 3-й недель) на массу тела взрослых крыс-самцов.

1, 2, 3, 4 — дозы ПА, равные 1, 5, 25 и 75 мг/кг соответственно. По оси абсцисс — длительность введения, нед; по оси ординат — изменения массы тела, г.

Таблица 2

## Взаимосвязь между кумулятивной дозой ПА и содержанием его аддуктов с Нб и белками плазмы крыс при подостром внутрибрюшинном введении взрослым крысам-самцам

Доза, мг/кг	Количество введений	Кумулятивная доза, мг/кг	Содержание аддукта, мкмоль/г	
			Нб	белки плазмы
5	5	25	0,4 ± 0,1	0
5	8	40	0,8 ± 0,2	0
5	11	55	1,4 ± 0,6	0
25	5	125	1,1 ± 0,4	0
25	8	200	1,4 ± 0,2	0,5 ± 0,2
25	11	275	10,7 ± 1,8	1,5 ± 0,1
75	3	225	6,8 ± 1,9	1,6 ± 0,5
75	6	450	12,1 ± 1,9	3,6 ± 0,6

Примечание. В каждой серии 3 животных.

Выше приведена схема реакций нового подхода. Точность и воспроизводимость результатов проверены в ходе построения калибровочной кривой, имеющей линейность при добавлении к раствору глобина ПА в диапазоне от 14,6 до 130,2 мкмоль/л. Выход составил  $73,5 \pm 3\%$ .

Для установления зависимости доза—эффект в образовании аддуктов Нб и белков плазмы крысам в течение 1, 2 и 3 нед внутрибрюшинно вводили ПА. Количество аддуктов ПА нарастало соответственно увеличению дозы яда (см. табл. 2) от 1 до 75 мг/кг. Степень алкилирования прослеживалась в течение 3 нед и отчетливо нарастала соответственно увеличению длительности (см. табл. 2) и, таким образом, кумулятивной дозы (доза × количество введений). Концентрация ПА была порядка 0,4 мкмоль/г глобина для наименьшей дозы ПА 1 мг/кг.

Расчеты показали, что примерно  $6,7 \pm 1,5\%$  дозы ПА 1 мг/кг, вводимой в течение 1—3 нед, связывались с Нб. Эта величина была найдена исходя из того, что на 100 г массы тела приходится 0,945 г Нб [15]. Показано [9, 11], что при той же дозе приблизительно 12% введенного  $^{14}\text{C}$ -ПА связывалось с Нб. Уровень аддуктов ПА с белками плазмы также имел дозозависимый характер, но был в 1,5—4 раза ниже, чем количество ПА на 1 г Нб. ПА обнаруживался в белках при дозах 1 и 5 мг/кг ПА. Сейчас достаточно хорошо известен феномен более низкого сродства ксенобиотиков к альбумину по сравнению с Нб [8]. Константа связывания ПА с Нб, найденная нами в опытах при инкубации яда с эритроцитами, составляла  $0,75 \cdot 10^{-3} \text{ л} \cdot \text{г}^{-1} \cdot \text{ч}^{-1}$  и совпадала с таковой для восстановленного глутатиона [9] —  $0,8 \cdot 10^{-3} \text{ л} \cdot \text{г}^{-1} \cdot \text{ч}^{-1}$ .

Таблица 3

## Общее содержание ПА (свободного и освобождаемого из его меркаптуровых кислот) в суточной моче взрослых крыс-самцов при внутрибрюшинном подостром введении различных доз яда

Кумулятивная доза, мкмоль	Количество выделенного ПА в моче, мкмоль	Процент от дозы
23,9	4,1 ± 0,9	17,1
117	11,2 ± 2,4	9,5

Примечание. В каждой серии 2 животных.

В пробах мочи от крыс, получавших 5 или 25 мг/кг ПА в течение 2 нед (табл. 3), обнаружено дозозависимое увеличение содержания ПА. В этом случае его содержание могло быть совокупностью попадающего в мочу свободного мономера и освобождающегося из его тиоэфиров, типа N-Ац-ПАЦ, и колебалось от 17 до 9,5% от введенных доз 5 и 25 мг/кг ПА соответственно. Идентичность мономера, определяемого в моче отравленных животных и освобождаемого из N-Ац-ПАЦ, стандартному ПА, подтверждается данными ГХ—МС.

В заключение можно сказать, что предложенный метод дает возможность определения ПА в его аддуктах с белками и меркаптуровых кислотах без гидролиза и долгих, сложных аналитических процедурах, таких, как изоляция, дериватизация.

Быстрота, простота и высокая чувствительность метода в пределах наномолей на 1 л делают реально доступными биологический мониторинг воздействия ПА и оценку индивидуальной внутренней дозы, позволяющих более надежно оценить риск для здоровья.

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Котловский Ю. В., Гришанова А. Ю., Иванов В. В. // *Вопр. мед. химии.* — 1984. — № 6. — С. 44—46.
2. Bailey E., Farmer P., Bird I. et al. // *Analyt. Biochem.* — 1986. — Vol. 157. — P. 241—248.
3. Bergmark E., Calleman C., Costa L. // *Toxicol. appl. Pharmacol.* — 1991. — Vol. 111. — P. 352—363.
4. Calleman C., Ehrenberg L., Jansson B. // *J. Environ. Pathol. Toxicol.* — 1978. — Vol. 2. — P. 427—442.
5. Calleman C., Bergmark E., Costa L. // *Chem. Res. Toxicol.* — 1990. — Vol. 111. — P. 352—363.
6. Calleman C., Bergmark E., Stern L. et al. // *International Symposium Biomonitoring and Susceptibility Markers in Human Cancer: Application in Molecular Epidemiology and Risk Assessment: Abstracts.* — Kailua-Kona, 1991. — P. 31.
7. Dixit R., Seth P., Mukhtar H. // *Drug Metab. Dispos.* — 1982. — Vol. 10. — P. 196—197.

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 1995

УДК 615.281:547.863.11.015.44.076.9

Н. В. ГУСЕВА, А. Д. ДУРНЕВ, С. Б. СЕРЕДЕНИН

### СПОСОБНОСТЬ КЛЕТОК КОСТНОГО МОЗГА К ГЕНЕРАЦИИ АКТИВНЫХ ФОРМ КИСЛОРОДА У МЫШЕЙ ЛИНИИ C57BL/6 И BALB/C И МУТАГЕННЫЕ ЭФФЕКТЫ ДИОКСИДИНА

НИИ фармакологии РАМН, Москва

Диоксидин способен индуцировать образование активных форм кислорода (АФК): супероксиданион-радикала, гидроксильного радикала и гидропероксида водорода в суспензиях клеток перитонеального экссудата крыс и костного мозга мышей и хромосомные aberrации в культуре цельной крови человека в одном и том же диапазоне концентраций. Его кластогенный эффект в культуре цельной крови человека возможно предупредить добавлением в среду культивирования антиоксидантного фермента каталазы, а в экспе-

8. ECETOC (European Chemical Industry Ecology and Toxicology Centre): *DNA and Protein Adducts: Evaluation of their Use in Exposure Monitoring and Risk Assessment.* — Brussels, 1989. — Monogr. 13. — P. 32—72.
9. Hashimoto K., Aldridge W. // *Biochem. Pharmacol.* — 1970. — Vol. 19. — P. 2591—2604.
10. IPCS (International Programme on Chemical Safety. Environmental Health Criteria. Acrylamide). — Vol. 49. — Geneva, 1985.
11. Miller M., Carter D., Sipes I. // *Toxicol. appl. Pharmacol.* — 1982. — Vol. 63. — P. 36—44.
12. Neumann H. // *Arch. Toxicol.* — 1984. — Vol. 56. — P. 1—6.
13. Office of Toxic Substances (US Env. Protection Agency. DC) *Preliminary Assessment of Health Risk from Exposure to Acrylamide.* — Washington, 1988.
14. Perera F. // *Environ. Hlth Perspect.* — 1987. — Vol. 66. — P. 141—145.
15. Waynforth H. *Experimental and Surgical Technique in the Rat.* — New York, 1980.

Поступила 25.09.93

#### BIOLOGICAL MONITORING OF EXPOSURE TO ALKYLATING XENOBIOTICS THROUGH THEIR DETERMINATION IN THE COMPOUNDS HAVING HEMOGLOBIN, PLASMA PROTEINS, AND URINARY MERCAPTURIC ACIDS, BY USING A NEW ANALYTICAL APPROACH.

##### II. ACRYLAMIDE

K. Hashimoto, V. V. Ivanov, K. Inomata, T. Kawai, K. Mizunuma, L. G. Klimatskaya, Yu. A. Fefelova

Medical Institute, Krasnoyarsk, Russia; Kanazawa University and Occupational Health Service Center, Osaka, Japan

A new simple and prompt procedure for measuring acrylamide (propenamide, PA) in PA-derived mercapturic acid, such as N-acetyl-S-(2-propenamide)-L-cysteine (N-Ac-PAC), and in hemoglobin (Hb) and plasma protein adducts in the rats exposed to PA was developed, by employing gas chromatography (GC). PA in mercapturic acids or proteins was liberated on high-temperature heating in an injector port during the working procedure of a GC capillary after preoxidation of sulfur atoms in PA-bound cysteine to a sulfoxide form with hydrogen peroxide and analyzed. This method resulted in 87% of PA in authentic N-Ac-PAC. The number of PA released from the protein adducts was proportional to the cumulative dose of PA given at a concentration of 1-75 mg/kg during 1-3 weeks. The alkylating level of Hb was approximately 65 times higher than that of plasma proteins and it was nearly 6.5% of its cumulative dose. The index of binding to Hb and the rate of its alkylation were 163 and  $0.75 \cdot 10^{-3}$  liter/g<sup>-1</sup>/hour<sup>-1</sup>, respectively.

риментах на животных снизить или устранить с помощью химических антиоксидантов [2, 3]. Описанные сведения позволяют предполагать, что мутагенный эффект диоксидина обусловлен его способностью активировать процессы одноэлектронного восстановления кислорода.

Многочисленные экспериментальные данные позволяют рассматривать фагоциты как важный источник мутагенных активных форм кислорода в живом организме [3, 8, 9]. При этом с помощью метода хемилюминесценции (ХЛ) пока-

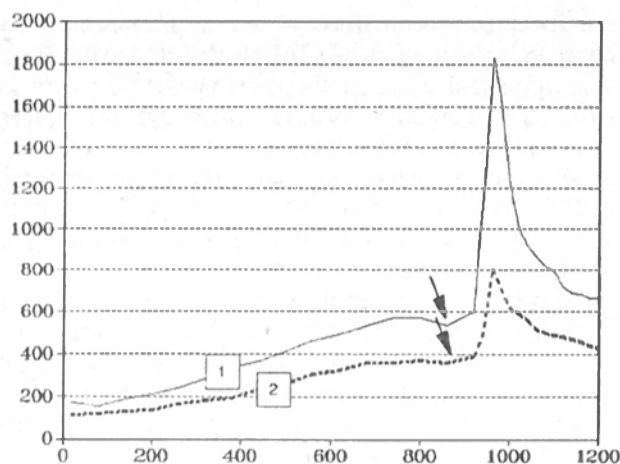


Рис. 1. ХЛ-ответ клеток костного мозга мышей на введение ФМА.

1 — линия BALB/c; 2 — линия C57BL/6.

По оси ординат — интенсивность ХЛ (в мВ); по оси абсцисс — время (в с).  
Стрелками отмечено время добавления активатора.

зано, что нейтрофилы крови человека, крысы и собаки имеют видовую чувствительность к различным прооксидантным стимулам [6]. На этом основании можно предполагать, что мутагенный эффект некоторых ксенобиотиков-прооксидантов, в частности диоксида, может зависеть от генетически детерминированной способности клеток разных тест-объектов к продукции АФК.

Настоящая работа посвящена изучению межлинейных особенностей способности клеток костного мозга мышей C57BL/6 и BALB/c к образованию АФК в ответ на действие стандартных активаторов — зимозана, опсонизированного сывороткой зимозана беспородных самцов мышей (ОЗ), и форболмиристатацетата (ФМА) с параллельной оценкой мутагенных эффектов диоксида у животных тех же линий.

**Методика.** В эксперименте были использованы самцы в возрасте 1—2 мес линий BALB/c и C57BL/6 из питомника РАМН “Столбовая”.

Оценку кластогенного действия диоксида проводили методом учета хромосомных повреждений в метафазных клетках костного мозга [5]. Диоксидин растворяли в подогретом физиологическом растворе ex tempore и вводили внутрибрюшинно однократно и в течение 6 дней в дозе 300 мг/кг.

Цитогенетические препараты готовили через 24 ч после однократного введения и через 6 ч после последней инъекции в подостром эксперименте общепринятым суховоздушным способом с предобработкой колхицином из расчета 2,5 мг/кг за 2 ч до забоя [5].

При цитогенетическом анализе (10 × 100, микроскоп “Standart-20”, Германия) учитывали клетки с ахроматическими пробелами (гепами), одиночными и парными фрагментами, хромосомными обменами. На каждое животное анализировали по 100 метафаз, в каждой группе было исследовано 4—5 животных. Статистический анализ проводили с помощью  $\chi^2$ -критерия при

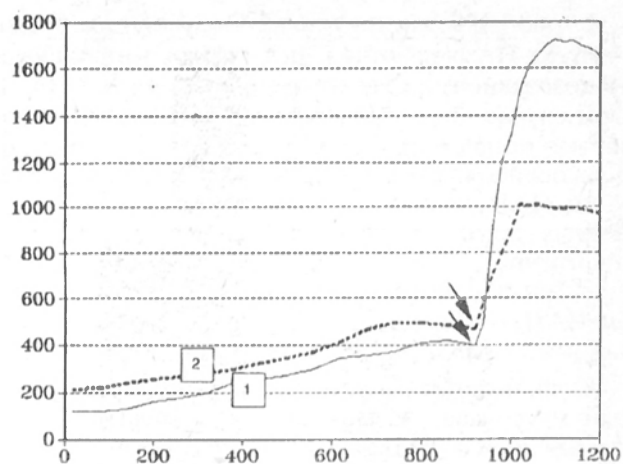


Рис. 2. ХЛ — ответ клеток костного мозга мышей на введение ОЗ.

Обозначения те же, что и на рис. 1.

сопоставлении долей клеток с хромосомными повреждениями, включая клетки с гепами, в разных экспериментальных группах.

Образование АФК регистрировали методом люминолзависимой клеточной ХЛ [1, 4]. В качестве стандартных активаторов ХЛ-ответа использовали ОЗ и ФМА. Стандартный раствор ОЗ (10 мг/мл) вносили в кювету в объеме 40 мкл, ФМА (0,1 мг/мл) в объеме 10 мкл, общий объем кюветы 1 мл. Суспензию клеток костного мозга вымывали средой 199 (37°C) из бедренных костей. Клетки осаждали центрифугированием на центрифуге ОПН-3 при 1000 об/мин в течение 5 мин. Затем трижды отмывали, подсчитывали и разбавляли до концентрации  $5 \cdot 10^6$  млн/мл той же средой.

Измерения проводили в буфере: 110 mM NaCl, 10 mM трис, 5 mM глюкозы, 0,65 mM люминола (pH 7,4) при постоянном перемешивании и температуре 37°C на хемилуцинометре ПХЛ-0,1 (Россия). При обработке результатов ХЛ учитывали следующие параметры:  $I_{сп}$  (максимум спонтанной вспышки ХЛ),  $t_{лат}$  (латентный период — время между моментом введения стимула и началом ХЛ-ответа),  $t_{max}$  (время достижения максимальной интенсивности ХЛ),  $I_{max}$  (максимальная величина ХЛ),  $I_{акт}$  (активированная ХЛ — разница между  $I_{max}$  и  $I_{сп}$ ). Статистическую обработку результатов проводили с помощью критерия  $t$  Стьюдента с использованием статистического пакета “Pharmacologic calculation system” [7], сравнивая учитываемые параметры между линиями.

**Результаты и обсуждение.** Исследование, проведенное на суспензиях клеток костного мозга мышей линии C57BL/6 и BALB/c, показало, что спонтанная люминолзависимая ХЛ не имеет межлинейных особенностей ни по одному из регистрируемых показателей. Максимальная интенсивность ХЛ составляла 400—600 мВ к 14—15-й минуте измерения (рис. 1 и 2).

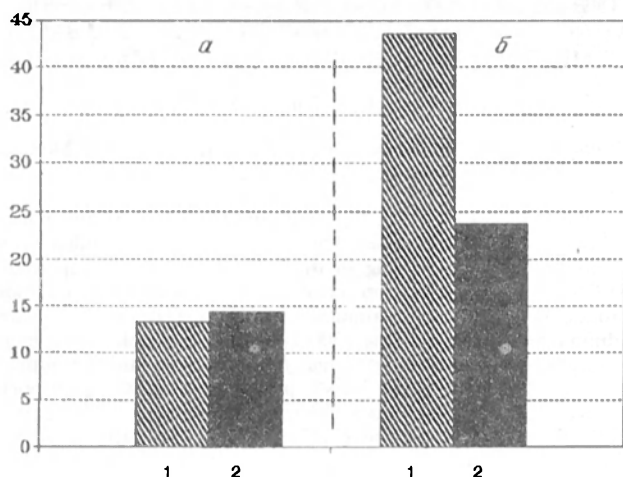


Рис. 3. Уровень хромосомных повреждений в клетках костного мозга мышей после однократного (а) и 5-кратного (б) введения диоксида.

1 — линия BALB/c, 2 — линия C57BL/6.

По оси ординат — количество клеток с хромосомными повреждениями (в %).

Добавление ФМА приводило к резкому увеличению интенсивности ХЛ у мышей обеих линий. Уровень активированной ХЛ суспензии клеток костного мозга мышей линии BALB/c в 5—6 раз выше, чем аналогичный показатель для C57BL/6 ( $p < 0,01$ ). Остальные параметры вспышки ХЛ при активации клеток ФМА не имеют межлинейных различий. Максимум активированной ХЛ достигался на 70–75-й секунде после добавления ФМА, время активации 10–20 с, время ослабления интенсивности ХЛ в 2 раза, после достижения максимума, 70–80 с.

При использовании ОЗ были обнаружены качественно сходные межлинейные особенности ХЛ-ответа. Интенсивность активированной ХЛ в суспензии клеток костного мозга мышей линии BALB/c в 4–5 раз превышала этот показатель при сравнении с ХЛ-ответом клеток C57BL/6 ( $p < 0,01$ ). Максимальный ответ после добавления активатора достигался на 210–260-й секунде и оставался почти на том же уровне до конца измерения. Время активации составило 30–35 с.

Таким образом, выявлены статистически достоверные различия в интенсивности ХЛ-ответа у самцов мышей исследуемых линий, как при прямой стимуляции образования АФК воздействием ФМА на протеинкиназу С, так и при активации ХЛ ОЗ через клеточные рецепторы. Наиболее выражено на стимуляцию в обоих случаях отвечают клетки костного мозга самцов BALB/c.

Данное наблюдение позволяет предполагать, что, в том случае если мутагенный эффект того или иного ксенобиотика опосредован активацией образования АФК, его цитогенетические эффекты у животных исследуемых линий также будут различны. Проверка этого предположения была выполнена при использовании диоксида в дозе 300 мг/кг при однократном и 5-дневном внутрибрюшинном введении.

Исследование интактных самцов линии BALB/c позволило выявить  $1,4 \pm 0,5\%$  повреж-

денных клеток костного мозга, аналогичный показатель для самцов C57BL/6  $2,0 \pm 0,7\%$ . Зарегистрированные данные практически не различаются, что позволяет указать на отсутствие межлинейных различий в выраженности спонтанного мутагенного эффекта у самцов исследованных линий. Обращает внимание, что уровни спонтанной ХЛ у животных исследуемых линий также не различаются.

На рис. 3, а представлены данные, характеризующие цитогенетическое действие диоксида в дозе 300 мг/кг при 24-часовом сроке экспозиции у самцов двух линий в возрасте 1–2 мес. Цитогенетический анализ костного мозга показал, что число клеток с хромосомными повреждениями у самцов BALB/c и C57BL/6 составляет соответственно  $13,4 \pm 1,5$  и  $14,4 \pm 1,6\%$ . Оба результата статистически достоверно превышают соответствующие контрольные значения, но не различаются между собой. Таким образом, не обнаружено межлинейных различий в мутагенном эффекте диоксида при его однократном введении.

На рис. 3, б представлены результаты, полученные после введения диоксида в дозе 300 мг/кг в течение 5 дней. По сравнению с данными, полученными в остром эксперименте, количество поврежденных метафаз в костном мозге обследованных животных статистически значимо возросло: у BALB/c до  $43,6 \pm 2,2\%$ , у C57BL/6 до  $23,8 \pm 1,9\%$ . Указанные данные статистически достоверно различаются между собой ( $p < 0,001$ ), что позволяет констатировать выраженные межлинейные различия в кластогенном действии диоксида в подостром эксперименте. Самцы BALB/c в 2 раза более чувствительны к повреждающему действию диоксида по сравнению с C57BL/6. Качественно сходная закономерность была выявлена при исследовании ХЛ-ответа (см. выше), клетки костного мозга мышей BALB/c более чувствительны к действию стандартных активаторов образования АФК, чем животных C57BL/6. Это даст основания указать на существование качественной взаимосвязи между данными, характеризующими способность клеток костного мозга к продукции АФК, и уровнями цитогенетических повреждений в этих клетках.

Таким образом, в условиях подострого эксперимента было подтверждено предположение о существовании межлинейных различий в кластогенном действии диоксида, сделанное на основе изучения межлинейных особенностей индукции АФК в суспензиях клеток костного мозга. В определенной мере эти результаты подтверждают свободнорадикальный механизм мутагенного действия диоксида, но также определяют необходимость дальнейших исследований, направленных на выяснение причин, определяющих отсутствие межлинейных различий у животных исследованных линий в остром эксперименте.

Настоящая работа выполнена при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований РАН.

## ЛИТЕРАТУРА

1. Величковский Б. Т., Коркина Л. Г., Сулова Е. Б. // Гиг. труда. — 1983. — № 5. — С. 31—34.
2. Дурнев А. Д., Дубовская О. Ю., Нигарова Э. А., Серединин С. Б. // Хим.-фарм. журн. — 1989. — № 11. — С. 1289—1291.
3. Серединин С. Б., Дурнев А. Д. Фармакологическая защита генома. — М., 1992.
4. Allen R. C., Loosen L. D. // Biochem. biophys. Res. Commun. — 1976. — Vol. 69. — P. 245—252.
5. Dean B. J. // Lab. Anim. — 1969. — Vol. 3. — P. 157—174.
6. Lindena J., Burkhardt H. // J. Immunol. Meth. — 1988. — Vol. 155, N 1. — P. 141—148.
7. Tallarida R. I., Murray R. B. Manual of Pharmacologic Calculations with Computer Programs. — New York, 1986.
8. Weitzman S. A., Stossel T. A. // J. Immunol. — 1982. — Vol. 128. — P. 2770—2772.
9. Weitzman S. A., Stossel T. P. // Cancer Lett. — 1984. — Vol. 221. — P. 337—341.

Поступила 09.12.95

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 1995

УДК 615.849.1.015.25:[547.623.233+547.461.4]. 038

В. П. ЧЕРНЫХ, Л. П. АБРАМОВА, Л. И. БОРЯК, В. Н. ГОНЧАРОВА,  
Л. В. БЕЛОГУРОВА, И. А. ЗУПАНЕЦ, В. И. МАКУРИНА

## РАДИОПРОТЕКТОРНОЕ ДЕЙСТВИЕ НОВОГО ФАРМАКОЛОГИЧЕСКОГО СРЕДСТВА “ГЛЮКОСУКЦИН”

Украинская фармацевтическая академия, Харьковский НИИ медрадиологии

Высокая токсичность и нежелательные побочные эффекты ряда современных радиопротекторов [2] побуждают химиков и фармакологов к поиску радиозащитных средств среди нутриентов живых организмов. Перспективными в этом отношении являются широко распространенные в природе аminosахара, а также субстраты цикла Кребса — производные дикарбоновых кислот. В ряду последних особо важная роль принадлежит янтарной кислоте и ее функциональным производным, которые, являясь естественными метаболитами организма, участвуют в процессах клеточного дыхания, а также способны поддерживать компенсаторные реакции живых организмов при патологии. Обнаружено также [6,8], что сукцинат натрия дает радиозащитный эффект. В работе [5] было показано, что биополимер животного происхождения гепарин, широко используемый в клинической практике в качестве антикоагулянта прямого действия, способен регулировать восстановительные и компенсаторные процессы при лучевых поражениях. Поэтому введение в молекулу предполагаемого радиопротектора D-глюкозамина-распространенного в природе структурного компонента гепарина — представляет несомненный интерес.

Ранее [1] на различных моделях лучевой болезни нами было выявлено радиопротекторное и радиовыводящее действие натриевой соли 4-ацетилсукцинаниловой кислоты (Na-АСК). При исследовании возможных путей метаболизма этого соединения было установлено, что 4-АСК в физиологических условиях может подвергаться гид-

## THE CAPACITY OF BONE MARROW CELLS OF GENERATING ACTIVE OXYGEN FORMS IN C57BL/6 AND BALB/C MICE AND MUTAGENIC EFFECTS OF DIOXIDINE

N. V. Guseva, A. D. Durnev, S. B. Seredenin

Research Institute of Pharmacology, Russian Academy of Medical Sciences, Moscow

Phorbol-myristate acetate- and opsonized zymosan-induced statistically significant differences were shown in the intensity of chemiluminescence occurring in the bone marrow cell suspension. The bone marrow cells from male BALB/c mice showed the most pronounced response to stimulation in the two cases. After 5-day administration of dioxidine (300 mg/kg), the number of the injured metaphases in the bone marrow from the examined animals was  $43.6 \pm 2.2$  and  $23.8 \pm 1.9\%$  in BALB/c and C57BL/6 mice, respectively, which provides evidence for marked strain-specific differences in the cytogenetic effect of this prooxidative mutagen. The findings indicated that there was a relationship between the capacity of bone marrow cells of producing APA and the severity of cytogenetic lesions in these cells.

ролизу по связи NH—CO с образованием сукцината и 4-аминоацетофенона (4-ААФ). Последний, по данным [2], дает радиозащитный эффект за счет развития транспортной гипоксии, которую в настоящее время рассматривают как один из универсальных факторов повышения резистентности организма. Однако, как отмечают авторы [2], аминокислоты, в том числе и 4-ААФ, отличаются значительной токсичностью, а высокие дозы, в которых они проявляют радиозащитное действие, не позволяют широко применять их в клинической практике.

Выявленное нами существенное снижение токсичности и эффективной дозы при введении в структуру 4-ААФ остатка янтарной кислоты [1], а также данные литературы о перспективности поиска радиопротекторов в ряду аminosахаров [3] дают основание полагать, что сочетание в одной молекуле указанных фармакофоров может быть благоприятным с точки зрения создания лекарственного препарата для комплексной терапии лучевой болезни.

В связи с отмеченным выше нами осуществлен синтез новой химической субстанции “Глюкосукцин” (ГС), объединяющей в своей структуре молекулярные фрагменты 4-ААФ, сукцинаниловой кислоты и D-глюкозамина, и исследованы ее противолучевые свойства, а также влияние на форменные элементы и морфологический состав периферической крови экспериментальных животных в пострадиационном периоде.

**Выживаемость и средняя продолжительность жизни животных, облученных в дозе 6 Гр**

Условия опыта	Доза, мг/кг	n	Выживаемость						Средняя продолжительность жизни, сут	p
			срок после облучения, сут							
			3	8	10	15	21	30		
Облученный контроль	-	20	19	14	10	9	7	4	10,6 ± 3,6	
		(100)	(95)	(70)	(50)	(45)	(35)	(20)		
ГС-30	15,0	20	20	17	16	13	11	8	18,4 ± 3,3	<0,05
		(100)	(100)	(85)	(80)	(65)	(55)	(40)		
ГС-3	15,0	20	20	19	18	15	13	12	21,7 ± 5,4	<0,01
		(100)	(100)	(95)	(90)	(75)	(65)	(60)		
Цистеин	40,0	20	18	16	15	14	14	14	20,2 ± 2,0	<0,002
		(100)	(90)	(80)	(75)	(70)	(70)	(70)		

Примечание. p — достоверность различий по отношению к облученному контролю. В скобках — процент животных.

**Методика исследования.** Опыты поставлены на 100 половозрелых крысах-самцах линии Вистар массой 180-200 г, подвергавшихся общему однократному рентгеновскому облучению в дозе 6 Гр на аппарате РУМ-17. Экспериментальные животные были разбиты на следующие группы: 1-я — облученные крысы, не получавшие препарата; 2-я — облученные крысы, получавшие препарат ГС до и в течение 30 сут после облучения (ГС-30); 3-я — облученные крысы, получавшие препарат ГС только в качестве радиопротектора (ГС-3); 4-я — облученные крысы, получавшие в качестве радиопротектора эталонный препарат цистеин; 5-я — интактные крысы. Препарат ГС в дозе 15 мг/кг вводили перорально (в пищевод) специальным зондом. Крысы из группы облученного контроля получали перорально дистиллированную воду. Цистеин в дозе 40 мг/кг вводили внутримышечно 1 раз за 15 мин до облучения. У экспериментальных животных оценивали общее состояние, выживаемость за 30 пострадиационных суток, среднюю продолжительность жизни, основные клинические показатели крови (количество лейкоцитов, эритроцитов, уровень гемоглобина, лейкоцитарную формулу).

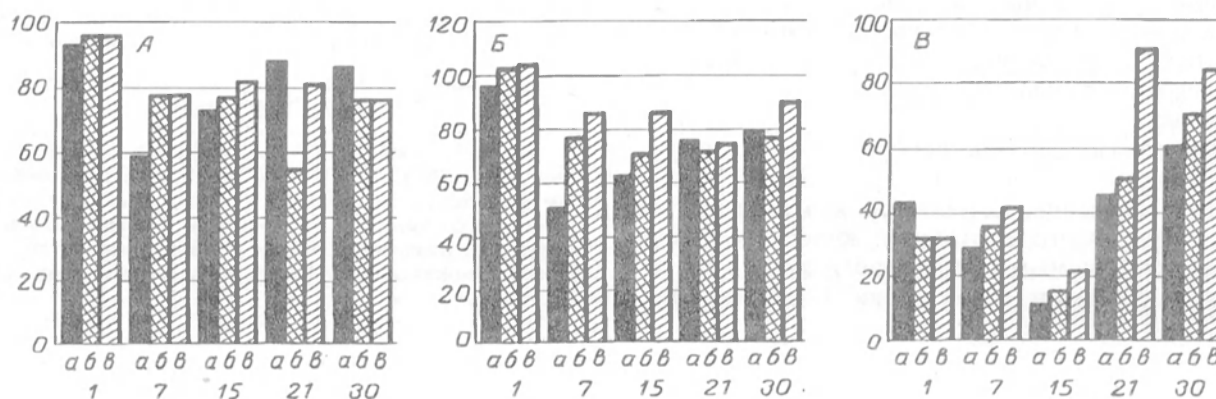
**Результаты и обсуждение.** У облученных крыс, не получавших субстанцию ГС, с 1-х пострадиационных суток отмечались резкое снижение двигательной и пищевой активности,

диспепсические расстройства, снижение массы тела и другие изменения. Гибель животных этой группы начиналась уже с 3-х суток, средняя продолжительность жизни составляла  $10,6 \pm 3,6$  дня; к 30-м суткам выжили только 20% от исходного количества крыс (см. таблицу).

В группе животных, получавших препарат в течение 30 дней (группа ГС-30), выживаемость составляла 40%, что в 2 раза выше, чем в группе облученного контроля (см. таблицу). В этой группе только у некоторых крыс отмечались диспепсические расстройства, снижение пищевой и двигательной активности. Гибель животных начиналась с 5-х суток.

Самая высокая продолжительность жизни ( $21,7 \pm 3,4$  дня) и выживаемость (60%) отмечались в группе животных, получавших субстанцию ГС в качестве протектора (ГС-3). И хотя гибель первых животных в этой группе наступала уже на 5-е сутки (см. таблицу), и в течение первых 2 нед наблюдения состояние экспериментальных животных соответствовало таковому в группе ГС-30, но с 3-й недели после облучения и применения протектора крысы были подвижны, нормально ели, шерстные покровы были гладкими и белыми, приостанавливалась потеря массы тела.

Известно, что гибель животных при облучении в дозе 6 Гр обусловлена главным образом поражением кроветворных органов. Поэтому в



Динамика показателей периферической крови у крыс, облученных в дозе 6 Гр.

По оси ординат — % от исходного уровня, по оси абсцисс — срок после облучения, сут; А — уровень гемоглобина; Б — количество эритроцитов; В — количество лейкоцитов; а — облученный контроль, б — ГС-30, в — ГС-3.

ходе эксперимента осуществлялся контроль показателей периферической крови (см. рисунок). У крыс облученного контроля с 1-х суток развивалась стойкая анемия, на 7-е сутки уровень гемоглобина составлял всего 67% от исходных значений, а число эритроцитов уменьшалось практически в 2 раза. К концу срока наблюдения показатели красной крови приближались к исходным, но уровень гемоглобина оставался сниженным на 15% (см. рисунок). Как видно из рисунка, уровень лейкоцитов падал более чем на 50%, а присущая интактным крысам "лимфоидная" картина крови менялась на относительный нейтрофилез и абсолютную лимфопению. Указанные изменения прослеживались вплоть до 21-х суток с максимальными проявлениями на 7-е сутки, нормализация показателей лейкоцитарной формулы начиналась с 14-х суток, но восстановление этих параметров заканчивалось только к 30-м суткам.

Применение препарата ГС как с радиозащитной, так и с лечебной целью определенным образом модифицировало картину периферической крови. Как видно на рисунке, а, б, в группе ГС-30 снижалась степень проявления анемии и на 7-е сутки у этих животных количество гемоглобина и эритроцитов было ниже исходного уровня на 22 и 24% соответственно (против 41% у облученного контроля).

В большей степени защитный эффект проявлялся в группе ГС-3. В этой группе уровень гемоглобина составлял 86% от нормы, а количество эритроцитов не имело достоверных различий с интактным контролем.

Применение препарата ГС сказывалось и на показателях белой крови. Хотя общее число лейкоцитов оставалось сниженным, глубина лейкопении была уменьшена. К 15-м суткам степень выраженности лейкопении снижалась, но достоверных различий у леченых и нелеченых крыс не наблюдалось (см. рисунок, в). К 21-м суткам в этой группе животных происходила полная нормализация количества лейкоцитов и лейкоцитарной формулы.

На 30-е сутки в группе ГС-3 наблюдалась относительная гипохромная анемия — количество эритроцитов возвращалось к исходному уровню на фоне сниженного на 20% уровня гемоглобина. Показатели белой крови у этих животных к концу исследования практически полностью восстанавливались.

Таким образом, можно отметить, что исследуемая субстанция оказывает определенное радиозащитное действие, которое проявляется как в показателях общего состояния животных и их выживаемости к 30-м суткам наблюдения, так и в картине периферической крови. Наиболее эф-

фективным оказалось применение препарата ГС в качестве радиопротектора: в группе ГС-3 была выявлена наивысшая выживаемость (на уровне, зарегистрированном при использовании препарата сравнения цистеина), наибольшая средняя продолжительность жизни крыс и нормализация показателей периферической крови, которая наступала уже к 21-м суткам.

По-видимому, введение препарата с лечебно-профилактической целью запускает метаболические механизмы, которые позволяют организму в дальнейшем наиболее полно реализовать свой восстановительный потенциал и сохранить после облучения достаточный уровень функционирования критических систем, к которым относится кроветворение.

Кроме того, глюкозамин, являясь структурным компонентом препарата ГС, избирательно стимулирует функцию коры надпочечников [5] и обладая мембраностабилизирующими и антиокислительными свойствами [4,7], способствует проявлению в целом радиопротекторного действия ГС.

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Боряк Л. И., Красноборова А. П., Порохняк Л. А. и др. // Вісн. фарм. — 1994. — № 1 — 2. — С. 125.
2. Владимиров В. Г., Красильников И. И., Арапов О. В. Радиопротекторы: структура и функции. — Киев, 1989.
3. Владимиров В. Г., Лукашин Б. П., Морозова И. Н. и др. // Радиобиология. — 1985. — Т. 25, № 3. — С. 405.
4. Зупанец И. А. Экспериментальное обоснование использования глюкозамина и его производных в медицине: Дис. ... д-ра мед. наук. — М., 1993.
5. Зупанец И. А., Павлий А. И., Бездетко П. В., Компанцев В. А. // Реализация научных достижений в практической фармации. — Харьков, 1991. — С. 226.
6. Ивницкая Ю. Ю. // Активация кроветворения и радиорезистентности организма. — Обнинск, 1990. — С. 87.
7. Плюш С. И., Зупанец И. А., Дрогозов С. М., Исаев С. Г. // Экспер. и клин. фармакол. — 1993. — № 3. — С. 59.
8. Симонова Л. И., Абрамова Л. П., Гертман В. З. и др. // Комбинированные радиационные поражения. — Обнинск, 1988. — С. 144.

Поступила 19.11.94

#### RADIOPROTECTIVE ACTION OF THE NEW PHARMACOLOGICAL AGENT GLUCOSUCCINE

V. P. Chernykh, L. P. Abramova, L. I. Boryak, V. N. Goncharova, L. V. Belogurova, I. A. Zupanets, V. I. Makurina

Research Institute of Medical Radiology, Ukrainian Pharmaceutical Academy, Kharkov

The experiments on 6-Gy irradiated rats have revealed that the new biologically active substance Glucosuccine has a radioprotective effect which depends upon the route of administration. The agent was demonstrated to produce a profound radioprotective rather than therapeutical effects. Its administration for 30 days proved to be less effective than its triple use prior to and following irradiation.

А. Д. ДУРНЕВ, А. В. ОРЕЩЕНКО, А. В. КУЛАКОВА, Н. Ф. БЕРЕСТЕНЬ,  
С. Б. СЕРЕДЕНИН

## ИССЛЕДОВАНИЕ КЛАСТОГЕННОЙ АКТИВНОСТИ ПИЩЕВЫХ САХАРОЗАМЕНТЕЛЕЙ

НИИ фармакологии РАМН, ТОО "Делер-Москва", НПО пивоваренной,  
безалкогольной и винодельческой промышленности, Москва

Согласно современным представлениям, вновь возникающие мутации играют важнейшую роль в поддержании уровней наследственных болезней, врожденных уродств, невынашивании беременности, бесплодии, процессах старения и канцерогенеза, что определяет профилактику индуцированного мутагенеза как важнейшую экогенетическую проблему [3, 9, 10, 13-15].

Наиболее конструктивным способом ее решения признается широкий генетический скрининг, направленный на выявление и устранение мутагенов из среды обитания человека. Однако вследствие многочисленности ксенобиотиков, с которыми сталкивается человек невозможно провести тотальную оценку их мутагенных свойств. Поэтому стало общепринятым определять первоочередность тестирования исходя из масштабов распространения ксенобиотика и регулярности его применения человеком [2, 6].

Сахарозаменители различной природы широко используются для получения диетических и повседневных пищевых продуктов, что определяет необходимость изучения их мутагенной активности. Однако сведений об изучении мутагенности сахарозаменителей недостаточно, в ряде случаев полученные результаты противоречивы. Например, среди нескольких десятков работ, посвященных изучению мутагенности сахараина, имеются как подтверждающие, так и отрицающие наличие у него мутагенных свойств [7].

Целью настоящей работы явилось изучение кластогенной активности пяти распространенных сахарозаменителей: цикламата, сахараина, ацесульфама, сукралозы, аспартама методом учета хромосомных aberrаций у мышей линии C57BL/6, рекомендованным для подобного рода исследований в области фармакологической токсикологии [5].

**Методика.** Исследование выполнено на мышах линии C57BL/6 в возрасте 8-12 нед, массой 18-20 г (питомник "Светлые горы" РАМН). Сахарозаменители вводили перорально на протяжении 5 дней в следующих дозах: цикламат (натриевая соль циклогексил-амино-N-сульфоновой кислоты) — 11 и 110 мг/кг, сахарин (натриевая соль имидо о-сульфобензойной кислоты) — 5 и 50 мг/кг, ацесульфам (калийная соль 3,4-дигидро-6-метил-1,2,3-окситиазин-4-он-2,2-диоксида) — 15 и 150 мг/кг, сукралоза (1,6-дихлор-1,6-дидокси-β-D-фруктофуранозил 4-хлор-4-деокси-α-D-галактопиранозид) — 15 и 150 мг/кг, аспартам (N-L-аспартил-L-фенилаланин) — 40 и 400 мг/кг.

Животных забивали через 6 ч после последнего введения препарата. Приготовление препаратов метафаз для цитогенетического анализа не отличалось от рекомендованного суховоздушного способа [8]. С целью накопления метафазного материала мышам внутрибрюшинно вводили 0,025% раствор колхицина (фирма "Serva") по 0,01 мл на 1 г массы за 2 ч до забоя. Клеточный материал обрабатывали 0,55% раствором KCl (37°C), фиксацию проводили смесью этанола и ледяной уксусной кислоты в соотношении 3:1.

Цитогенетические препараты окрашивали в течение 15 мин азур-эозином. В состав красителя входили 5 частей 0,1% азура, 10 частей дистиллированной воды, 2 части 0,1% эозина.

При цитогенетическом исследовании учитывали ахроматические пробелы (гепы), одиночные и парные фрагменты хромосом, хроматидные и хромосомные обмены. Оценка кластогенности соединений проводили при сравнении суммарного количества клеток с гепами и структурными повреждениями хромосом в контроле и опытных группах.

От каждого животного исследовали по 100 клеток, в каждую группу включали 5 мышей, при цитогенетическом анализе использовали микроскоп "Standart -20" (10 × 100).

Результаты и обсуждение. Результаты, полученные при испытании соединений на мутагенную активность, представлены в таблице.

Изучение 500 метафаз контрольной группы животных позволило выявить  $1,4 \pm 0,5\%$  аномальных клеток. На каждые 100 исследованных метафаз установлено 0,8 клетки с ахроматическими пробелами, 0,6 клетки с одиночными фрагментами. Парных фрагментов и aberrаций обменного типа не выявлено.

Исследуемые сахарозаменители использовали в эксперименте в дозах, составляющих, по рекомендациям ВОЗ [11], максимально допустимые суточные дозы для человека, а также, в соответствии с принципами, принятыми для тестирования мутагенности фармакологических средств [5] в дозах, десятикратно превышающих суточные.

Цитогенетический анализ влияния цикламата, применяемого из расчета 11 мг/кг, 5 дней, ежедневно, на клетки костного мозга позволил зарегистрировать  $2,0 \pm 0,6\%$  aberrантных метафаз. После использования сахарозаменителя из расчета 110 мг/кг было зарегистрировано  $1,0 \pm 0,4\%$  aberrантных метафаз. В обоих случаях спектр хромосомных повреждений был представлен ахроматическими пробелами и одиночными фраг-

**Результаты исследования кластогенной активности сахарозаменителей методом учета хромосомных aberrаций в клетках костного мозга мышей C57BL/6 (500 клеток)**

Сахарозаменитель	На 100 клеток				Всего поврежденных метафаз, %	Уровень значимости
	генов	одиночных фрагментов	парных фрагментов	обменов		
Контроль	0,8	0,6	-	-	1,4 ± 0,5	
Цикламат, мг/кг:						
11	1,2	0,8	-	-	2,0 ± 0,6	>0,05
110	0,6	0,4	-	-	1,0 ± 0,4	>0,05
Сахарин, мг/кг:						
5	0,8	0,6	0,2	-	1,2 ± 0,5	>0,05
50	0,2	1,0	0,2	-	1,2 ± 0,5	>0,05
Ацесульфам, мг/кг:						
15	0,8	0,6	-	-	1,4 ± 0,5	>0,05
150	0,4	0,4	-	-	0,8 ± 0,4	>0,05
Сукралоза, мкг/кг:						
15	0,8	0,8	-	-	1,6 ± 0,6	>0,05
150	0,2	2,0	-	-	2,0 ± 0,6	>0,05
Аспартам, мг/кг:						
40	0,6	0,4	-	-	0,8 ± 0,4	>0,05
400	0,4	0,2	-	-	0,6 ± 0,3	>0,05

ментами. Сравнение полученных результатов с контрольными значениями не выявило между ними статистически достоверных различий.

Цитогенетическое исследование 500 метафазных пластинок, полученных после 5-дневного применения сахараина в дозе 5 мг/кг выявило  $1,2 \pm 0,5\%$  аномальных клеток. Наряду с одиночными фрагментами (0,6 на каждые 100 клеток) и гемами (0,8 на каждые 100 клеток) были зафиксированы парные фрагменты хромосом в количестве 0,2 на 100 исследованных метафаз. После использования сахараина в дозе 50 мг/кг было отмечено  $1,2 \pm 0,5\%$  аномальных клеток. Так же, как и в предыдущем случае, наряду с гемами и одиночными фрагментами были зафиксированы парные фрагменты хромосом в количестве 0,2 на 100 исследованных метафаз. Статистическая обработка полученных данных не выявила статистически достоверных различий между результатами, характеризующими уровень мутирования в контрольных и опытных группах.

Результаты, указывающие на отсутствие у сахараина кластогенных свойств, подтверждается рядом ранее опубликованных сведений [7]. Одновременно обращает внимание, что отдельные работы, авторы которых обнаруживали мутагенную активность у этого сахарозаменителя, были выполнены при его использовании из расчета более 1 г/кг [7], что значительно превышает уровни потребления сахараина, рекомендованные ВОЗ [11].

Ацесульфам в дозах 15 и 150 мг/кг также не индуцировал статистически значимого увеличения числа клеток с хромосомными повреждениями по сравнению с контролем, соответственно было установлено  $1,4 \pm 0,5$  и  $0,8 \pm 0,4\%$  поврежденных клеток. Спектр хромосомных поврежде-

ний представлен гемами и одиночными фрагментами хромосом.

Анализ метафазного материала после применения сукралозы из расчета 15 мг/кг позволил обнаружить по 0,8 одиночного фрагмента и ахроматического пробела хромосом на каждые 100 метафаз. Общее количество поврежденных метафазных пластинок составило  $1,6 \pm 0,6\%$ . Увеличение дозы сахарозаменителя до 150 мг/кг не привело к существенному изменению выхода поврежденных клеток ( $2,0 \pm 0,6\%$ ) или изменению спектра регистрируемых повреждений хромосом. Оба указанных результата не отличаются от контрольных значений.

Аспартам в дозах 40 и 400 мг/кг также не проявил кластогенного действия. Результаты, зарегистрированные после 5-дневного перорального введения этого соединения, составили соответственно  $0,8 \pm 0,4$  и  $0,6 \pm 0,4\%$  поврежденных клеток. Эти значения ниже контрольных результатов, но не имеют с ними статистически достоверных различий. Тем не менее расчеты показывают, что, в том случае если аналогичные результаты будут зарегистрированы при значительном расширении выборки анализируемых клеток, будет возможно сделать заключение об антиму-тагенных свойствах этого агента. Необходимость создания антиму-тагенных средств защиты генетических структур от генотоксического действия средовых и производственных загрязнителей неоднократно подчеркивалась в литературе [1, 4], что делает целесообразными исследования, направленные на продолжение изучения аспартама в качестве возможного антиму-тагенного агента. Подобного рода работы в отношении некоторых сахарозаменителей уже проводятся в настоящее время за рубежом [12].

Таким образом, цитогенетическое исследование пяти сахарозаменителей: цикламата в дозах 11 и 110 мг/кг, сахараина — 5 и 50 мг/кг, ацесульфамы и сукралозы — 15 и 150 мг/кг, аспартама — 40 и 400 мг/кг не выявило у перечисленных соединений кластогенных свойств при 5-дневном пероральном введении лабораторным животным. В соответствии с общими принципами экстраполяции данных, принятыми в области генетической токсикологии [6], следует заключить, что применение перечисленных соединений в указанных дозах в качестве сахарозаменителей человеком не представляет кластогенной опасности.

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Алексеев У. К. Антимутагенез. Теоретические и прикладные аспекты. — М., 1984.
2. Бочков И. П., Шрам Р. Я., Кулешов И. И. и др. // Генетика. — 1975. — № 10. — С. 157-168.
3. Дубинин И. И. Новое в современной генетике. — М., 1986.
4. Серединин С. Б., Дурнев А. Д. Фармакологическая защита генома. — М., 1992.
5. Методические рекомендации по оценке мутагенных свойств фармакологических средств. — М., 1994.
6. Руководство по краткосрочным тестам для выявления мутагенных и канцерогенных химических веществ (Гигиенические критерии состояния окружающей среды. № 51). — М., 1989.

7. Arnold D. L., Boyes B. G. // *Mutat. Res.* — 1989. — Vol. 221. — P. 69-132.
8. Dean B. J. // *Lab. Anim.* — 1969. — Vol. 3. — P. 157-174.
9. Childs J. D. // *Mutat. Res.* — 1981. — Vol. 83. — P. 145-158.
10. Lawley P. D. // *Ibid.* — 1989. — Vol. 213. — P. 3-26.
11. Official Journal of the European Communities. — 1994. — N L237/3-12.
12. Parker K. R., von Borstel R. C. // *Basic Life Sci.* — 1990. — Vol. 52. — P. 367-371.
13. Schreiner C. A., Holden H. E. // *Teratogenesis and Reproductive Toxicology.* — Berlin, 1983. — P. 135-168.
14. Stowers S. J., Maronpot R. K., Reynolds S. H. et al. // *Environ. Hith. Perspect.* — 1987. — Vol. 75. — P. 81-86.
15. Susanne C. // *Mutagenecity, Carcinogenesis, and Teratogenicity Induced Pollutants.* — New York, 1984. — P. 1-4.

Поступила 09.12.94

## STUDY INTO THE CLASTOGENIC ACTIVITY OF DIETARY SUGAR SUBSTITUTES

A. D. Durnev, A. V. Oreshchenko, A. V. Kulakova, N. F. Beresten, S. B. Seredenin

Research Institute of Pharmacology, Russian Academy of Medical Sciences, Delep-Moscow Unlimited Liability Co., Research Production Association of Brewing, Nonalcoholic, and Wine-Making Industry, Moscow

The present paper describes the possible clastogenic activity of the following synthetic sugar substitutes, such as cyclamate in daily doses of 11 and 110 mg/kg, saccharine, 5 and 50 mg/kg, acesulfam, 15 and 150 mg/kg, sucralose, 15 and 150 mg/kg, aspartam, 40 and 400 mg/kg, orally given to C57Bl/6 mice during 5 days. No clastogenic activity was found in the compounds tested.

## КЛИНИКО-БИОХИМИЧЕСКИЕ ИССЛЕДОВАНИЯ

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 1995

УДК 615.356:577.161.3].03:616.248-085

### К. Д. ПЛЕЦИТЫЙ, С. Б. ВАСИПА, Т. В. ДАВЫДОВА, В. Г. ФОМИНА ВИТАМИН Е: ИММУНОКОРРИГИРУЮЩИЙ ЭФФЕКТ У БОЛЬНЫХ БРОНХИАЛЬНОЙ АСТМОЙ

Институт общей патологии и патологической физиологии РАМН, Москва,  
Республиканский пульмонологический центр Минздрава Латвии, Рига

Имеющиеся в литературе данные свидетельствуют, что витамин Е ( $\alpha$ -токоферол обладает не только мощными антиоксидантными, но также выраженными иммуностимулирующими и иммунокорригирующими свойствами. Так, показано, что витамин Е стимулирует клеточный и гуморальный иммунный ответ, в последнем случае, вероятно, за счет активации Т-хелперов [13,28,29]. Дополнительное введение  $\alpha$ -токоферола повышает активность естественных киллеров [15], тормозит развитие некоторых аутоиммунных реакций [5,14], увеличивает массу тимуса и содержание лимфоцитов в периферической крови [15] и стимулирует секрецию Т-лимфоцитами цитокина интерлейкина-2 [27]. Кроме того, витамин Е дает иммунокорригирующий эффект при иммобилизационном стрессе [11] и экспериментальном хроническом алкоголизме [6]. Недавно показано, что алкоголизация крыс приводит к ослаблению секреции лимфоцитами целого ряда цитокинов; одновременное применение витамина Е в большинстве случаев препятствует развитию этих нарушений [31]. Помимо этого,  $\alpha$ -токоферол отличается полной безвредностью, не оказывает в отличие от других жирорастворимых витаминов токсического действия даже при длительном применении в массивных дозах. Комплекс подобных свойств делает витамин Е весьма подходящим средством комплексной терапии заболеваний самой различной природы, в патогенезе которых существенную роль играет нарушение тех или иных иммунологических механизмов. В этом плане существенный ин-

терес вызывает бронхиальная астма, для которой характерны выраженные иммунологические нарушения, затрагивающие систему Т-лимфоцитов [2, 23], В-лимфоцитов [1, 23], комплемента [7], естественных киллеров [30]. Среди этих нарушений наиболее страдает Т-система иммунитета, что проявляется в Т-лимфоцитопении и ослаблении функциональной активности Т-клеток. При этом применение витамина Е, который способствует увеличению содержания Т-лимфоцитов в периферической крови и стимулирует их функциональную активность, является оправданным и целесообразным. Назначение  $\alpha$ -токоферола при бронхиальной астме можно рекомендовать еще по нескольким причинам. Во-первых, известно, что в патогенезе этого заболевания существенную роль играет повышение уровня простагландинов, тогда как витамин Е является ингибитором их биосинтеза [16]. Во-вторых, для бронхиальной астмы характерным является развитие мембранодестабилизирующих процессов [9], в то же время, как известно, витамин Е является мощным стабилизатором цитомембран [17]. И наконец, при астме усилено перекисное окисление липидов [9], в то время как основным свойством токоферола является способность оказывать антиоксидантное действие. В силу всех перечисленных факторов применение витамина Е в комплексной терапии бронхиальной астмы позволяет считать это вмешательство фактором патогенетической терапии.

Методика. Обследованы больные астмой I и II стадии в период обострения. Наблюдения

**Влияние витамина Е на некоторые иммунологические показатели при бронхиальной астме ( $M \pm m$ )**

Исследованные показатели	До введения витамина Е	После введения витамина Е	<i>p</i>
Число лейкоцитов в 1 мм <sup>3</sup> периферической крови	4494 ± 332	5283 ± 262	<0,05
Лимфоциты	30,2 ± 4,8	35,0 ± 4,9	<0,05
Т-лимфоциты активные	37,6 ± 2,2	56,0 ± 5,0	<0,01
Т-лимфоциты тотальные	51,8 ± 1,7	64,2 ± 2,4	<0,01
В-лимфоциты (зимозан)	12,0 ± 1,1	16,0 ± 1,3	<0,05
В-лимфоциты (эритроциты мыши)	8,2 ± 0,9	5,7 ± 1,1	<0,05

были проведены на базе Республиканского пульмонологического центра Минздрава Латвии. Больные на фоне общепринятой комплексной антиастматической терапии дополнительно орально в течение 6-7 дней получали витамин Е в капсулах в суточной дозе 300 МЕ. Контролем служили больные сходного пола и возраста, получавшие комплексную терапию без витамина Е. Сразу же следует отметить, что в этой группе больных не было выявлено какой-либо достоверной динамики изученных иммунологических показателей. Кровь из вены брали до и через 1 сут после завершения витаминотерапии. Одновременно в те же сроки брали кровь у больных контрольной группы.

Т-лимфоциты определяли общепринятым методом розеткообразования с эритроцитами барана, выявляя как общее содержание Т-клеток в периферической крови [20], так и активные Т-лимфоциты [18]. Зрелые В-клетки определяли с помощью реакции розеткообразования с частицами зимозана [26], а юные формы В-лимфоцитов — путем розеткообразования с эритроцитами мыши [25]. Об уровне функциональной активности Т-лимфоцитов судили по диаметру гиперемии, определяемому через 1 сут после внутрикожного введения больному фитогемагглютина (0,04% раствор в объеме 0,1 мл, фирма "Рсанал", Венгрия). Для определения концентрации иммуноглобулинов М, А и G использовали метод радиальной иммунодиффузии [24]. О фагоцитарной активности гранулоцитов периферической крови судили по результатам микроскопического исследования окрашенных по Романовскому—Гимзе мазков крови. В качестве тест-микроба использовали золотистый стафилококк (штамм Жасв). При этом определяли фагоцитарное число — процент клеток, фагоцитирующих стафилококки, фагоцитарный индекс — среднее число микробов, захваченное 1 фагоцитом, а также показатель завершенности фагоцитоза, характеризовавшийся числом умерщвленных гранулоцитами микробов. При проведении цитохимических исследований содержание миелопероксидазы в гранулоцитах определяли общепринятым методом по Сато, а уровень катионных белков — люминесцентным методом с использованием мазков, окрашенных примулином [4]. Для определения лизоцимной и комплементарной активности сыворотки крови применяли общепринятые тесты [8, 10]. Статистическую обработку полученных результатов производили с исполь-

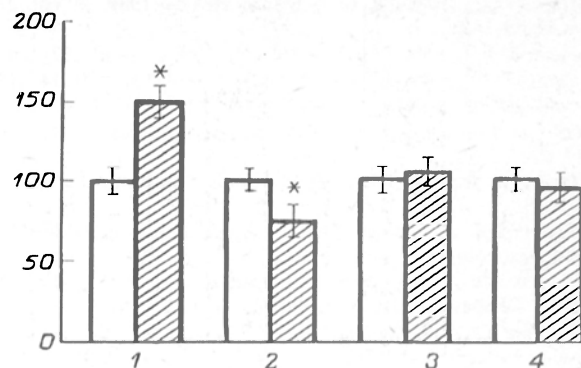


Рис. 1. Влияние витамина Е на функциональную активность Т-лимфоцитов и уровень сывороточных иммуноглобулинов у больных бронхиальной астмой.

1 — функциональная активность Т-лимфоцитов; 2 — содержание иммуноглобулина G в сыворотке; 3 — содержание иммуноглобулина М в сыворотке; 4 — содержание иммуноглобулина А в сыворотке.

Здесь и на рис. 2 незаштрихованные столбики — показатели до начала приема витамина Е, принятые за 100%; заштрихованные столбики — показатели после приема витамина Е. Звездочкой обозначены статистически значимые различия между данными, полученными до и после приема витамина Е.

зованием Т-критерия Стьюдента и методом Хи-квадрат.

**Результаты и обсуждение.** Основные результаты исследования приведены в таблице и на рис. 1 и 2. Как следует из таблицы, применение витамина Е в комплексной терапии бронхиальной астмы увеличивает общее содержание лейкоцитов в периферической крови и уровень лимфоцитов. Резко возрастает также как общее содержание Т-клеток, так и численность активных Т-лимфоцитов. Отмечено также увеличение содержания зрелых В-лимфоцитов, тогда как численность юных В-клеток, напротив, снижается.

Рис. 1 иллюстрирует влияние витамина Е на функциональную активность Т-лимфоцитов и уровень сывороточных иммуноглобулинов. Из этого рисунка следует, что прием α-токоферола выраженно стимулирует функциональную активность Т-клеток, не влияет на уровень иммуноглобулинов А и М и нормализует повышенное содержание иммуноглобулина G.

На рис. 2 показано влияние витамина Е на активность некоторых показателей неспецифической резистентности у больных бронхиальной астмой. Из этого рисунка следует, что витамин Е существенно стимулирует фагоцитарную активность гранулоцитов; при этом возрастает как фагоцитарное число, так и фагоцитарный индекс, тогда как показатель завершенности фагоцитоза существенно не изменяется, что коррелирует с отсутствием изменений значений, характеризующих деятельность бактерицидных систем гранулоцитов катионных белков и миелопероксидазы. В то же время под влиянием витамина Е у больных бронхиальной астмой снижаются повышенная лизоцимная и комплементарная активность сыворотки крови (данные не приведены).

Кроме того, был выявлен определенный лечебный эффект витамина Е. По данным сотрудников Республиканского пульмонологического

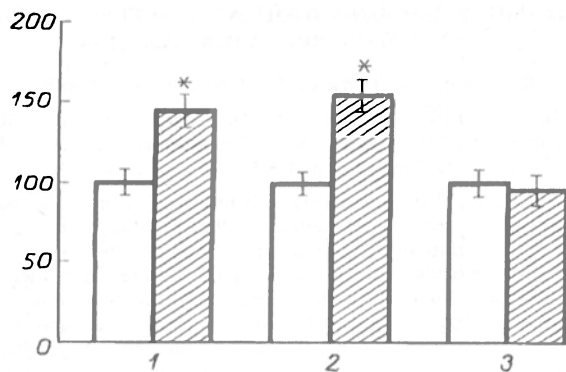


Рис. 2. Влияние витамина Е на некоторые показатели функциональной активности гранулоцитов периферической крови у больных бронхиальной астмой.

1 — фагоцитарное число; 2 — фагоцитарный индекс; 3 — показатель завершения фагоцитоза.

центра, осуществлявших наблюдения за больными, применение витамина Е в комплексной терапии бронхиальной астмы способствовало улучшению у больных показателей, характеризующих функции внешнего дыхания, а также уменьшало продолжительность пребывания больных в стационаре.

Таким образом, полученные данные подтвердили выявленные нами ранее в экспериментах со стрессом иммунокорригирующие свойства витамина Е. В данном случае речь идет именно об иммунокоррекции, поскольку  $\alpha$ -токоферол, нормализуя сниженную численность Т-лимфоцитов и их функциональную активность, в то же время уменьшал повышенную активность лизоцима и комплемента и повышенный уровень сывороточного иммуноглобулина G. Механизмы, лежащие в основе выявленных закономерностей, не совсем ясны, однако считаем возможным высказать несколько достаточно аргументированных предположений. У больных бронхиальной астмой, получавших  $\alpha$ -токоферол, наблюдали увеличение содержания в периферической крови зрелых В-лимфоцитов с одновременным уменьшением количества юнгов В-клеток. Это со всей очевидностью доказывает, что витамин Е стимулирует процесс клеточного созревания. В соответствии с данными [27], можно предположить, что активация витамином Е секреции интерлейкина-2 Т-клетками также может иметь прямое отношение к повышению количества Т-лимфоцитов и их функциональной активности, что имеет место у больных бронхиальной астмой. Нельзя также отбросить «простагландиновую гипотезу», в соответствии с которой иммуномодулирующие свойства  $\alpha$ -токоферола могут быть объяснены тем, что он, как известно, подавляет биосинтез простагландинов [22], которые в свою очередь обладают выраженными иммуносупрессивными свойствами [19]. Снижение активности лизосомального фермента лизоцима в сыворотке может быть объяснено мембраностабилизирующими [17] и противовоспалительными [21] свойствами витамина Е. Бронхиальная астма в большинстве случаев сопровождается воспалительными изме-

нениями в респираторной системе, в результате чего в сыворотке возрастает активность лизосомальных ферментов. Что касается снижения повышенного уровня сывороточного комплемента, то в данном случае могут играть роль особенности использованного метода его определения, основанного на гемолизе эритроцитов, тогда как известно, что разрушающее действие комплемента в отношении эритроцитов опосредуется за счет продуктов перекисного окисления липидов [3, 12]. Применение в данном случае антиоксиданта — витамина Е, естественно, приводит к торможению генерации перекисного окисления.

## ЛИТЕРАТУРА

1. Адо А. Д., Лобкова О. С., Шустова В. И. и др. // Сов. мед. — 1984. — № 9. — С. 7-13.
2. Бакулин М. П., Марциновский В. Ю., Сильвестров В. П. и др. // Тер. арх. — 1984. — № 3. — С. 34-38.
3. Борунов Е. В., Иванов В. В., Щепеткин И. А. // Бюл. exper. биол. — 1986. — № 11. — С. 34-38.
4. Венглинская Е. А., Рукавцов Б. И., Шубич М. Г. // Лаб. дело. — 1976. — № 5. — С. 270-273.
5. Вилков Г. А., Степаненко Е. М., Крыжановский Г. П. // Бюл. exper. биол. — 1987. — № 9. — С. 288-290.
6. Давыдова Т. В., Плещитый К. Д., Фомина В. Г. // Вопр. питания. — 1988. — № 3. — С. 45-48.
7. Дворецкий Л. И., Дидковский И. А., Решетова Н. В. // Тер. арх. — 1990. — № 3. — С. 38-40.
8. Дорофейчук В. Г. // Лаб. дело. — 1968. — № 1. — С. 28-30.
9. Крылов В. И., Олехнович В. М., Сорогин В. П. и др. // Вопр. мед. химии. — 1984. — № 1. — С. 52-55.
10. Кэбот Е., Мейер Е. Экспериментальная иммунохимия. — М., 1968.
11. Меерсон Ф. З., Сухих Г. Т., Плещитый К. Д. // Бюл. exper. биол. — 1985. — № 6. — С. 646-647.
12. Олехнович В. М., Крылов В. И. // Педиатрия. — 1985. — № 8. — С. 11-15.
13. Плещитый К. Д. // Иммунология. — 1985. — № 2. — С. 72-73.
14. Плещитый К. Д., Никушкин Е. В., Аскеров М. А. и др. // Бюл. exper. биол. — 1987. — № 1. — С. 43-45.
15. Плещитый К. Д., Сухих Г. Т., Давыдова Т. В. // Вопр. питания. — 1984. — № 4. — С. 42-44.
16. Чучалин А. Г., Анульцина И. Д. // Сов. мед. — 1983. — № 5. — С. 6-10.
17. Brown H. J., Pollock D. H. // J. Nutr. — 1972. — Vol. 102. — P. 1413-1420.
18. Florey M. J., Peetoom F. // J. Immunol. Meth. — 1976. — Vol. 13. — P. 201-206.
19. Goodwin J. S., Webb D. R. // Clin. Immunol. Immunopathol. — 1980. — Vol. 15. — P. 106-122.
20. Jondal M., Hol G., Vigzell F. // J. exp. Med. — 1972. — Vol. 136. — P. 207-215.
21. Kamimura M. // J. Vitaminol. — 1972. — Vol. 18. — P. 204-209.
22. Lands W. E. M., Rome L. H. // Prostaglandins: Chemical and Biochemical Aspects / Ed. S. M. M. Karen. — Baltimore, 1976. — P. 87-137.
23. Malolopsky J., Kraus-Filarska M., Szeliga W. R. et al. // Arch. Immunol. Ther. exp. — 1982. — Vol. 30. — P. 63-66.
24. Mancini G., Carbonara A. O., Heremans J. F. // Immunochimistry. — 1965. — Vol. 2. — P. 235-254.
25. McGraw D. J., Kures A. S., Davey F. R. // Amer. J. clin. Pathol. — 1982. — Vol. 77. — P. 177-183.

26. Mendes N. F., Mikis S., Paixinho Z. F. // J. Immunol. — 1974. — Vol. 113. — P. 531-536.
27. Meydani S. N., Meydani M., Verdon C. R. et al. // Mech. Ageing Develop. — 1986. — Vol. 34. — P. 355-367.
28. Tanaka J., Fujiwara H., Torizu M. // Immunology. — 1979. — Vol. 38. — P. 727-734.
29. Tengerdy R. P., Meyer D. D., Lauerman L. H. et al. // Brit. Vet. J. — 1983. — Vol. 139. — P. 147-152.
30. Timonen T., Stenius-Arniala B. // Clin. exp. Immunol. — 1985. — Vol. 59. — P. 85-90.
31. Wang Y., Huang D. S., Watson R. R. // Alcoholism: Clin. exp. Res. — 1994. — Vol. 18. — P. 355-367.

Поступила 19.11.94

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 1995

УДК 615.356:577.161.1].015.4.07

Л. М. ЯКУШИНА, Э. А. МАЛАХОВА, Т. Н. ШКАРИНА, А. А. ПОЗНАНСКАЯ,  
В. Б. СПИРИЧЕВ

## ИЗУЧЕНИЕ БИОДОСТУПНОСТИ И ФАРМАКОДИНАМИКИ РАЗЛИЧНЫХ ФОРМ СИНТЕТИЧЕСКОГО $\beta$ -КАРОТИНА НА ДОБРОВОЛЬЦАХ

Институт питания РАМН, НПО "Витамины", Москва

Рядом исследователей отмечена взаимосвязь между содержанием в сыворотке крови человека каротиноидов и риском развития некоторых раковых заболеваний [8, 11]. Выявлена обратная зависимость между потреблением в пищу продуктов, богатых каротином, и частотой некоторых форм эпителиального рака [8, 9]. В связи с этим возрастает потребность в оценке содержания и биодоступности  $\beta$ -каротина и других каротиноидов, что требует точных и высокопроизводительных методов одновременного определения жирорастворимых витаминов в сыворотке крови, особенно при проведении широких эпидемиологических исследований.

Развитие методов высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ) позволило определять достаточно быстро и надежно перечисленные вещества в сыворотке крови человека, в пищевых продуктах и препаратах [2].

Целью данной работы было сравнительное изучение на добровольцах биологической доступности синтетического  $\beta$ -каротина из его водорастворимой формы на основе циклодекстрина (таблетки циклокара) в сравнении с пастой  $\beta$ -каротина в растительном масле (оба препарата приготовлены в НПО "Витамины") при их однократном приеме.

**Методика.** 1. *Условия проведения эксперимента.* Исследование проводили на 20 добровольцах, здоровых мужчинах и женщинах 20-67 лет, из которых были составлены 2 группы, соответствующие двум исследуемым препаратам  $\beta$ -каротина: 1-я группа — обследуемые принимали масляный препарат и 2-я группа — таблетки циклокара. Каждый препарат содержал 25 мг  $\beta$ -каротина.

Исследование проводили в течение 7 дней с отбором 9 проб крови по следующей схеме: 1-й

## VITAMIN E: IMMUNOMODULATING EFFECT IN PATIENTS WITH BRONCHIAL ASTHMA

K.D. Plotsityi, S.B. Vasipa, T.V. Davydova, V.G. Fomina

Institute of General Pathology and Pathological Physiology, Russian Academy of Medical Sciences, Moscow, and Republican Pulmonological Center, Latvia's Ministry of Health, Riga

The examination of patients with bronchial asthma has established that vitamin E supplemented to their multimodality therapy produces an immunological effect. The decreased functional activity of T lymphocytes increases and their levels elevate in their peripheral blood. There was also an increase in the blood levels of B cells, by elevating the count of mature B lymphocytes and reducing that of immature B cells. Vitamin E enhances the phagocytic activity of peripheral granulocytes whereas the serum activity of lysozyme and complement declines.

отбор — для определения фоновых концентраций, 2-й — через 5 сут, также фоновый, непосредственно перед приемом препаратов, 3-й отбор — через 6 ч после разового приема одной дозы препаратов  $\beta$ -каротина, 4-й — через 24 ч после приема препаратов, 5-й — через 30 ч, 6-й — через 48 ч, 7-й и 8-й — через каждые последующие 24 ч, интервал перед последним (9-м) отбором крови составил 3 сут. Для группы, принимавшей таблетки циклокара, по техническим причинам отсутствовали 4-й и 7-й отборы крови. Каждому добровольцу была выдана памятка с указанием диеты в день приема препаратов и времени отбора крови. После 1-го отбора крови добровольцы были распределены по группам таким образом, чтобы средние фоновые концентрации  $\beta$ -каротина и суммы каротиноидов были приблизительно одинаковыми в обеих группах. После 2-го отбора крови фоновые концентрации  $\beta$ -каротина и суммы каротиноидов несколько изменились ввиду персонального и количественного изменения состава групп. Однако эти различия не были достоверными.

2. *Приготовление проб.* Отбор крови проводили одноразовыми иглами по 5 мл с последующей обработкой крови для получения сыворотки, которую хранили до проведения анализа в холодильнике при температуре  $-17^{\circ}\text{C}$ .

К 200 мкл сыворотки в пробирке с плотной пробкой емкостью 4 мл добавляли 200 мкл спиртового раствора токоферола ацетата концентрации 50-70 мкг/мл, используемого в качестве внутреннего стандарта, встряхивали в течение 1 мин, добавляли 200 мкл гексана, встряхивали 15 мин, центрифугировали 15 мин при 3000 об/мин, отбирали 120 мкл гексанового экстракта в пробирку Эппендорфа емкостью 1,5 мл и упаривали в токе азота досуха. Остаток растворяли в

20 мкл дихлормстана и добавляли 100 мкл элюента. 50 мкл образца вводили на колонку.

3. *Условия хроматографического анализа.* Концентрацию  $\beta$ -каротина в сыворотке крови определяли с помощью ВЭЖХ в условиях, позволяющих одновременно анализировать весь спектр каротиноидов, ретинол, ретинилпальмитат и токоферолы в одном образце сыворотки крови. В предыдущих наших работах [2, 3] анализ проводился с использованием одного детектора — спектрофотометра с программируемой сменой длин волн. При этом анализ приходилось проводить для каждой пробы дважды. Первый — для определения каротиноидов, второй — для определения ретиноидов, токоферолов и внутреннего стандарта — токоферилацетата. В настоящей работе мы использовали два последовательно соединенных детектора — спектрофотометр и спектрофлуориметр. Это позволило проводить анализ всех перечисленных витаминов за один прием:  $\beta$ -каротин и каротиноиды — с помощью спектрофотометра при 450 нм и ретинол, ретинилпальмитат, токоферолы и внутренний стандарт — с помощью спектрофлуориметра с программируемыми длинами волн, что существенно экономило время и увеличивало производительность анализов. Нами были проведены исследования по подбору внутреннего стандарта и оптимальных условий анализа, позволяющих эффективно разделять все исследуемые компоненты.

Для анализа использовали следующую хроматографическую систему: колонка (150  $\times$  4 мм), сорбент — Nucleosil C18, 5 мкм (ЭЛСИКО), элюент — ацетонитрил—метанол—дихлормстан (50:40:10), расход 0,6 мл/мин (насос "Jasco 880-RU"), два последовательно соединенных детектора — спектрофотометр ("Jasco 870-UV") и спектрофлуориметр ("Jasco 821-FP") и два регистрирующих интегратора типа "Shimadzu C-R6A"). Программа на спектрофлуориметре, позволяющая определять все разделяемые витамины: начальные длины волн  $\lambda_{ex}$  325 нм,  $\lambda_{em}$  480 нм (определение уровня ретинола), через 5,5 мин после начала анализа смена длин волн на  $\lambda_{ex}$  295 нм,  $\lambda_{em}$  330 нм (определение уровня  $\alpha$ -токоферола и внутреннего стандарта — токоферилацетата), через 15 мин после начала анализа следующая смена длин волн на  $\lambda_{ex}$  325 нм,  $\lambda_{em}$  480 нм (определение содержания ретинилпальмитата). Время анализа 25 мин. Время удерживания в предложенных условиях: ретинола — 3,9 мин,  $\beta$ - и  $\gamma$ -токоферолов — 8 мин,  $\alpha$ -токоферола — 6,4 мин, токоферилацетата — 7,4 мин, ретинилпальмитата — 22,5 мин, каротиноидов: лютеина с зеаксантином — 5 мин, криптоксантина — 9,8 мин, ликопина — 13,5 мин,  $\alpha$ -каротина — 19,7 мин и  $\beta$ -каротина — 21 мин.

**Результаты и обсуждения.** В табл. 1-4 приведены полученные нами данные. Из представленных результатов видно, что содержание токоферолов, ретинола и ретинилпальмитата в сыворотке крови добровольцев в процессе эксперимента практически не изменялось. Эти результаты согласуются с данными литературы [6,

Таблица 1  
Концентрация ретиноидов и токоферолов в сыворотке крови добровольцев, принимавших различные препараты  $\beta$ -каротина ( $M \pm m$ )

Витамины	Гр. пола	Время отбора проб крови								
		-5 сут	0 сут	6 ч	24 ч	30 ч	2 сут	3 сут	4 сут	7 сут
Ретинол, мкг/дл	Масляная паста	37,8 ± 2,3 (46,9 - 26,6)	42,5 ± 4,1 (62,3 - 21,5)	31,9 ± 3,9 (43,6 - 10,9)	49,1 ± 8,0 (91,6 - 24,7)	50,3 ± 8,7 (114,8 - 27,4)	29,9 ± 1,4 (36,2 - 23,0)	32,6 ± 1,6 (37,9 - 24,4)	31,1 ± 3,1 (47,1 - 17,8)	35,5 ± 1,9 (41,0 - 20,0)
	Циклокар	42,0 ± 1,5 (51,5 - 34,7)	52,9 ± 4,7 (72,4 - 28,3)	40,1 ± 3,0 (53,3 - 21,2)	-	50,9 ± 5,0 (90,2 - 33,8)	40,5 ± 2,8 (53,5 - 28,9)	-	39,0 ± 2,3 (51,0 - 29,1)	43,0 ± 3,5 (60,0 - 30,5)
Ретинилпальмитат, мкг/дл	Масляная паста	33,9 ± 7,3 (62,3 - 0)	35,0 ± 7,0 (82,4 - 9,7)	44,1 ± 9,4 (94,1 - 6,7)	37,7 ± 8,8 (86,1 - 0)	53,9 ± 9,6 (88,2 - 17,2)	42,0 ± 7,2 (64,8 - 4,1)	43,8 ± 7,6 (84,1 - 5,9)	51,8 ± 10,2 (113,6 - 8,7)	43,7 ± 12,3 (136,8 - 4,4)
	Циклокар	39,4 ± 4,5 (73,3 - 26,0)	35,5 ± 5,7 (63,2 - 13,1)	58,7 ± 8,9 (109,5 - 19,6)	-	49,1 ± 10,6 (128,2 - 19,2)	56,8 ± 9,9 (115,7 - 19,7)	-	48,1 ± 9,4 (108,9 - 15,1)	37,9 ± 6,5 (86,2 - 14,8)
Сумма токоферолов, мг/дл	Масляная паста	1,29 ± 0,11 (1,80 - 0,74)	1,22 ± 0,07 (1,56 - 0,95)	1,07 ± 0,07 (1,45 - 0,51)	1,15 ± 0,12 (1,72 - 0,54)	1,41 ± 0,13 (2,30 - 0,91)	0,96 ± 0,11 (1,24 - 0,12)	0,94 ± 0,04 (1,11 - 0,70)	0,93 ± 0,04 (1,13 - 0,75)	0,97 ± 0,05 (1,17 - 0,75)
	Циклокар	1,36 ± 0,13 (2,04 - 0,91)	1,37 ± 0,11 (2,19 - 0,87)	1,26 ± 0,10 (1,91 - 0,88)	-	1,20 ± 0,07 (1,58 - 0,94)	1,15 ± 0,09 (1,75 - 0,78)	-	0,95 ± 0,09 (1,48 - 0,63)	1,02 ± 0,07 (1,47 - 0,81)

Примечание. Здесь и в табл. 2 в скобках — пределы колебаний.

Концентрация каротиноидов (в мкг/дл) в сыворотке крови добровольцев, принимавших различные препараты β-каротина ( $M \pm m$ )

Каротиноиды	Группа	Время отбора проб крови								
		-5 сут	0 сут	6 ч	24 ч	30 ч	2 сут	3 сут	4 сут	7 сут
β-Каротин	Масляная паста	19,7 ± 5,2	24,0 ± 5,2	27,8 ± 6,2	41,1 ± 10,4	48,0 ± 7,7	34,2 ± 6,4	29,1 ± 6,8	24,5 ± 4,2	19,4 ± 4,9
		(43,3 - 4,3)	(52,9 - 5,1)	(57,2 - 2,2)	(105,8 - 6,3)	(90,0 - 14,5)	(77,7 - 7,1)	(79,4 - 5,2)	(54,5 - 7,5)	(57,0 - 5,4)
	Циклокар	18,5 ± 3,3	18,7 ± 2,2	22,2 ± 2,3	-	28,1 ± 3,6	26,8 ± 4,6	-	19,6 ± 2,0	16,1 ± 2,4
		(44,0 - 9,1)	(29,0 - 9,4)	(37,6 - 14,6)	-	(44,9 - 15,2)	(57,3 - 10,7)	-	(29,4 - 10,5)	(29,8 - 7,6)
Лютеин + зеаксантин	Масляная паста	18,7 ± 3,0	18,8 ± 2,6	16,8 ± 2,3	25,6 ± 5,7	29,0 ± 4,1	19,4 ± 1,7	15,6 ± 1,5	16,5 ± 2,1	15,0 ± 2,2
		(33,2 - 8,6)	(40,7 - 11,9)	(25,1 - 0,7)	(63,7 - 4,8)	(54,6 - 17,7)	(28,3 - 11,8)	(24,0 - 10,7)	(29,6 - 6,9)	(28,5 - 6,6)
	Циклокар	19,7 ± 3,0	20,2 ± 1,2	16,3 ± 2,7	-	23,2 ± 2,2	20,6 ± 1,9	-	15,7 ± 2,0	16,4 ± 2,1
		(35,1 - 9,0)	(28,9 - 15,9)	(31,2 - 6,9)	-	(35,0 - 13,2)	(31,5 - 10,5)	-	(29,1 - 8,5)	(29,3 - 9,4)
Криптоксантин	Масляная паста	7,8 ± 1,3	5,7 ± 1,2	7,4 ± 1,1	5,4 ± 1,3	5,2 ± 0,9	5,2 ± 1,1	5,8 ± 1,1	5,8 ± 1,2	6,7 ± 1,3
		(13,8 - 3,3)	(12,4 - 0)	(13,3 - 2,3)	(11,9 - 1,0)	(8,7 - 2,0)	(9,8 - 1,2)	(12,0 - 2,4)	(11,1 - 0,6)	(14,7 - 2,2)
	Циклокар	6,3 ± 0,6	5,2 ± 0,5	6,7 ± 0,9	-	4,5 ± 0,6	4,4 ± 0,5	-	6,1 ± 0,7	4,9 ± 0,5
		(9,3 - 3,8)	(7,5 - 1,7)	(13,8 - 3,1)	-	(6,9 - 2,2)	(6,8 - 1,6)	-	(8,9 - 3,1)	(7,6 - 2,8)
Ликопин	Масляная паста	10,8 ± 2,8	15,9 ± 4,2	22,7 ± 5,4	16,3 ± 3,7	23,6 ± 4,6	23,5 ± 5,2	20,3 ± 3,3	20,0 ± 4,1	20,5 ± 4,1
		(26,5 - 4,4)	(41,0 - 0)	(53,4 - 3,4)	(30,3 - 0)	(50,5 - 6,7)	(51,9 - 4,9)	(38,5 - 4,1)	(40,9 - 8,1)	(49,3 - 5,1)
	Циклокар	11,2 ± 3,4	12,7 ± 3,7	17,5 ± 4,6	-	15,0 ± 5,1	20,6 ± 4,2	-	18,2 ± 2,8	15,8 ± 1,6
		(39,5 - 2,3)	(35,2 - 2,4)	(51,7 - 5,5)	-	(46,2 - 0)	(48,0 - 9,1)	-	(37,0 - 8,4)	(24,5 - 10,1)
α-Каротин	Масляная паста	8,3 ± 2,5	7,2 ± 2,1	7,0 ± 2,0	7,1 ± 2,5	9,8 ± 2,6	6,9 ± 1,8	5,6 ± 1,7	5,2 ± 1,4	3,8 ± 1,0
		(18,4 - 1,3)	(19,7 - 1,2)	(19,1 - 0,8)	(22,1 - 1,1)	(24,5 - 3,5)	(24,5 - 3,5)	(15,5 - 0,8)	(12,7 - 1,2)	(9,4 - 0,9)
	Циклокар	7,0 ± 1,9	6,6 ± 1,5	7,8 ± 1,6	-	7,5 ± 1,5	8,0 ± 1,9	-	5,5 ± 0,9	4,2 ± 0,8
		(23,3 ± 2,9)	(18,0 - 2,4)	(17,8 - 2,8)	-	(19,6 - 2,7)	(23,2 - 2,9)	-	(11,2 ± 2,9)	(8,6 - 2,0)
Неидентифицированные	Масляная паста	15,4 ± 2,7	20,0 ± 1,6	19,6 ± 2,5	12,7 ± 2,5	16,4 ± 2,0	13,6 ± 1,4	12,1 ± 1,6	12,3 ± 1,8	11,7 ± 1,5
		(23,7 - 2,4)	(26,4 - 10,6)	(30,7 - 7,7)	(30,2 - 3,1)	(23,9 - 7,9)	(18,5 - 6,8)	(20,3 ± 4,5)	18,7 ± 4,0	(19,9 - 4,5)
	Циклокар	13,4 ± 1,9	14,8 ± 1,6	15,7 ± 2,0	-	15,1 ± 3,2	14,6 ± 1,5	-	12,7 ± 1,6	11,7 ± 1,2
		(23,3 ± 5,1)	(26,0 - 9,8)	(27,3 - 5,4)	-	(40,0 - 5,8)	(19,6 - 5,3)	-	(22,4 - 5,9)	(18,6 - 6,8)
Сумма каротиноидов	Масляная паста	72,9 ± 13,1	91,5 ± 10,9	101,4 ± 14,3	108,3 ± 18,6	132,0 ± 12,1	102,8 ± 12,9	88,6 ± 13,7	84,2 ± 11,4	77,2 ± 13,3
		(118,4 - 26,4)	(131,2 - 31,3)	(162,0 - 17,1)	(222,9 - 22,8)	(196,0 - 72,5)	(179,1 - 50,1)	(186,6 - 29,1)	(148,9 - 35,5)	(170,7 - 27,1)
	Циклокар	76,0 ± 9,8	78,2 ± 6,6	86,1 ± 7,6	-	93,4 ± 8,7	95,9 ± 10,1	-	77,8 ± 5,9	69,1 ± 6,8
		(145,2 - 46,7)	(111,7 - 56,3)	(129,1 - 59,6)	-	(137,5 - 54,7)	(156,6 - 50,5)	-	(110,6 - 56,7)	(109,4 - 47,1)

Концентрация  $\beta$ -каротина (в мкг/дл) в сыворотке крови добровольцев, принимавших различные препараты  $\beta$ -каротина

Препарат каротина	Добровольцы (№ п/п)	Время отбора проб крови								
		-5 сут	0 сут	6 ч	24 ч	30 ч	2 сут	3 сут	4 сут	7 сут
Масляная паста	1	20,1	21,3	25,0	15,8	14,5	24,1	14,0	21,4	17,5
	2	41,0	45,3	42,8	18,4	40,6	33,8	22,2	35,3	27,0
	3	9,3	29,4	57,2	105,8	90,0	77,7	79,4	54,5	57,0
	4	12,4	28,4	32,4	37,6	44,3	34,4	33,0	21,9	26,4
	5	43,3	52,9	57,2	73,1	66,3	39,1	48,3	25,2	22,1
	6	11,2	15,7	15,1	45,6	56,0	40,4	30,7	24,2	14,6
	7	-	5,1	6,7	34,5	44,4	25,3	20,5	20,2	7,2
	8	16,2	24,8	25,1	33,1	57,0	26,3	24,2	25,9	11,9
	9	4,3	11,3	14,4	6,3	18,8	-	13,3	8,9	5,4
	10	-	5,9	2,2	-	-	7,2	5,2	7,5	5,4
Циклокар	<i>M</i>	19,7	24,0	27,8	41,1	48,0	34,2	29,1	24,5	19,4
	$\pm m$	5,2	5,0	6,2	10,4	7,7	6,4	6,8	4,2	4,9
	max	43,3	52,9	57,2	105,8	90,0	77,7	79,4	54,5	57,0
	min	4,3	5,1	2,2	6,3	14,5	7,1	5,2	7,5	5,4
	11	44,0	16,6	29,3	-	41,4	44,0	-	21,7	18,9
	12	11,5	29,0	22,5	-	44,9	57,2	-	27,4	29,8
	13	15,6	13,8	16,3	-	16,9	15,4	-	16,9	16,5
	14	9,1	11,6	16,1	-	16,7	10,7	-	10,5	7,6
	15	12,2	15,4	18,0	-	22,9	19,8	-	17,6	9,3
	16	17,0	23,5	17,5	-	19,2	23,8	-	24,9	13,8
	17	9,9	9,4	14,6	-	15,2	17,6	-	14,9	9,1
	18	23,0	28,4	37,6	-	41,0	33,8	-	29,4	28,0
	19	23,8	16,6	24,0	-	34,0	20,3	-	13,4	15,5
	20	19,2	22,6	26,5	-	28,3	15,5	-	19,1	12,1
	<i>M</i>	18,5	18,7	22,2	-	28,1	26,8	-	19,6	16,1
	$\pm m$	3,3	2,2	2,3	-	3,6	4,6	-	2,0	2,4
	max	44,0	29,0	37,6	-	44,9	57,2	-	29,4	29,8
	min	9,1	9,4	14,6	-	15,2	10,7	-	10,5	7,6

7] и нашими, опубликованными ранее [1], в которых показано, что при адекватной исходной обеспеченности витамином А дополнительный прием  $\beta$ -каротина, повышая его уровень в сыворотке, не ведет к дальнейшему росту концентрации витамина А. Это подчеркивает наличие регулирующих механизмов, ограничивающих превращение  $\beta$ -каротина в ретинол, в связи с чем даже длительный прием повышенных доз  $\beta$ -каротина не способен привести к образованию избыточных количеств витамина А и А-гипервитаминозу.

С помощью ВЭЖХ, кроме  $\beta$ -каротина, нами были идентифицированы следующие основные каротиноиды сыворотки крови — лютеин с зеаксантином, криптоксантин, ликопин,  $\alpha$ -каротин. Содержание этих каротиноидов приведено в табл. 2. Из представленных данных видно, что исходные индивидуальные концентрации  $\beta$ -каротина и основных каротиноидов у добровольцев обеих групп практически не различались и, за

исключением  $\beta$ -каротина, в процессе эксперимента практически не изменялись. Незначительные различия в концентрациях индивидуальных каротиноидов в процессе эксперимента обуславливались, очевидно, естественными вариациями ежедневного рациона добровольцев. Представляло интерес сравнить данные по содержанию основных каротиноидов в крови здорового человека, полученные нами, со сведениями, имеющимися в литературе. Как видно из табл. 5, суммарная концентрация каротиноидов у обследованных нами добровольцев существенно ниже таковой по данным литературы, имеющимся в нашем распоряжении. Это обусловлено в первую очередь значительно более низким (в 2-3 раза) содержанием ликопина, криптоксантина (в 1,5-3,5 раза), а также более низкой (в 2 раза) концентрацией неидентифицированных каротиноидов. Это отличие, по-видимому, может быть объяснено меньшим потреблением овощей и фруктов обследованными нами добровольцами, особенно весной, когда проводилось исследование. В частности, низкое содержание криптоксантина может являться следствием отсутствия в рационе обследованных основных его источников, таких как персики, абрикосы и цитрусовые. Что касается более низкого содержания ликопина в крови, то это отличие могло быть обусловлено низким потреблением в это время года томатов, основных источников ликопина в рационе населе-

Таблица 4

Изменения концентрации  $\beta$ -каротина в сыворотке крови добровольцев при приеме различных препаратов  $\beta$ -каротина ( $M \pm m$ )

Препарат $\beta$ -каротина	Число обследованных	Максимальная концентрация, мкг/дл	Максимальное изменение, мкг/мл	Площадь под кривой, мкг/дл в день
Масляная паста	10	48,0 $\pm$ 7,7	25,5 $\pm$ 8,3	74,0
Циклокар	10	28,1 $\pm$ 3,6	11,6 $\pm$ 3,1	25,5

Сравнение собственных и данных литературы по содержанию каротиноидов в сыворотке крови человека (в мкг/дл)

Каротиноиды	Показатели	Собственные данные		Данные литературы			
		n = 20	n = 18	[5]	[4]	[10]	
				n = 14	n = 30	n = 20	n = 30
Лютеин + зеаксантин	$M \pm \sigma$	19,5 ± 6,3	19,2 ± 8,9	28,4 ± 9,7	24,7 ± 9,2	-	-
	%	23,0	25,8	18,4	21,1	-	-
	Пределы колебаний	11,9 - 40,7	8,6 - 35,1	12,5 - 45,8	-	-	-
Криптоксантин + прекриптоксантин	$M \pm \sigma$	5,5 ± 2,9	6,9 ± 2,8	20,0 ± 19,1	8,5 ± 5,3	15,3 ± 0,6	16,7 ± 1,9
	%	6,4	9,3	12,9	7,3	22,8	25,6
	Пределы колебаний	0 - 12,4	3,3 - 13,8	5,1 - 70,3	-	-	-
Ликопин	$M \pm \sigma$	14,3 ± 12,2	11,0 ± 9,3	39,5 ± 20,9	45,1 ± 17,7	28,5 ± 1,8	37,3 ± 4,7
	%	16,9	14,7	25,5	38,5	42,4	57,1
	Пределы колебаний	0 - 41,0	2,3 - 39,5	10,4 - 80,9	-	-	-
β-Каротин	$M \pm \sigma$	6,9 ± 5,6	7,6 ± 6,4	2,2 ± 1,8	4,3 ± 3,5	3,6 ± 0,4	3,6 ± 0,4
	%	8,1	10,1	1,4	3,7	5,4	5,5
	Пределы колебаний	1,2 - 19,7	1,3 - 23,3	сл. - 6,0	-	-	-
β-Каротин	$M \pm \sigma$	21,4 ± 12,2	19,1 ± 12,0	31,3 ± 14,8	18,3 ± 0,8	19,8 ± 0,8	7,7 ± 0,8
	%	25,2	25,5	20,2	15,7	29,5	11,8
	Пределы колебаний	5,1 - 52,9	4,3 - 44,0	7,6 - 57,9	-	-	-
Нсидентифицированные	$M \pm \sigma$	17,4 ± 5,6	14,3 ± 6,7	33,9 ± 19,8	-	-	-
	%	20,5	19,1	21,9	-	-	-
	Пределы колебаний	9,8 - 26,4	3,4 - 23,7	11,8 - 78,7	-	-	-
Сумма каротиноидов	$M \pm \sigma$	84,8 ± 28,5	74,6 ± 32,8	154,8 ± 46,1	116,8 ± 30,0	-	-
	Пределы колебаний	31,3 - 131,2	26,4 - 145,2	26,4 - 242,5	-	-	-

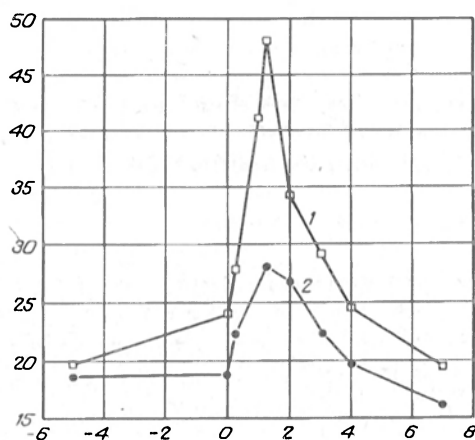
ния России. При этом содержание α- и β-каротинов в среднем было близко к опубликованному в литературе. По нашим данным из всей суммы каротиноидов на долю β-каротина приходится около 26%, α-каротина — 8-10%, ликопина — 15-17%, лютеина с зеаксантином — 23-26% и криптоксантина — 6-9%. Таким образом, за исключением указанных отличий, полученные нами фоновые концентрации основных каротиноидов, как абсолютные, так и относительные, достаточно хорошо совпадают с имеющимися в литературе данными о содержании этих же каротиноидов в крови здорового человека [4, 5].

Для оценки биодоступности β-каротина при его однократном приеме обычно оценивают характер кривых, отражающих изменение концентрации каротина после его приема: скорость

подъема концентрации β-каротина, время достижения и высоту ее максимума, продолжительность его сохранения и скорость снижения. Нами были рассчитаны: 1) абсолютное максимальное увеличение концентрации абсорбции, как разница между максимальным и исходным уровнем, 2) относительное максимальное увеличение (та же разность в процентах от исходного уровня) и 3) площадь под кривой, описывающей изменение концентрации каротина, которая характеризует общее количество всосавшегося каротина, находившегося в сыворотке крови за все время наблюдений.

На рисунке и в табл. 3 показано изменение концентрации β-каротина по обем группам добровольцев в процессе проведения исследования. Максимальная концентрация β-каротина в сыворотке крови лиц, принявших масляный препарат, достигалась через 24-30 ч после его приема, а в группе, принявшей таблетки циклокара, — через 30-48 ч, что соответствует данным литературы [4]. При этом максимальная концентрация β-каротина в 1-й группе составляла в среднем  $48 \pm 7,7$  мкг/дл, а во 2-й группе —  $28,1 \pm 3,6$  мкг/дл.

В табл. 4 представлены данные по максимальной концентрации β-каротина, максимальному абсолютному изменению его концентрации и площади под кривыми соответственно для двух испытуемых препаратов. Максимальный абсолютный прирост концентрации β-каротина составил: для масляного препарата  $25,5 \pm 8,8$  мкг/дл, для циклокара —  $11,6 \pm 3,0$  мкг/дл. Отношение значений инкрементов концентраций (максимального изменения концентраций над базовой линией), соответствующих масляной пасте и водорастворимому препарату, составляет 2,2. Это свидетельствует, что всасывание β-каротина из масляной пасты в кишечнике происходит более



Изменение концентрации β-каротина в сыворотке крови добровольцев, принимавших различные его препараты.

1 — масляная паста, 2 — таблетки циклокара. По оси абсцисс — дни, по оси ординат — концентрация β-каротина, мкг/дл.

чем в 2 раза более эффективно, чем из циклокара. Соотношение площадей под кривыми для этих препаратов составляет 2,4. Большая площадь под кривой, описывающей изменение концентрации каротина после приема масляного препарата, свидетельствует не только о лучшей всасываемости, но и, по-видимому, о более длительном сохранении всосавшегося  $\beta$ -каротина в сыворотке крови при приеме масляного препарата по сравнению с циклокаром. Относительный прирост концентрации  $\beta$ -каротина для масляного препарата составил 106,3%, для циклокара — 62,0%. Эти данные совпадают с литературными, указывающими на значительно лучшее усвоение  $\beta$ -каротина из его масляных препаратов, даже по сравнению с его утилизацией из овощей, богатых  $\beta$ -каротином [4].

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Спиричев В. Б., Левачев М. М., Рымаренко Т. В. и др. // *Вопр. мед. химии*. — 1992. — № 6. — С. 126-131.
2. Якушина Л. М., Бекетова И. А., Бендер Е. Д., Харитончик Л. А. // *Вопр. питания*. — 1993. — № 1. — С. 43-47.
3. Якушина Л. М., Харитончик Л. А., Бендер Е. Д. // *Там же*. — № 3. — С. 51-55.
4. Brown E. D., Micozzi M. S., Graft N. E. et al. // *Amer. J. clin. Nutr.* — 1989. — Vol. 49. — P. 1258-1265.
5. Cavina G., Gallinella B., Porra R., Surachi C. // *J. Pharm. Biomed. Anal.* — 1988. — Vol. 6. — P. 259-269.

6. Goodman D. S. // *Fed. Proc.* — 1979. — Vol. 38. — P. 2501-2503.
7. Krinsky N. I. // *Clin. Nutr.* — 1988. — Vol. 7, N 3. — P. 107-112.
8. Peto R., Doll R., Buckley J. D., Sporn M. B. // *Nature*. — 1981. — Vol. 290. — P. 201-208.
9. Shekelle R. B., Lepper M., Liu S. et al. // *Lancet*. — 1981. — Vol. 2. — P. 1185-1190.
10. Thurnham D. I., Smith E., Flora P. S. // *Clin. Chem.* — 1988. — Vol. 34. — P. 377-381.
11. Willet W. C., Polk B. F., Underwood B. A. et al. // *New Engl. J. Med.* — 1985. — Vol. 310. — P. 430-434.

Поступила 14.09.94

#### STUDY OF BIOAVAILABILITY AND PHARMACODYNAMICS OF VARIOUS FORMS OF ARTIFICIAL $\beta$ -CAROTENE IN VOLUNTEERS

L. M. Yakushina, E. A. Malakhova, T. N. Shkarina, A. A. Poznan-skaya, V. B. Spirichev

Institute of Nutrition, Russian Academy of Medical Sciences, Vitamins Research Production Association, Moscow

The biological availability of artificial  $\beta$ -carotene as a water-soluble versus oily formulation based on cyclodextrin (Cyclocar tablets) was studied on volunteers given a single dose of 25 mg. The concentrations of  $\beta$ -carotene and major carotinoids were measured in the blood serum during the experiment by high performance liquid chromatography. The maximum content of  $\beta$ -carotene in the serum was attained 24-30 and 30-48 hrs after oily formulations and Cyclocar and were  $48.0 \pm 7.7$  and  $28.1 \pm 3.6$  mg/dl, respectively. The rate of  $\beta$ -carotene utilization from Cyclocar was 2.2 times less than that from the oil paste. Besides,  $\beta$ -carotene absorbed from these oily drugs retained in the blood serum for longer period than that from Cyclocar.

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 1995

УДК 616.34-008.337-021.3-053.3-07:616:153:577.161/064

В. М. КОДЕНЦОВА, И. Д. УСПЕНСКАЯ, О. А. ВРЖЕСИНСКАЯ,  
Л. А. ХАРИТОНЧИК, А. А. СОКОЛЬНИКОВ, Л. М. ЯКУШИНА, И. Б. МАКАРОВА,  
В. Б. СПИРИЧЕВ

#### ОСОБЕННОСТИ ОБМЕНА ВИТАМИНОВ ГРУППЫ В И КРИТЕРИИ ОБЕСПЕЧЕННОСТИ ИМИ ДЕТЕЙ, СТРАДАЮЩИХ ЦЕЛИАКИЕЙ

Институт питания РАМН, Москва, НИИ детской гастроэнтерологии, Нижний Новгород

Целиакия, характеризующаяся синдромом нарушенного кишечного всасывания (мальабсорбция), сопровождается развитием дефицита и изменениями обмена многих веществ, включая витамины [13, 14]. Ликвидация витаминной недостаточности является частью комплексного лечения людей, страдающих этим заболеванием. Для коррекции дефицита витаминов необходимо правильно оценивать обеспеченность организма этими нутриентами. Обычно для этих целей используют критерии, принятые для здоровых людей, что не всегда допустимо в связи с возможными особенностями обмена витаминов при том или ином заболевании. В частности, нами были выявлены изменения обмена рибофлавина при инсулинзависимом сахарном диабете, проявляющиеся в его повышенном выведении с мочой, одновременном повышении содержания этого витамина в плазме крови и снижении в эритроцитах по сравнению со здоровыми людьми [7, 8]. Тем самым была показана неприменимость кри-

териев, разработанных применительно к здоровым людям, для оценки обеспеченности витамином В<sub>2</sub> больных диабетом.

В настоящей работе с той же целью был исследован обмен витаминов группы В у детей, страдающих целиакией. Для характеристики обмена витаминов был использован способ, основанный на анализе кривых зависимости экскреции витамина от его содержания в крови [17], позволяющий исключить влияние различной исходной витаминной обеспеченности и выявить особенности обмена, непосредственно обусловленные тем или иным патологическим процессом. Для сравнения были использованы кривые, полученные нами ранее для здоровых взрослых и детей того же возраста [5, 9, 10, 15].

Методика. Обследовано 14 больных детей обоего пола 4, 5-10 лет, поступивших на лечение в НИИ детской гастроэнтерологии. При поступлении у 3 больных диагностировано обострение основного заболевания, а у 11 — фаза неполной

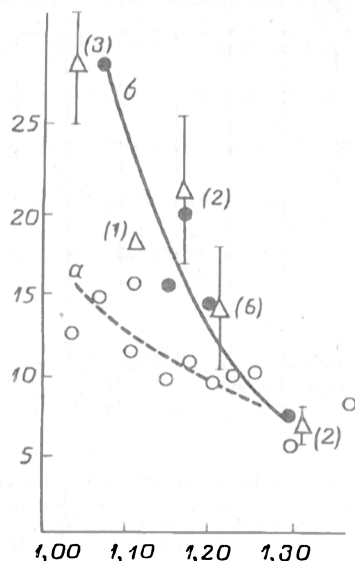


Рис. 1. Зависимость между величиной ТДФ-эффектом (ось абсцисс) и экскрецией тиамин с мочой (в мкг/ч, ось ординат) для здоровых детей (а), здоровых взрослых и детей, страдающих целиакией (б).

Светлые кружки — показатели здоровых детей 5—11 лет, темные — здоровых взрослых, светлые треугольники — детей, страдающих целиакией. Здесь и на рис. 2, 4 в скобках рядом с точкой указано количество обследованных. Пунктир — кривые, полученные нами ранее для здоровых взрослых и детей того же возраста [5, 9, 10, 15].

клинико-лабораторной ремиссии. Признаки полигиповитаминоза (хейлоз, глоссит, ангулярный стоматит, себорейный дерматит, блефарит) выявлены у 9 (64%) обследованных детей. При этом наиболее яркие клинические проявления поливитаминовой недостаточности были у 3 больных с обострением целиакии.

В качестве показателей, характеризующих обмен витаминов, использовали такие параметры, как концентрация в плазме крови, активность витаминзависимых ферментов, а также экскреция продуктов их метаболизма с мочой, собранной за 1 час натощак.

Рибофлавин в моче и плазме крови определяли титрованием рибофлавинсвязывающим апопротеином [9], 1-метилникотинамид (1-МНА) — флуориметрическим методом [6], тиамин — титрометрическим методом [16]. Во всех флуоресцентных методах использовали соответствующий внутренний стандарт. Интенсивность флуоресценции измеряли на спектрофлуориметре "Perkin Elmer MPF-43A". Концентрацию пиридоксальских коферментов (ПАЛ+ПАЛФ) после реакции образования соответствующих гидразонов и 4-пиридоксильную кислоту (4-ПК) в моче измеряли методом ВЭЖК [1, 4].

Активность транскетолазы эритроцитов и величину ТДФ-эффекта в качестве показателей обеспеченности обследуемых тиамином определяли после предварительной инактивации трансаминалазы [15]. Активность глутатионредуктазы эритроцитов и величину ФАД-эффекта определяли методом непрерывной регистрации снижения оптической плотности НАДФН при 340 нм [19]. Активность аспаратаминотрансферазы и

величину ПАЛФ-эффекта определяли после 3-кратного замораживания — оттаивания гемолизатов эритроцитов (1:1) спектрофотометрически в системе, сопряженной с малатдегидрогеназой [4].

Коэффициент ранговой корреляции между содержанием витаминов в крови и экскрецией их с мочой рассчитывали по Спирмену [2]. Уравнения, описывающие зависимости между показателями обеспеченности организма витаминами и активацией глутатионредуктазы эритроцитов ФАД, рассчитывали по методу наименьших квадратов [12] с использованием программы "Quattro".

Результаты и обсуждение. Ранее нами было показано, что между часовой экскрецией тиамин с мочой и величиной ТДФ-эффекта для здоровых взрослых и детей разного возраста существует выраженная корреляция: уменьшение величин ТДФ-эффекта от 1,2 до 1,0, отражающее увеличение степени насыщения транскетолазы коферментом и соответственно организма тиамином, сопровождается резким увеличением выведения этого витамина с мочой (рис. 1) [5]. Как следует из рис. 1, совокупность точек, характеризующих связь между экскрецией тиамин и величиной ТДФ-эффекта, для детей, страдающих целиакией, ложится на кривую, характерную для здоровых взрослых. У здоровых детей приблизительно такой же возрастной группы (5-11 лет) часовая экскреция тиамин заметно снижена по сравнению со взрослыми, особенно в области величины ТДФ-эффекта, соответствующих нормальной обеспеченности организма тиамином. Это означает, что насыщение транскетолазы ТДФ у больных целиакией достигается при значительно более высокой экскреции, а следовательно, и более высоком потреблении тиамин, чем у здоровых детей того же возраста. Это может быть следствием либо увеличенной по сравнению со здоровыми людьми потребностью в этом витамине, либо тем, что насыщение транскетолазы (например, вследствие увеличения сродства к ТДФ) достигается при более низкой концентрации витамина  $B_1$ , что и обуславливает повышенные потери тиамин с мочой. Из 14 обследованных величина ТДФ-эффекта, равная 1,31, была обнаружена лишь у 1 ребенка. Известно, что при некоторых заболеваниях вследствие нарушения синтеза белка (в том числе апофермента транскетолазы в ходе формирования и созревания эритроцитов) и усиления катаболизма белка величина ТДФ-эффекта может оставаться близкой к 1 даже при глубоком дефиците витамина  $B_1$  [16]. В данном случае самые низкие значения ТДФ-эффекта (1,04; 1,00; 1,08) были выявлены у 3 самых тяжелых больных в фазе обострения целиакии, в клинической картине которых на момент обследования преобладали кatabолические процессы. Однако, несмотря на то что уровень общего белка в сыворотке крови у этих детей ( $62 \pm 1$  г/л) был снижен по сравнению с детьми в фазе ремиссии ( $74 \pm 1$  г/л), активность базальной транскетолазы у них в сред-

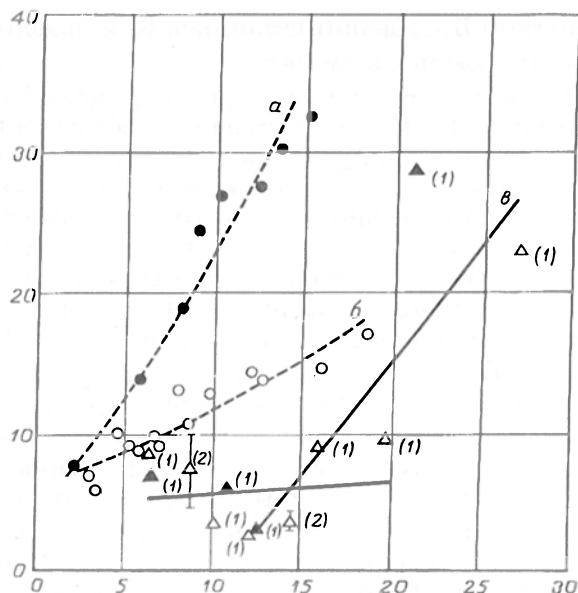


Рис. 2. Зависимость экскреции рибофлавина (в мкг/ч, ось ординат) от его концентрации в плазме крови (в нг/мл, ось абсцисс) для здоровых взрослых (а), здоровых детей (б) и детей, страдающих целиакией (с). Светлые кружки — показатели здоровых детей 5—11 лет, темные — здоровых взрослых, светлые треугольники — показатели детей 5—7 лет, страдающих целиакией, темные — больных детей 8—10 лет.

нем была даже несколько выше ( $36,5 \pm 7,5$  против  $29,5 \pm 1,2$  мкмоль/ч образовавшегося седопентулозо-7-фосфата на 1 мл эритроцитов).

Таким образом, несмотря на небольшое количество обследованных, полученные данные позволяют заключить, что обмен витамина В<sub>1</sub> у больных целиакией детей имеет отличия от такового у здоровых детей и требует дальнейшего изучения. Однако уже сейчас очевидно, что для оценки обеспеченности витамином детей старше 5 лет, страдающих целиакией, необходимо использовать критерии, принятые для здоровых взрослых: адекватной обеспеченности этих детей соответствуют величины ТДФ-эффекта в диапазоне от 1,00 до 1,25, часовая экскреция тиамина — более 14 мкг.

На рис. 2 представлены кривые зависимости часовой экскреции рибофлавина от его концентрации в плазме крови. При одинаковом содержании этого витамина в крови его выведение у больных целиакией детей существенно снижено по сравнению не только со здоровыми взрослыми, но и со здоровыми детьми того же возраста. При этом, как и для здоровых людей, наблюдается выраженная ранговая корреляция между концентрацией рибофлавина в плазме и его часовой экскрецией ( $r=0,445$ ,  $p < 0,05$ ).

В отличие от здоровых детей кривая для больных детей характеризуется наличием двух ветвей: пологой и крутой (см. рис. 2). Через совокупность точек методом наименьших квадратов можно провести 2 прямые. Первый линейный участок, очевидно, отражает ситуацию, когда организм не насыщен витамином В<sub>2</sub> и экскреция слабо зависит от концентрации рибофлавина в

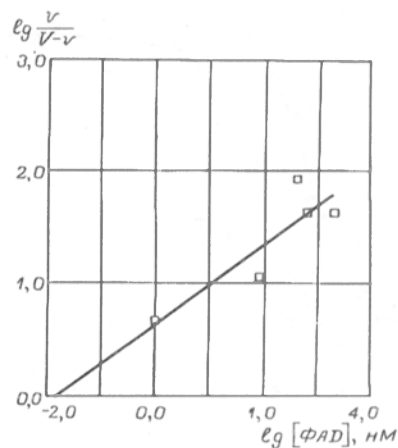


Рис. 3. Зависимость активности глутатионредуктазы гемолізатов эритроцитов страдающих целиакией детей от концентрации ФАД в координатах Хилла.

плазме. Повышение концентрации рибофлавина в плазме до 10–14 нг/мл практически не сопровождается увеличением его экскреции с мочой. Второй участок характеризует состояние, когда организм насыщен витамином В<sub>2</sub>: увеличение концентрации рибофлавина в плазме сопровождается его резким выбросом. Точка пересечения этих прямых ( $x = 14,6$ ,  $y = 6,2$ ), по-видимому, соответствует нижнему пределу адекватной обеспеченности организма витамином В<sub>2</sub>. Таким образом, экскреция рибофлавина, соответствующая нормальной обеспеченности организма детей, страдающих целиакией, составляет 6 мкг/ч, что ниже, чем для здоровых детей 5–7 лет (9 мкг/ч). При этом нижняя граница нормального содержания рибофлавина в плазме крови составила 14 нг/мл, что существенно выше, чем для здоровых людей (5 нг/мл) [5, 9]. Известно, что экскреция рибофлавина регулируется его уровнем в плазме крови [18], в связи с этим сниженная экскреция рибофлавина при повышенном по сравнению со здоровыми детьми его содержания в крови у больных целиакией, по-видимому, может носить адаптационный характер, что обеспечивает при сниженном всасывании нутриентов в кишечнике поддержание рибофлавина в плазме крови на более высоком уровне.

Оценка обеспеченности витамином В<sub>2</sub> больных детей с помощью функционального теста по степени активации глутатионредуктазы эритроцитов экзогенно добавленным ФАД показала, что у всех детей, за исключением 1 ребенка, величина ФАД-эффекта находилась в пределах нормы, не превышая 1,2. Ранее подобная ситуация была обнаружена для больных инсулинзависимым сахарным диабетом детей, у которых сродство этого фермента к ФАД значительно превышало сродство фермента здоровых людей [3, 7]. Исследование зависимости активности фермента от концентрации ФАД в гемолізатах больных целиакией детей в координатах Хилла позволило рассчитать кажущуюся константу активации (рис. 3), которая составила 0,013 нМ, и

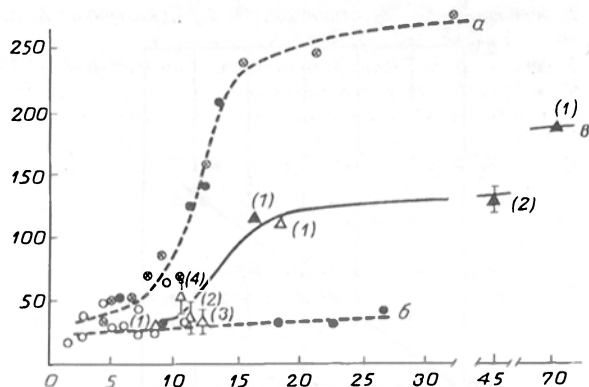


Рис. 4. Зависимость экскреции 4-ПК (в мкг/ч, ось ординат) от концентрации пиридоксальных коферментов в плазме крови (в нг/мл, ось абсцисс) для здоровых взрослых и детей, обеспеченных витамином В<sub>2</sub> (а), с недостаточностью этого витамина (б) и детей, страдающих целиакией (в).

Светлые кружки с крестом — показатели детей, страдающих инсулинзависимым сахарным диабетом. Светлые треугольники — показатели детей, страдающих целиакией, с недостаточной обеспеченностью витамином В<sub>2</sub>, темные — больных детей, нормально обеспеченных витамином В<sub>2</sub>. Темные кружки — показатели здоровых взрослых.

коэффициент Хилла, равный 0,3. Таким образом, кажущееся сродство фермента больных почти в 100 раз превышает таковое у здоровых людей, у которых эта величина составляет 1-2 нМ [3, 7]. По-видимому, именно этим и объясняется то, что практически у всех детей фермент был насыщен коферментом, вследствие чего величина ФАД-эффекта находилась в пределах нормы. Можно предположить, что увеличение сродства глутатионредуктазы к ФАД носит приспособительный характер и отражает изменение свойств самого фермента. Однако, поскольку исследование проводили на гемолизатах, для окончательного ответа целесообразно провести сравнительные исследования на очищенных препаратах глутатионредуктазы, выделенных из эритроцитов здоровых и больных людей.

Таким образом, помимо инсулинзависимого сахарного диабета, обнаружено еще одно заболевание, при котором использовать величины ФАД-эффекта в качестве показателя обеспеченности витамином В<sub>2</sub> оказалось нельзя.

Если принять для детей, больных целиакией, в качестве критерия адекватной обеспеченности витамином В<sub>2</sub> содержание рибофлавина в плазме крови более 14 нг/мл и его часовую экскрецию более 6 мкг, то из 14 детей лишь 4 (29%) обеспечены этим витамином.

Как известно, дефицит витамина В<sub>2</sub> у здоровых людей приводит к существенным нарушениям обмена витаминов В<sub>6</sub> и ниацина, проявляющимся в снижении экскреции конечных продуктов их метаболизма -4-ПК и 1-МНА до уровня, сопоставимого с истинным пищевым дефицитом этих витаминов [4, 5, 7-11]. Таким образом, по экскреции этих продуктов метаболизма различить истинный и вторичный, обусловленный недостаточной обеспеченностью организма

витамином В<sub>2</sub>, дефицит витаминов В<sub>6</sub> и ниацина не представляется возможным.

На рис. 4 представлена кривая зависимости экскреции 4-ПК от суммарного содержания ПАЛ+ПАЛФ в плазме крови для больных целиакией детей (кривая в). Эта кривая вне зависимости от обеспеченности больных детей рибофлавином по характеру воспроизводит полученную нами ранее общую для здоровых и больных инсулинзависимым сахарным диабетом детей и здоровых взрослых, обеспеченных витамином В<sub>2</sub>, кривую (а) [5, 7, 8, 10, 11], однако занимает промежуточное положение между ней и кривой (б) для людей с недостаточностью витамина В<sub>2</sub>. Как нами было показано ранее, часовая экскреция 4-ПК с мочой у обеспеченных витамином В<sub>2</sub> людей увеличивается по мере повышения концентрации пиридоксальных коферментов в плазме крови, при этом наблюдается выраженная ранговая корреляция между этими показателями. При дефиците витамина В<sub>2</sub> эта корреляция не обнаруживалась, экскреция 4-ПК с мочой практически не зависела от концентрации ПАЛ + ПАЛФ в плазме крови (кривая б). Для обследованных больных вне зависимости от обеспеченности рибофлавином обнаруживалась высокая степень ранговой корреляции между содержанием пиридоксальных коферментов и экскрецией конечного продукта метаболизма витамина В<sub>6</sub> с мочой ( $\rho = 0,521, p \leq 0,05$ ). Это может означать, что, подобно глутатионредуктазе эритроцитов, витамин В<sub>2</sub>-зависимые ферменты, участвующие в обмене витамина В<sub>6</sub>, насыщены флавиновыми коферментами. Вместе с тем следует отметить, что верхней части рассматриваемой кривой (в), выходящей на плато, соответствуют в основном показатели людей, обеспеченных витамином В<sub>2</sub>. Концентрация пиридоксальных коферментов в крови этих детей выше, чем у больных с недостаточностью рибофлавина, экскреция 4-ПК с мочой составила  $149 \pm 49$  мкг/ч. Средняя величина часовой экскреции этого метаболита у 10 детей с недостаточностью витамина В<sub>2</sub> составила  $52 \pm 12$  мкг/ч.

Величины ПАЛФ-эффекта у всех детей не превышали 2,2, что в соответствии с установленным критерием [4] свидетельствует о хорошей насыщенности ПАЛФ-зависимой аспартатаминотрансферазы эритроцитов коферментом и согласуется с достаточно высоким содержанием ПАЛ+ПАЛФ в плазме крови у всех обследованных детей.

Средняя по группе больных целиакией детей экскреция 1-МНА составила  $271 \pm 50$  мкг/ч, только у 3 детей его экскреция находилась на уровне, характерном для нормальной обеспеченности ниацином здоровых людей. Поскольку в метаболизме ниацина принимают участие витамин В<sub>2</sub>- и витамин В<sub>6</sub>-зависимые ферменты [11], установить критерии нормальной обеспеченности и выявить особенности обмена ниацина не удалось ввиду небольшого количества обследо-

ванных с нормальной обеспеченностью витамином В<sub>2</sub>.

Таким образом, на основании исследования взаимосвязи между концентрацией витаминов группы В, активностью витаминзависимых ферментов крови и экскрецией их метаболитов с мочой установлены критерии нормальной обеспеченности витаминами В<sub>1</sub> и В<sub>2</sub> для детей, страдающих целиакией. Показатели адекватной обеспеченности больных детей этими витаминами отличаются от соответствующих параметров для здоровых детей того же возраста, в частности нормальная величина ТДФ-эффекта достигается при более высокой экскреции тиамин. В качестве критерия нормальной обеспеченности витамином В<sub>1</sub>, по-видимому, следует принять величину ТДФ-эффекта не более 1,25, часовую экскрецию тиамин более 12 мкг/ч, витамином В<sub>2</sub> — концентрацию рибофлавина в плазме более 14 нг/мл, а его экскрецию с мочой 6 мкг/ч. Хотя ввиду небольшого количества обследованных детей установить критерии обеспеченности витаминами В<sub>6</sub> и ниацином не удалось, обнаружено, что экскреция 4-ПК во всем диапазоне концентраций пиридоксальных коферментов в плазме крови у больных детей существенно снижена по сравнению со здоровыми детьми.

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Бекетова Н. А., Вржесинская О. А., Коденцова В. М. и др. // *Вопр. питания.* — 1992. — № 4. — С. 67-69.
2. Гублер Е. В., Генкин А. А. Применение непараметрических критериев статистики в медико-биологических исследованиях. — Л., 1973.
3. Коденцова В. М., Алексеева И. А., Спиричев В. Б. // *Укр. биохим. журн.* — 1992. — № 4. — С. 105-108.
4. Коденцова В. М., Бекетова Н. А., Рисник В. В. и др. // *Клин. лаб. диагност.* — 1993. — № 6. — С. 22-27.
5. Коденцова В. М., Вржесинская О. А., Денисова С. П. и др. // *Вопр. мед. химии.* — 1993. — № 4. — С. 27-31.
6. Коденцова В. М., Вржесинская О. А., Сокольников А. А. и др. // *Вопр. питания.* — 1992. — № 2. — С. 62-67.
7. Коденцова В. М., Вржесинская О. А., Сокольников А. А. и др. // *Вопр. мед. химии.* — 1993. — № 5 — С. 26-29.

8. Коденцова В. М., Вржесинская О. А., Сокольников А. А. и др. // *Там же.* — С. 33-36.
9. Коденцова В. М., Вржесинская О. А., Спиричев В. Б. // *Там же.* — 1992. — № 1 — С. 22-24.
10. Коденцова В. М., Сокольников А. А., Алексеева И. А. и др. // *Вопр. питания.* — 1994. — № 1-2. — С. 18-21.
11. Коденцова В. М., Якушина Л. М., Вржесинская О. А. и др. // *Там же.* — 1993. — № 5. — С. 32-36.
12. Лакин Г. Ф. Биометрия. — М., 1990. — С. 264-266.
13. Макарова И. Б., Успенская И. Д., Лазарева Т. С. // *Педиатрия.* — 1993. — № 2. — С. 20-22.
14. Основы рационального питания детей / Под ред. К. С. Ладодо, В. Д. Огт, Е. М. Фатесвой. — Киев, — 1987. — С. 220-224.
15. Сокольников А. А., Коденцова В. М., Исаева В. А. // *Вопр. мед. химии.* — 1993. — № 3. — С. 50-53.
16. Теоретические и клинические аспекты науки о питании. — Т. 8. — М., 1987.
17. Horwitt M. K. // *Amer. J. clin. Nutr.* — 1986. — Vol. 44. — P. 973-986.
18. Spector R. // *J. Pharmacol. exp. Ther.* — 1982. — Vol. 221. — P. 394-398.
19. Vuilleumier J. P., Keller H. E., Rettenmaier R., Hunziker F. // *Int. J. Vitam. Nutr. Res.* — 1983. — Vol. 53. — P. 359-370.

Поступила 13.07.94

#### METABOLIC FEATURES OF VITAMINS B AND CRITERIA FOR THEIR PROVISION IN CELIAC CHILDREN

V. M. Kodentsova, I. D. Uspenskaya, O. A. Vrzhesinskaya,  
L. A. Kharitonchik, A. A. Sokolnikov, L. M. Yakushina,  
I. B. Makarova, V. B. Spirichev

Institute of Nutrition, Russian Academy of Medical Sciences,  
Moscow, Research Institute of Pediatric Gastroenterology, Nizhni  
Novgorod

The investigation into the relationship between the concentration of vitamins B, the blood activity of vitamin B-dependent enzymes and the urinary excretion of their metabolites in 14 children of both sexes whose age was 4.5-10 years and who suffered from celiac disease has characterized their metabolic features. The criteria for vitamin B<sub>1</sub> provision of these children differ from those in healthy children of the same age: the normal value of TDP effects is achieved with higher thiamine excretion which is more than 12 µg/h. Apparently, the plasma concentration of riboflavin greater than 14 ng/ml and its urinary excretion 6 µg/h should be taken as a criterion for normal vitamin B<sub>2</sub> provision. Though due to a small proportion of the examined children, criteria for vitamin B<sub>6</sub> and nicotinic acid could not be defined. The excretion of 4-pyridoxalic acid in the whole concentration ranges of pyridoxalic coenzymes in the plasma of sick children was essentially lower than that in healthy persons.

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 1995

УДК 116.153.922-008.61-07:616.155.3-02:547.915]

Г. И. МУЗЯ, Н. С. БОЛЬШАКОВА, И. Ф. ЧЕРНЯДЬЕВА,  
В. В. КУХАРЧУК, В. И. КУЛИКОВ

#### ИНГИБИРОВАНИЕ ОБРАЗОВАНИЯ СУПЕРОКСИДНЫХ РАДИКАЛОВ ЛЕЙКОЦИТАМИ КРОВИ БОЛЬНЫХ С ГИПЕРХОЛЕСТЕРИНЕМИЕЙ ПОД ВЛИЯНИЕМ ЛИПИДНОГО АНТАГОНИСТА ФАКТОРА АКТИВАЦИИ ТРОМБОЦИТОВ

Научно-производственная фирма "Биолипид", Институт клинической кардиологии им. А. Л. Мясникова КНЦ РАМН, Москва

Фосфолипидный фактор активации тромбоцитов (ФАТ), имеющий структуру 1-О-алкил-2-ацетил-sn-глицеро-3-фосфохолина, является высокоактивным биорегулятором, оказывающим влияние на функционирование сердечно-сосудистой системы путем регуляции артериального

давления, функциональной активности миокарда и процессов свертывания крови [1, 8, 15]. Высокая биологическая активность ФАТ обусловлена также и тем, что он является сильным активатором для циркулирующих клеток крови (тромбоциты, нейтрофилы, моноциты, лимфоциты) [8,

11]. ФАТ влияет на структурную организацию липопротеинов плазмы [5], ингибирует этерификацию холестерина в плазме человека [10], а фермент, его расщепляющий — ацетилгидролаза, ассоциирован в плазме с липопротеинами низкой плотности [9]. В связи с этим полагают, что ФАТ может быть вовлечен в патогенез сердечно-сосудистых заболеваний [1, 2, 6, 12]. Однако механизмы развития сердечно-сосудистой патологии, возможно реализуемые с участием ФАТ, в настоящее время не ясны. Одним из возможных механизмов повреждающего действия ФАТ может быть активация окислительных процессов в нейтрофилах, что приводит к образованию активированных форм кислорода [4, 12], способных оказывать повреждающее действие на липопротеины, клетки эндотелия и циркулирующие клетки крови.

Ранее было показано, что синтез ФАТ в лейкоцитах больных с гиперхолестеринемией ПА-типа в ответ на стимуляцию ионофором A23187 существенно повышен по сравнению с лейкоцитами здоровых доноров, а в плазме таких больных отмечен также повышенный уровень лизо-ФАТ [12]. Кроме того, у больных с гиперхолестеринемией наблюдали повышенную активацию окислительного метаболизма в ответ на действие зимозана и хемотаксического пептида FMct-Leu-Phe [12]. В связи с этим можно предполагать, что у больных с гиперхолестеринемией ФАТ может играть важную роль в активации окислительных процессов, опосредуемых нейтрофилами. При выявлении роли ФАТ в каких-либо патологических процессах в последнее время используют антагонисты ФАТ, способные ингибировать эффекты ФАТ путем блокады ФАТ-рецепторов на клетках. Показано, что антагонист ФАТ природного происхождения BN 52021 (гинголид В) [14], а также синтетические зарубежные антагонисты ФАТ RP 59227, WEB 2086 и Ro 19-3704 способны ингибировать образование супероксидных радикалов в изолированных лейкоцитах [13].

В данной работе изучено влияние липидного антагониста ФАТ (1-О-ацил-2-(2'-ацетоксибензоил)-sn-глицеро-3-фосфохолин) на продукцию супероксидных радикалов лейкоцитами больных с гиперхолестеринемией ПА-типа.

**Методика.** Кровь у здоровых доноров и больных с гиперхолестеринемией ПА-типа брали из локтевой вены после 12-15-часового голодания. В качестве антикоагулянта использовали водный раствор цитрата натрия, содержащий глюкозу (20 г двузамещенного цитрата натрия, 30 г глюкозы на 1 л воды). Исследованные больные гиперхолестеринемией имели следующие биохимические показатели: суммарный холестерин 8,3-14,3 ммоль/л, холестерин липопротеинов низкой плотности 6,6-13,0 ммоль/л, холестерин липопротеинов очень низкой плотности 0,68-1,22 ммоль/л, холестерин липопротеинов высокой плотности 0,54-1,0 ммоль/л, триглицериды 1,3-2,3 ммоль/л.

Нейтрофилы крови выделяли путем осаждения эритроцитов крови декстраном Т-500 и последующего центрифугирования суспензии клеток в градиенте фиколла [17]. Продукцию супероксидных радикалов нейтрофилами регистрировали спектрофотометрическим методом путем измерения восстановления цитохрома с при длине волны 550 нм, как описано ранее [4].

В работе использовали цитохром с ("Serva", ФРГ), декстран Т-500 ("Pharmacia", Швеция), супероксиддисмутаза эритроцитов человека ("Ростэпидкомплекс", Ростов-на-Дону), раствор Хенкса без фенолового красного (московское предприятие бактериальных препаратов). ФАТ получен путем гидрирования фосфатидальхолинов сердца быка, щелочного деацилирования и последующего ацетилирования уксусным ангидридом, как описано ранее [6]. Антагонист ФАТ 1-О-ацил-2-(2'-ацетоксибензоил)-sn-глицеро-3-фосфохолин получен путем ацилирования лизофосфатидилхолина хлорангидридом 2-ацетоксибензойной кислоты и очищен методом колоночной хроматографии на силикагеле [3].

**Результаты и обсуждение.** В свежевыделенных лейкоцитах больных с гиперхолестеринемией ПА-типа наблюдается повышенная активация окислительного метаболизма, регистрируемая по способности генерировать супероксидные ( $O_2^{\cdot -}$ ) радикалы. При этом эндогенный уровень образования супероксидных радикалов в лейкоцитах больных с гиперхолестеринемией был на 20-50% выше, чем в лейкоцитах, выделенных из крови здоровых доноров. Известно, что добавление в среду инкубации лейкоцитов крови здоровых доноров в концентрациях  $10^{-7}$  —  $10^{-6}$  М приводит к стимуляции образования супероксидных радикалов лейкоцитами [4, 14]. Однако в случае лейкоцитов больных с гиперхолестеринемией экзогенный ФАТ ( $10^{-7}$  —  $10^{-6}$  М) практически не стимулировал образование супероксидных радикалов. Уровень эндогенной продукции супероксидных радикалов лейкоцитами варьировал у больных с разным уровнем холестерина от 3,1 до 5,5 нмоль  $O_2^{\cdot -}$  /  $10^6$  клеток в час. В связи с этим исследуемые больные были разбиты на 3 группы в зависимости от содержания холестерина в плазме и изучение влияния антагониста ФАТ проводили в каждой группе отдельно (см. таблицу).

Добавление антагониста ФАТ к изолированным лейкоцитам больных с гиперхолестеринемией

**Ингибирование образования супероксидных радикалов в изолированных лейкоцитах крови больных с гиперхолестеринемией под влиянием антагониста ФАТ**

Группа больных	Уровень холестерина, ммоль/л		Степень ингибирования образования супероксидных радикалов, %	
	в плазме	в липопротеинах низкой плотности	+ антагонист ФАТ ( $10^{-5}$ М)	+ антагонист ФАТ ( $10^{-5}$ М) + ФАТ ( $10^{-6}$ М)
1-я	8,3 ± 0,3	6,61 ± 0,3	45,2 ± 2,5	35,5 ± 1,8
2-я	9,67 ± 0,3	8,0 ± 0,2	55,6 ± 3,1	55,6 ± 2,7
3-я	12,7 ± 0,8	11,60 ± 0,7	63,9 ± 3,8	69,4 ± 4,2

мией приводило к значительному ингибированию продукции супероксидных радикалов. Данный эффект наблюдался для лейкоцитов крови всех 3 групп больных. Однако степень ингибирования образования супероксидных радикалов под влиянием антагониста ФАТ отличалась в разных группах и в некоторой степени увеличивалась по мере увеличения содержания холестерина в плазме больных. Предварительная обработка лейкоцитов больных с гиперхолестеринемией антагонистом ФАТ в концентрации  $10^{-5}$  М и последующее добавление ФАТ ( $10^{-6}$  М) в среду не приводит к усилению генерации супероксидных радикалов, устранению ингибирования образования супероксидных радикалов, вызванному антагонистом ФАТ (см. таблицу). Примененный в данной работе антагонист ФАТ ингибировал образование супероксидных радикалов, стимулируемое ФАТ в лейкоцитах крови здоровых доноров [4, 7].

Так как антагонист ФАТ в значительной степени ингибирует эндогенную активацию лейкоцитов больных с гиперхолестеринемией, это может свидетельствовать о том, что эндогенная активация лейкоцитов больных с гиперхолестеринемией в значительной степени является ФАТ-зависимым процессом. Повышенная активация лейкоцитов больных с гиперхолестеринемией ПА-типа в ответ на экзогенные индукторы (зимозан и низкие концентрации —  $5 \cdot 10^{-7}$  М хемотаксического пептида FMet—Leu—Phe) по сравнению с лейкоцитами крови здоровых доноров отмечена в работе [12]. Однако в случае экзогенного ФАТ такой повышенной активации для лейкоцитов больных с гиперхолестеринемией не наблюдается. В связи с этим следует отметить, что в работе [12] исследуемые больные характеризовались относительно умеренным содержанием холестерина в плазме ( $8,3 \pm 0,3$  ммоль/л), тогда как в данном исследовании, помимо такой группы больных, были изучены больные и с более высоким уровнем холестерина в плазме. Повидимому, отсутствие стимуляции образования супероксидных радикалов под влиянием ФАТ в лейкоцитах больных с гиперхолестеринемией может быть связано с тем, что, как показано ранее [12], лейкоциты больных гиперхолестеринемией способны продуцировать ФАТ в большей степени, чем лейкоциты здоровых доноров, и продуцируемый лейкоцитами больных с гиперхолестеринемией ФАТ является для них эндогенным стимулом, активирующим окислительный метаболизм, который в свою очередь способен ингибировать антагонист ФАТ, примененный в данной работе. Помимо ФАТ, другими возможными индукторами образования супероксидных радикалов в лейкоцитах больных с гиперхолестеринемией могут быть его близкие структурные аналоги — ацильный аналог ФАТ (1-О-ацил-2-ацетил-sn-глицеро-3-фосфохолин) и плазмалогенный аналог ФАТ (1-О-алк-1'-енил-2-ацетил-sn-глицеро-3-фосфохолин), которые способны стимулировать образование супероксидных радикалов в лейкоцитах [4], синтезируются лейкоци-

тами наряду с ФАТ [7], а ацильный аналог ФАТ, кроме того, идентифицирован в плазме человека [16]. В то же время, судя по тому, антагонист ФАТ не полностью ингибирует образование супероксидных радикалов в лейкоцитах больных с гиперхолестеринемией, можно предполагать, что, кроме ФАТ, в активации лейкоцитов участвуют еще какие-то индукторы, не связанные с ФАТ или его аналогами.

Полученные в настоящей работе данные свидетельствуют о причастности ФАТ или ФАТ-подобных соединений к активации окислительного метаболизма в лейкоцитах больных с гиперхолестеринемией, а также демонстрируют потенциальную возможность антагониста ФАТ влиять на образование активированных форм кислорода в лейкоцитах человека.

## ЛИТЕРАТУРА

1. Ворновицкий Е. Г., Игнатъева В. Б., Голлаш М. и др. // Бюл. exper. биол. — 1989. — № 1. — С. 27-30.
2. Ворновицкий Е. Г., Игнатъева В. Г., Голлаш М. и др. // Там же. — № 8. — С. 137-139.
3. Кузнецова Т. И., Липовец В. И., Куликов В. И. // Конференция "Современные направления развития биотехнологии": Тезисы докладов. — М., 1991. — С. 60.
4. Кузнецова Т. И., Куликов В. И. // Биохимия. — 1992. — Т. 57, № 1. — С. 16-20.
5. Куликов В. И., Маневич Е. М., Музы Г. И., Бергельсон Л. Д. // Федерация Европейских биохимических об-в. Конф.: Тезисы. — М., 1984. — С. 222.
6. Куликов В. И., Музы Г. И., Бергельсон Л. Д. // Биохимия. — 1984. — Т. 49, № 9. — С. 1449-1455.
7. Куликов В. И., Музы Г. И. // Там же. — 1992. — Т. 57, № 6. — С. 803-816.
8. Лакин К. М., Куликов В. И., Маневич Е. М. и др. // Фармакол. и токсикол. — 1988. — № 4. — С. 113-123.
9. Музы Г. И., Куликов В. И. // Биохимия. — 1991. — Т. 56, № 6. — С. 1140-1144.
10. Bergelson L. D., Kulikov V. I., Muzya G. I. // FEBS Lett. — 1987. — Vol. 190, N 2. — P. 305-306.
11. Braquet P., Touqui L., Shen T. Y., Vargaftig B. B. // Pharmacol. Rev. — 1987. — Vol. 39, N 2. — P. 97-145.
12. Croft K. D., Beilin L. J., Vardongen R. et al. // Atherosclerosis. — 1990. — Vol. 83. — P. 101-109.
13. Floch A., Tahraoui L., Sedivy P., Caverio I. // J. Pharmacol. exp. Ther. — 1991. — Vol. 258, N 2. — P. 567-575.
14. Foldes-Filep E., Braquet P., Filep J. // Biochem. biophys. Res. Commun. — 1987. — Vol. 148, N 3. — P. 1412-1417.
15. Koltai M., Tosaki A. // Cardiovasc. Drug Rev. — 1989. — Vol. 7. — P. 177-198.
16. Silliman C. C., Johnson G. W. // Lipids. — 1993. — Vol. 28, N 5. — P. 415-418.
17. Rajkovic I. A., Williams R. // J. immunol. Meth. — 1985. — Vol. 78. — P. 35-47.

Поступила 31.03.94

## INHIBITION OF SUPEROXIDE RADICAL PRODUCTION BY A PLATELET-ACTIVATING FACTOR ANTAGONIST IN THE LEUKOCYTES FROM HYPERCHOLESTEROLEMIC PATIENTS

G. I. Muzya, N. S. Bolshakova, I. F. Chernyadyeva, V. V. Kukhar-chuk, V. I. Kulikov

Biolipid Research Production Firm, Moscow; A. L. Myasnikov Institute of Clinical Cardiology, Cardiology Research Center, Russian Academy of Medical Sciences, Moscow

A platelet-activating factor (PAF) antagonist was found to inhibit superoxide production in the leukocytes of patients with type IIA hypercholesterolemia. PAF ( $10^{-7}$ — $10^{-6}$  M) alone failed to stimulate superoxide production in intact or PAF-antagonist-treat-

П. П. ГОЛИКОВ, Г. В. ПАХОМОВА, Л. Ф. ТВЕРИТНЕВА, Н. Ю. НИКОЛАЕВА

## ИЗМЕНЕНИЕ ГЛЮКОКОРТИКОИДСВЯЗЫВАЮЩЕЙ ФУНКЦИИ ТРАНСКОРТИНА ПРИ ОСТРЫХ ГАСТРОДУОДЕНАЛЬНЫХ КРОВОТЕЧЕНИЯХ

НИИ скорой помощи им. Н. В. Склифосовского, Москва

Кортикостероидсвязывающий глобулин (транскортин) является специфическим транспортным белком для кортизола крови [14]. При стрессе уровень транскортина снижается [1]. Острое воспаление также приводит к угнетению глюкокортикоидсвязывающей способности транскортина, хотя и не сопровождается модификацией сродства или изменением электрофоретических свойств транскортина [10]. Снижение концентрации транскортина усиливает иммунодепрессивное действие кортизола на продукцию поликлональных иммуноглобулинов моноклеларами периферической крови [6].

Механизм снижения уровня транскортина в крови обусловлен тем, что при воспалении и сепсисе гранулоциты усиливают биосинтез эластазы, которая расщепляет этот глобулин [10]. Представляют интерес данные о том, что уровень транскортина может быть прогностическим фактором в оценке тяжести течения заболевания у больных с септическим шоком [12].

Целью данной работы явилось изучение глюкокортикоидсвязывающей функции транскортина сыворотки крови у больных с желудочно-кишечными кровотечениями.

Методика. Изучение физико-химических свойств транскортина проведено у 31 больного с язвенной болезнью желудка (10) и двенадцатиперстной кишки (21), осложненной кровотечением. Возраст больных колебался с 21 года до 80 лет и в среднем составлял  $47 \pm 2,1$  года. В соответствии с классификацией А. И. Горбашко [4], у больных в основном была кровопотеря средней степени. Оперативное лечение проведено у 7 из 10 больных язвенной болезнью желудка и у 3 из 21 больного язвенной болезнью двенадцатиперстной кишки.

Всем больным в зависимости от степени кровопотери проводилось комплексное медикаментозное лечение, включающее трансфузионную терапию, направленную на коррекцию развивающейся гиповолемии, анемии, нарушений белкового и водно-электролитного обмена. Для устранения анемии и гипопротсинемии использовали кровь, эритромассу, плазму крови и 10-20% раствор альбумина.

В качестве дезагрегантной терапии внутривенно вводили реополиглюкин в смеси с глюкозой. По показаниям проводили сеансы гипербарической оксигенации, курсы лечения иммуномодуля-

торами, направленную противоязвенную терапию, включающую сеансы эзофагогастродуоденоскопии с облучением язвы гелий-неоновым лазером.

Физико-химические параметры транскортина сыворотки крови определяли по ранее опубликованной методике [3]. С целью удаления эндогенных глюкокортикоидов из сыворотки последнюю обрабатывали суспензией угля (3, 75%) в декстране-80 (0, 375%) при 37°C в течение 15 мин. Уголь со связавшимся стероидом отделяли центрифугированием при 3000 g в течение 10 мин. Надосадочную жидкость разводили в 50 раз буфером, содержащим 10 mM трис-HCl, 1,5 mM ЭДТА, 0,5 mM дитиотрейтола pH 7,4, и использовали для определения физико-химических параметров транскортина. При этом в пробирки вносили по 100 мкл разбавленной сыворотки, меченый кортизол (от 0,06 до  $1,0 \cdot 10^{-8}$  M) в 100 мкл основного буфера. Для выявления неспецифического связывания в пробирки вносили 200-кратный молярный избыток немеченого кортизола в 100 мкл буфера. В пробирки, не содержащие немеченый гормон, вносили по 100 мкл буфера для восполнения объема. Пробы инкубировали при 0-2°C в течение 15 мин и суспензией угля (100 мкл) удаляли не связанный с сывороткой кортизол. Уровень связывания меченого кортизола сывороткой определяли с помощью спектрометра Марк-III (США). Число мест связывания кортизола на специфическом глобулине, константы ассоциации ( $K_d$ ) и диссоциации ( $K_d$ ) рассчитывали с помощью построения графика Скэтчарда [11]. Концентрацию белка определяли по методу Лоури [8]. Содержание кортизола и инсулина в плазме определяли с помощью радиоиммунологических кит-наборов (Франция).

Результаты и обсуждение. Проведенные исследования показали (см. таблицу и рисунок), что абсолютное число мест связывания кортизола кортикостероидсвязывающего глобулина сыворотки крови больных на 1-е и 3-и сутки после кровотечения достоверно снижалось. В последующие сроки наблюдалось увеличение числа мест связывания, и на 14-е сутки после кровотечения оно было в 1,4 раза больше, чем в контроле. Относительное число мест связывания кортизола кортикостероидсвязывающего глобулина сыворотки крови больных во все сроки наблюдения было значительно больше, чем в

**Физико-химические параметры глюкокортикоидсвязывающей функции транскортина и содержание кортизола и инсулина в сыворотке крови больных с острыми гастродуоденальными кровотечениями**

День исследования больных после кровотечения	Число мест связывания кортизола кортикостероидсвязывающего глобулина		$K_a, \cdot 10^{-9} \text{ M}^{-1}$	$K_d, \cdot 10^{-9} \text{ M}$	Кортизол, нмоль/л	Инсулин, мкЕД/мл	Кортизол/инсулин
	абсолютное, $\cdot 10^{-9} \text{ M}$	относительное, $\cdot 10^{-12}$ моль на 1 мг белка					
Контроль	$2,13 \pm 0,04$	$1,20 \pm 0,02$	$0,66 \pm 0,03$	$1,50 \pm 0,07$	$292 \pm 19$	$20,0 \pm 1,5$	14,6
1-й	$1,96 \pm 0,14$	$1,46 \pm 0,08^*$	$0,46 \pm 0,01^*$	$2,17 \pm 0,06^*$	$470 \pm 40^*$	$18,4 \pm 1,8$	25,5
3-й	$1,84 \pm 0,13^*$	$1,46 \pm 0,08^*$	$0,44 \pm 0,02^*$	$2,39 \pm 0,12^*$	$511 \pm 52^*$	$20,7 \pm 2,9$	24,7
7-й	$2,38 \pm 0,02^*$	$1,69 \pm 0,15^*$	$0,38 \pm 0,02^*$	$2,63 \pm 0,13^*$	$493 \pm 30^*$	$17,0 \pm 2,2$	29,0
14-й	$3,02 \pm 0,20^*$	$2,10 \pm 0,13^*$	$0,28 \pm 0,02^*$	$3,57 \pm 0,20^*$	$479 \pm 15^*$	$14,0 \pm 1,9^*$	34,2

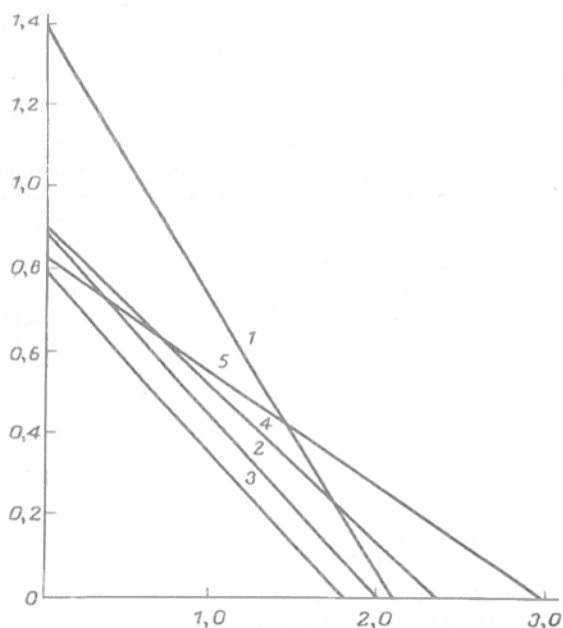
Примечание. Звездочка — достоверность различий по сравнению с контролем ( $p < 0,05$ ).

контроле. При этом на 14-е сутки после кровотечения их уровень превышал соответствующий контроль в 1,7 раза. Из этих данных можно было сделать вывод о повышении специфической функции кортикостероидсвязывающего глобулина у больных с язвенной болезнью, осложненной кровотечением. Однако анализ данных, характеризующих аффинитет кортикостероидсвязывающего глобулина, свидетельствует об обратном. Так, уже на 1-е сутки состоявшейся кровопотери  $K_a$  кортизол — транскортин была в 1,4 раза, на 3-и сутки — в 1,5 раза, на 7-е сутки — в 1,8 раза, на 14-е сутки — в 2,4 раза ниже по сравнению с контролем.  $K_d$  комплекса кортизол — глобулин соответственно была увеличена. Таким образом, полученные данные свидетельствуют о том, что у больных с желудочно-кишечными кровотечениями кортизолсвязывающий глобулин характеризуется повышением связывания с лигандом и

резким снижением специфической ассоциативной способности. Уровень кортизола в крови этих больных на протяжении всех сроков наблюдения был существенно повышен. Хотя абсолютные значения уровня инсулина в крови во все сроки наблюдения, исключая 14-е сутки, существенно не изменялись, коэффициент кортизол/инсулин был резко увеличен, что указывает на значительное преобладание катаболических процессов у больных с желудочно-кишечными кровотечениями.

Авторы многочисленных публикаций, посвященных изучению уровня кортикостероидсвязывающего глобулина при различных заболеваниях, как правило, сообщают лишь о числе мест связывания кортизола этого глобулина и не касаются вопроса о состоянии аффинитета кортикостероидсвязывающего глобулина. Как показали наши исследования, именно  $K_a$  и  $K_d$  претерпевают наиболее выраженные изменения. При этом резко возрастает способность кортикостероидсвязывающего глобулина транспортировать кортизол в ткани. Согласно исследованиям ряда авторов [7, 9], при воспалении гранулоциты усиливают биосинтез эластазы, которая способна расщеплять кортикостероидсвязывающий глобулин в единственном месте, близком к его карбоксильному концу. Это уменьшает молекулярный размер специфического глобулина на 5 кДа с последующим выделением более 80% связанного с кортикостероидсвязывающим глобулином кортизола. Поскольку в крови присутствует избыток ингибитора  $A_1$ -протеиназы, которая инактивирует эластазу, то вряд ли расщепление специфического глобулина эластазой происходит в общем кровотоке. Однако этот механизм возможен в местах воспаления, где продукция свободных радикалов кислорода эффективно окисляет метионин в активных центрах ингибитора  $A_1$ -протеиназы и уничтожает его способность ингибировать эластазу, продуцированную активированными нейтрофилами [5, 7].

При язвенной болезни, осложненной кровотечением, в желудке или двенадцатиперстной кишке интенсивно развивается воспалительный процесс, и снижение числа мест связывания кортизола кортикостероидсвязывающего глобулина вполне возможно объяснить согласно приведенному механизму. Однако некоторое снижение



Анализ Скэтчарда специфического связывания  $^3\text{H}$ -кортизола транскортином плазмы крови больных с гастродуоденальными кровотечениями.

1 — контроль (доноры); больные с гастродуоденальным кровотечением; 2 — 1-е сутки; 3 — 3-и сутки; 4 — 7-е сутки; 5 — 14-е сутки.  
По оси абсцисс — связанный транскортином кортизол, нМ; по оси ординат — отношение связанного транскортином кортизола к свободному.

абсолютного числа мест связывания глобулина обнаружено у больных с желудочно-кишечными кровотечениями только на 3-й день после кровотечения, а позже отмечено значительное их увеличение, хотя воспалительный процесс в желудке и двенадцатиперстной кишке не закончился. Очевидно, что при острой кровопотере повышение связывающей способности кортикостероид-связывающего глобулина и снижение  $K_d$  достигается модулирующим действием эндогенных биологически активных веществ. Так, под влиянием ненасыщенных жирных кислот существенно снижается  $K_d$  глюкокортикоидных рецепторов II типа [13]. Более того, под влиянием производных пиразолона многократно возрастает число мест связывания кортикостерона транскортинподобных глюкокортикоидных рецепторов III типа, наиболее близких по структуре кортикостероид-связывающему глобулину [2]. Несомненно, что повышение кортизолсвязывающей способности специфического глобулина и снижение  $K_d$  носит компенсаторный характер, так как позволяет обеспечить транспорт глюкокортикоидов к тканям и препятствует выведению свободного кортизола из организма, что способствует реализации его метаболического эффекта.

Вместе с тем снижение аффинитета транскортина к кортизолу приводит к тому, что диссоциация комплекса транскортин — кортизол резко повышается, что приводит к усилению иммунодепрессивного эффекта кортизола у этих больных. Повышение коэффициента кортизол/инсулин при желудочно-кишечном кровотечении свидетельствует о преобладании процессов катаболизма и нуждается в коррекции, которая может быть эффективна при назначении адекватных доз инсулина.

С целью нормализации аффинности транскортина к кортизолу больным с желудочно-кишечными кровотечениями следует назначать препараты, повышающие связывающую способность транскортина и не изменяющие аффинность транскортина к кортизолу. К числу таких препаратов относятся производные пиразолонового ряда. Однако, возможность применения производных пиразолона у больных с желудочно-кишечным кровотечением нуждается в специальных исследованиях.

1. Голиков П. П. Рецепторные механизмы глюкокортикоидного эффекта. — М., 1988.
2. Голиков П. П., Кладиев А. А., Николаева Н. Ю. // Вестн. АМН СССР. — 1989. — № 7. — С. 20-28.
3. Голиков П. П., Николаева Н. Ю., Кладиев А. А. // Пат. физиол. — 1989. — № 4. — С. 19-22.
4. Горбашко А. И. Диагностика и лечение кровопотери. — Л., 1982.
5. Carrell R. W., Jeppson J. O., Laurell C. B. // Nature. — 1982. — Vol. 298. — P. 329-334.
6. Faict D., Ceuppens J. L., De Moor P. // J. Steroid Biochem. — 1985. — Vol. 23. — P. 553-555.
7. Hammond G. I., Smith C. L. // J. clin. Endocr. Metab. — 1990. — Vol. 71. — P. 34-39.
8. Lowry O. H., Rosebrough N. J., Farr A. L., Randall R. J. // J. biol. Chem. — 1951. — Vol. 193. — P. 265-275.
9. Pemberton P. A., Stein P. E. // Nature. — 1988. — Vol. 336. — P. 257-258.
10. Savu L., Lombart Ch., Nunez E. // FEBS Lett. — 1980. — Vol. 113. — P. 102-106.
11. Scatchard T. // Ann. N. Y. Acad. Sci. — 1949. — Vol. 51. — P. 660-665.
12. Sprung C. L., Caralis P. V., Murcial E. H. // New Engl. J. Med. — 1984. — Vol. 311. — P. 1137-1143.
13. Valette G., Vanet A., Sumide Ch., Nunez E. // Endocrinology. — 1991. — Vol. 129. — P. 1363-1369.
14. Westphal U. Steroid-Protein Interactions. — New York. 1971.

Поступила 29.12.93

#### CHANGES IN THE GLUCOCORTICOID-BINDING FUNCTION OF TRANSCORTIN IN ACUTE GASTRODUODENAL HEMORRHAGES

P. P. Golikov, G. V. Pakhomova, L. F. Tveritneva, N. Yu. Nikolayeva

N.V.Sklifosovsky Research Institute of Emergency Care, Moscow

The glucocorticoid-binding function of transcortin was studied in the blood serum of 31 patients with gastroduodenal ulcer complicated by moderate hemorrhage. The patients received a routine multimodality therapy. Sixteen donors serves as a control. Labelled cortisole was used to determine the time course of specific glucocorticoid saturation of transcortin. The Scatchard analysis defined the number of specific transcortin binding sites, the association and dissociation constants of cortisole-transcortin complexes. The blood levels of cortisole and insulin were measured using test kits (France). In patients with hemorrhage-complicated ulcer, the cortisole binding sites to transcortin substantially increased in number on days 7 to 14, and on the contrary, the association constant decreased. The serum content of endogenous cortisole significantly rose, starting from day 1 to day 14 of the onset of hemorrhage. Insulin levels significantly decreased only on days 14 of bleeding. In posthemorrhagic patients, the cortisole/insulin index drastically elevated and remained high within 14 days. A role of serum transcortin functional changes in patients with hemorrhage-complicated ulcerous disease in metabolic and immunogenetic processes.

### Н. А. ГОЛУБКИНА, М. Д. АЛИЕВ, Н. Е. КУШЛИНСКИЙ СЕЛЕН В СЫВОРОТКЕ КРОВИ И В ОПУХОЛИ У БОЛЬНЫХ С ДОБРОКАЧЕСТВЕННЫМИ И ЗЛОКАЧЕСТВЕННЫМИ НОВООБРАЗОВАНИЯМИ КОСТЕЙ

Институт питания РАМН, Онкологический научный центр им. Н. Н. Блохина РАМН, Москва

Один из важнейших антиоксидантов организма селен принимает участие в ряде метаболических процессов, связанных с канцерогенезом:

снижает величину перекисного окисления липидов клеток [4], изменяет соотношение простагландин/тромбоксан в биосинтезе простагланди-

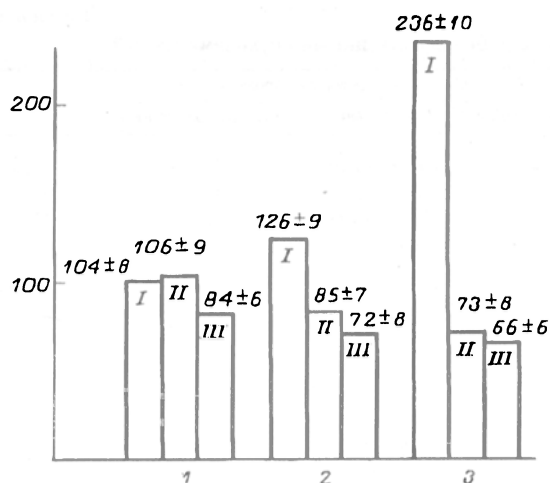


Рис. 1. Содержание селена в различных отделах бедренной кости и тканях, прилегающих к ней (мышцы, связки, хрящи).

I — ткань, соседняя с костью, II — надкостница, III — камбиальный слой. По оси абсцисс: 1 — эпифиз, 2 — метафиз, 3 — диафиз; по оси ординат — содержание селена, мкг/кг.

нов [5], способствует сохранению нормального митохондриального кальциевого транспорта [11], проявляет антимуtagenный эффект [12]. Эпидемиологические исследования показали, что недостаток селена в организме увеличивает риск возникновения и развития целого ряда онкологических заболеваний [9]. Многочисленные исследования содержания селена в организме больных с онкологическими заболеваниями до сих пор практически не затрагивали различные морфологические варианты опухолей костей, упоминание о которых приводится лишь в одной работе [7].

Предлагаемая работа является попыткой оценить информативность показателей уровня селена в опухолях и сыворотке крови у лиц с доброкачественными и злокачественными новообразованиями костей.

**Методика.** Содержание селена определяли в сыворотке крови и образцах костей, взятых при биопсии или резекции у больных злокачественными ( $n = 49$ ) и доброкачественными ( $n = 15$ ) опухолями костей, лечившихся в Онкологическом научном центре РАМН в 1990–1992 гг. Контрольную группу составили 46 жителей Москвы в возрасте от 20 до 49 лет (средний возраст 38 лет, 23 мужчины и 23 женщины). Образцы нормальной кости получены в патологоанатомическом отделении клинической больницы № 32 г. Москвы от лиц, умерших от инфаркта миокарда ( $n = 3$ ) и травмы ( $n = 1$ ) (средний возраст 47 лет).

Концентрацию селена в биологических тканях и жидкостях исследовали микрофлюориметрическим методом [3]. В каждой серии определений использовали референс-стандарты: лиофилизованную сыворотку крови, 72 мкг Se/л, № 23-KT ("Nippan", Осло) и лиофилизованное мясо, 394 мкг Se/кг (Сельскохозяйственный центр Финляндии). Результаты определений хорошо совпадали с регламентированными значениями.

**Результаты и обсуждение.** Ввиду ограниченности сведений о содержании селена в костях явилось необходимым изучение распределения селена по различным отделам кости, не содержащей опухолевых компонентов. На примере образцов бедренных костей нами было установлено, что средняя концентрация микроэлемента составляет всего 81 мкг/кг, что значительно ниже величины, указанной в литературе (420 мкг/кг [8]). Кроме того, было показано, что уровень селена в надкостнице выше, чем в камбиальном слое, причем участки кости по мере уменьшения содержания селена располагаются в следующей последовательности: эпифиз, метафиз и диафиз (рис. 1). Обратная картина наблюдается для тканей, прилегающих к кости: максимальное значение уровня селена отмечено в образцах тканей (мышцы, связки) около диафиза и минимальное — около эпифиза, где концентрации селена предельно близки в хряще, надкостнице и камбиальном слое. Накопление селена в эпифизарной и метафизарной частях трубчатой кости хорошо коррелирует с известным фактом активного участия селена в окислительно-восстановительных процессах растущей ткани [1].

В здоровом организме содержание селена в различных тканях пропорционально уровню микроэлемента в сыворотке крови [4] и зависит от величины поступления селена с продуктами питания. Нами было установлено, что среднее содержание селена в сыворотке крови жителей Москвы составляет  $109 \pm 15$  мкг/л, что несколько ниже рекомендованной величины, соответствующей оптимальной обеспеченности организма селеном — 120 мкг/л [6]. Полученные результаты показывают, что в норме в организме человека соотношение селена кости к селену сыворотки крови равно 0,74.

При онкологических заболеваниях часто наблюдают накопление селена в опухоли и снижение его уровня в сыворотке крови [4]. Данные, полученные нами при исследовании больных с доброкачественными и злокачественными опухолями костей, представлены в табл. 1 и 2. Поскольку среди других онкологических заболеваний опухоли костей составляют небольшую и в то же время наименее изученную долю, целесообразным представлялось включить в таблицы также результаты единичных наблюдений.

**Доброкачественные опухоли.** Для доброкачественных опухолей костей характерно значительное многократное различие в уровне селена в опухолях в зависимости от формы патологии. Так, при среднем уровне селена 265 мкг/кг максимальные значения (до 600 мкг/кг) отмечены в гигантоклеточной опухоли. Содержание селена в опухоли при фиброзной дисплазии превышает норму в 3,5 раза, аневризмальной костной кисте — в 2,9 раза, хондробластоме — в 2,2 раза, а в костно-хрящевом экзостозе, губчатой остеоме и при посттравматическом асептическом некрозе практически не отличается от нормального уровня (см. табл. 1). Значительные различия наблюдались также в концентрации селена сыворотки

Таблица 1

## Содержание селена в опухоли и сыворотке крови у больных с доброкачественными опухолями костей

Диагноз	Возраст, годы	Se в опухоли, мкг/кг		Se в сыворотке крови, мкг/л		K
		$M \pm m (n)$	пределы колебаний	$M \pm m (n)$	пределы колебаний	
Гигантоклеточная опухоль	21	457 $\pm$ 15 (4)	327-661	90 $\pm$ 19 (8)	57-111	5,1
Фиброзная дисплазия	20	287 (1)	-	96 $\pm$ 22 (2)	74-109	2,6
Аневризмальная костная киста	30	231 (1)	-	90 $\pm$ 5 (2)	85-95	2,4
Хондробластома	20	176 (1)	-	77 (1)	-	2,3
Костно-хрящевой экзостоз	16	115 (1)	-	-	-	
Посттравматический асептический некроз	32	59 (1)	-	74 (1)	-	0,8
Губчатая остеома	17	59 (1)	-	-	-	
Адамантинома	33	-	-	69 $\pm$ 6 (2)	63-75	
Остеохондрома	32	-	-	74 (1)	-	
Периостальная реакция неясной этиологии	16	-	-	82 (1)	-	
Среднее...		276 $\pm$ 171	(10)	85 $\pm$ 16	(18)	

Примечание. Здесь и в табл. 2  $K = \text{Se опухоли} / \text{Se сыворотки}$ .

Таблица 2

## Содержание селена в опухоли и сыворотке крови у больных со злокачественными опухолями костей

Диагноз	Возраст, годы	Se в опухоли, мкг/кг		Se в сыворотке крови, мкг/л		K
		$M \pm m (n)$	пределы колебаний	$M \pm m (n)$	пределы колебаний	
Лимфобластная лимфосаркома	28	581 (1)	-	58 (1)	-	10,0
Злокачественная фиброзная гистиоцитома	45	538 (1)	-	71 $\pm$ 6 (4)	65-80	7,5
Ретикулосаркома	25	325 (1)	-	111 (1)	-	2,9
Метастаз светло-коричневого рака*	43	226 (1)	-	83 (1)	-	2,7
Остеогенная саркома:						
у больных моложе 20 лет	16	195 $\pm$ 2 (3)	193-197	72 $\pm$ 10 (12)	55-81	2,6
у больных старше 20 лет	30	201 $\pm$ 53 (9)	132-295	76 $\pm$ 7 (14)	62-86	
Хондросаркома	40	200 $\pm$ 1 (2)	199-201	77 $\pm$ 7 (3)	74-84	2,3
Саркома Юинга	19	188 (1)	-	73 $\pm$ 8 (5)	61-83	2,6
Гематосаркома	21	-	-	91 (1)	-	
Веретенноклеточная саркома	18	-	-	77 (1)	-	
Круглоклеточная саркома	18	-	-	77 $\pm$ 3 (2)	77-84	
Миеломная болезнь с поражением грудино-ключичного сочленения	53	-	-	81 (1)	-	
Среднее...		245 $\pm$ 115 ( $n = 19$ )		77 $\pm$ 8 ( $n = 46$ )		

\* Вторичная опухоль.

крови как при отдельном виде опухоли, так и при разных ее гистологических вариантах. Максимальное соотношение Se кости/Se сыворотки отмечено в случае гигантоклеточной опухоли (более 5), минимальное — при посттравматическом асептическом некрозе (0,8). Соотношение между содержанием селена в опухолях и в сыворотке крови при доброкачественных опухолях костей проявляется в коэффициенте корреляции +0,687 ( $n = 8$ ).

**Злокачественные опухоли.** Злокачественные опухоли характеризуются средним снижением уровня селена в сыворотке крови до 71% и увеличением уровня селена в опухолевой костной ткани до 300%. В табл. 2 приведены уровни селена по отдельным нозологическим формам. Как видно из этих данных, во всех случаях патологии наблюдаются высокие содержания микроэлемента в опухолевых образцах и лишь умеренная за-

висимость этого показателя от гистологического варианта саркомы. В тканях саркомы Юинга, хондросаркомы и остеогенной саркомы концентрация селена превышает норму в 2,3-2,5 раза. Рекордно высокие концентрации зарегистрированы в одном случае злокачественной фиброзной гистиоцитомы (538 мкг/кг — 664%) и в одном случае лимфобластной лимфосаркомы (581 мкг/кг — 718%), а также в одном случае ретикулосаркомы (325 мкг/кг — 400%). Уровень селена в сыворотке крови соответствующих больных оказался монотонно понижен и, по-видимому, представляет весьма стабильный параметр, т. е. можно предположить какой-то гомеостатический путь защиты от интенсивного накопления селена опухолевыми клетками (коэффициент корреляции Se сыворотки/Se кости составил +0,035,  $n = 16$ ). Нормальный уровень селена в сыворотке крови отмечен только у больного с ретикулосаркомой.

Влияние физио- и химиотерапии на содержание селена в сыворотке крови больных с опухолями костей

Характеристика терапевтического воздействия	Диагноз	Возраст, годы	Пол	Содержание Se, мкг/л		P
				до лечения	после лечения	
Инфузия нативной костномозговой взвеси	Остеогенная саркома	16	Ж.	55	72	1,31
	Злокачественная фиброзная гистiocитoма	43	М.	65	84	1,29
Фарморубицин СД 150 мг/м <sup>2</sup>	Саркома Юинга	25	М.	83	83	1,00
	Злокачественная фиброзная гистiocитoма	43	М.	80	85	1,06
Платидиам СД 200 мг/м <sup>2</sup>	Остеогенная саркома	20	Ж.	78	86	1,18±
		43	М.	60	68	0,09
		49	М.	75	98	
Химиотерапия по схеме САР	Остеогенная саркома	17	Ж.	81	97	1,20
Адриабластин СД 150 мг/м <sup>2</sup>						
Циклофосфан СД 1200 мг						
Винкристин СД 4,5 мг + лучевая терапия						
СОД 13,2 Гр	Саркома Юинга	16	М.	87	57	0,66
СОД 45 Гр	Ретикулосаркома	25	М.	111	91	0,82

Примечание.  $P = \text{Se после лечения} / \text{Se до лечения}$ .

В одном случае гематосаркомы наблюдался также относительно высокий уровень селена в сыворотке крови (83% от нормы).

Наиболее распространенной формой злокачественных новообразований костей является остеогенная саркома. При этом виде патологии уровень селена в сыворотке крови не различался у мужчин и женщин, не зависел от размеров опухоли, наличия или отсутствия метастазов и проявлял тенденцию к снижению с увеличением времени проявления генерализации опухоли. Представленная на рис. 2 зависимость содержания селена в сыворотке крови от возраста свидетельствует о существовании максимума концентрации селена в сыворотке крови, приходящегося на возраст около 30 лет. В норме этот показатель возрастает в пубертатном периоде, достигает максимума к 18-19 годам и снижается только после 60-70 лет [10]. Наблюдаемая закономерность изменения уровня селена сыворотки при остеогенной саркоме сходна с возрастной зависимостью, найденной ранее для частоты выявления рецепторов андрогенов и эстрогенов при этой патологии [2], и указывает на возможность существования взаимосвязи уровня

селена сыворотки с секрецией половых гормонов в организме.

В заключение приводим результаты попытки оценить влияние вида неадекватной терапии у 10 пациентов с опухолями костей на уровень селена сыворотки (табл. 3). Наиболее заметен +Se-эффект от трансфузии аллогенной костномозговой взвеси, химиотерапии по схеме САР и от внутриартериального введения платидиам СД 200 мг. Лучевая терапия, напротив, оказывает четкий -Se-эффект.

Таким образом, в целом накопление селена в злокачественных опухолях костей и уровень селена в сыворотке крови оказываются связаны косвенно и подчиняются разным биологическим гомеостатическим механизмам.

Авторы благодарят д-ра Алфтан и д-ра Кумпулайнена (Национальный институт здравоохранения, Сельскохозяйственный центр Финляндии) за предоставление образцов сравнения, а также канд. мед. наук Я. А. Соколова (Антидопинговый центр, Москва) за критические замечания при обсуждении работы.

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Авцын А. И., Жаворонков А. А., Риш М. А. и др. // Микроэлементы человека. — М., 1991. — С. 218.
2. Кушлинский Н. Е., Соловьев Ю. И., Амирасланов А. Т. и др. // Вестн. онкол. науч. центра. — 1993. — № 2. — С. 31-37.
3. Alfthan G. // *Analyt. chim. Acta.* — 1984. — Vol. 165. — P. 187-194.
4. Combs G. F., Combs S. B. // *The Role of Selenium in Nutrition.* — New York, 1986. — P. 179-199.
5. Levander O. A., Morris V. C., Mutanen M. // *Fed. Proc.* — 1985. — Vol. 44. — P. 1670-1683.
6. National Research Council. *Recommended Dietary Allowances.* — 10-th Ed. — Washington, 1989.
7. Salonen J. T., Alfthan G., Huttunen J. K. et al. // *Amer. J. Epidemiol.* — 1984. — Vol. 120, N 3. — P. 342-349.
8. Schroeder H. E., Frost D. V., Balassa J. J. // *J. chron. Dis.* — 1979. — Vol. 23. — P. 227.
9. Tamura Y., Yoshioka K., Mori F. et al. // *Biomed. Res. Trace. Elem.* — 1992. — Vol. 3, N 2. — P. 201-202.

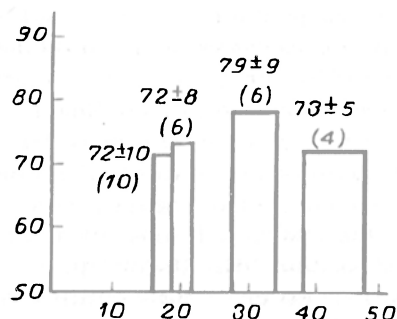


Рис. 2. Содержание селена в сыворотке крови больных остеогенной саркомой в разных возрастных группах.

По оси абсцисс — возраст, годы; по оси ординат — содержание селена, мкг/л.

10. *Verlinden M., Van Sprundel M., Van der Auwera J. C. et al. // Biol. Trace Elem. Res. — 1983. — Vol. 5. — P. 103-105.*
11. *Zhao J., Jia X., Wang Y. et al. // Shengwu Huaxue Zazhi. — 1993. — Vol. 9, N 1. — P. 19-25. (Chem. Abstr. — Vol. 118. — Ref. 190531).*
12. *Zhi K., Ma G., Zhang T. et al. // Hejishu. — 1993. — Vol. 16, N 2. — P. 107-110. (Chem. Abstr. — Vol. 119. — Ref. 92538).*

Поступила 13.07.94

# SERUM AND TUMOR SELENIUM IN PATIENTS WITH BENIGN AND MALIGNANT BONE TUMORS

*N. A. Golubkina, M. D. Aliyev, N. Ye. Kushlinsky*

Institute of Nutrition, Russian Academy of Medical Sciences, Moscow; N. N. Blokhin Cancer Research Center, Russian Academy of Medical Sciences, Moscow

The content of selenium in the serum and bones was compared in persons having no neoplasms and in patients with malignant and benign bone tumors. The mean level of selenium in the healthy femoral bone was 81 µg/kg, with more predominant accumulation in the epiphysis than in the metaphysis and diaphysis and with higher concentrations in the periosteum than in the cambial layer. The normal mean bone/serum selenium ratio was 0.74. This index varied 0.8 to 5.1 in patients with benign tumors and 2.3 to 10.0 in those with malignant tumors. Benign tumors were characterized by significant multiple variations of tumor selenium levels depending on the type of an abnormality with maximally observed values in giant-cell tumor. In patients with various osteosarcomas, the mean selenium content was decreased to 71% in the serum and increased up to 300% in the tumor. The examination of the impact of the type of non-adjuvant therapy on serum selenium levels in patients with bone tumors indicated a negative selenium effect in the application of radiation therapy and a positive selenium effect in the transfusion of bone marrow suspension and in the use of platidium or SAR-regimen therapy.

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 1995

УДК 616.36-036.12-07:616.153.1

Б. Н. МАТЮШИН, А. С. ЛОГИНОВ, Г. Н. ЯКИМЧУК, В. Д. ТКАЧЕВ

## АКТИВНОСТЬ АНТИОКСИДАНТНЫХ ФЕРМЕНТОВ КРОВИ ПРИ ХРОНИЧЕСКИХ ПОРАЖЕНИЯХ ПЕЧЕНИ

ЦНИИ гастроэнтерологии, Москва

По современным представлениям, важное место в развитии патологии, в том числе хронических поражений печени, отводится активным формам кислорода (АФК) [1, 4, 6]. Под АФК понимают продукты его восстановления (супероксиданион —  $O_2^-$ , перекись водорода —  $H_2O_2$  и гидроксильный радикал —  $HO^\bullet$ ), образующиеся преимущественно в дыхательной цепи переноса электронов и протонов. Считается, что АФК проявляют цитотоксическое действие через инициацию свободнорадикального окисления фосфолипидов мембран, что связано с воспалительным-некротическим процессом и развитием синдрома цитолиза, которым придается существенное значение в молекулярных механизмах повреждения клетки. Показано подавление в клетках печени активности супероксиддисмутазы (СОД, КФ 1.15.1.1) и каталазы (КФ 1.11.1.6), утилизирующих  $O_2^-$  и  $H_2O_2$  при поражении гепатобилиарной системы [2]. Учитывая нередко проявляющийся системный характер заболеваний печени (особенно вирусной и аутоиммунной этиологии), полагаем, что клиническое значение может иметь оценка функционального состояния антиоксидантных ферментов крови при гепатобилиарной патологии. С одной стороны, генерация АФК фагоцитарными клетками выполняет защитную роль, с другой — АФК вызывают гемолиз эритроцитов, превращение гемоглобина в метгемоглобин, а сам гемоглобин может выступать в качестве катализатора при образовании  $HO^\bullet$ . Предполагается, что эффективное применение гепатотропных препаратов с мембраностабилизирующей активностью возможно лишь на основе их антиоксидантных свойств и учета состо-

яния механизмов регуляции реакций свободно-радикального окисления.

Целью данной работы явилось изучение состояния ферментов антиоксидантного действия в плазме и эритроцитах крови больных хроническими заболеваниями печени в условиях фармакотерапии.

**Методика.** Кровь больных хроническими заболеваниями печени брали из вены утром натощак. Для отделения плазмы кровь центрифугировали. Эритроцитную массу разводили охлажденной дистиллированной водой (1:10) для того, чтобы вызвать гемолиз. Гемоглобин осаждали центрифугированием при 20 000 g 30 мин и 4°C после добавления хлороформа и этанола [9]. Аналогичным образом обрабатывали плазму. Активность СОД определяли по скорости окисления пирогаллола, а за единицу активности принимали количество фермента, необходимого для 50% ингибирования в расчете на 1 мл эритроцитов или плазмы [11]. Активность глутатионпероксидазы (ГП, КФ 1.11.1.9) регистрировали по уменьшению концентрации глутатиона с использованием  $H_2O_2$  в качестве субстрата [7]. За единицу активности ГП принимали количество микромолей восстановленного глутатиона, окисленного в 1 мин, на 1 мл эритроцитов. Содержание восстановленного глутатиона определяли по его конъюгации с диитионитробензойной кислотой и выражали в микромолях на 1 мл эритроцитов [5]. Оксидазную активность церулоплазмينا (КФ 1.16.3.1) исследовали с p-фенилендиамином как субстратом [10].

Диагноз	Число обследованных	СОД	ГП	Глутатион восстановленный
Контроль	11	189 $\pm$ 7,1	2,41 $\pm$ 0,142	2,20 $\pm$ 0,133
Жировая дистрофия печени	11	203 $\pm$ 4,0	2,20 $\pm$ 0,305	1,72 $\pm$ 0,162*
Хронический активный гепатит	12	187 $\pm$ 4,6	2,06 $\pm$ 0,203	1,52 $\pm$ 0,124***
Хронический персистирующий гепатит	12	238 $\pm$ 6,74*	2,06 $\pm$ 0,345	2,25 $\pm$ 0,327
Хронический холестатический гепатит	5	229 $\pm$ 0,94*	2,17 $\pm$ 0,126	2,31 $\pm$ 0,249
Цирроз печени неактивной вирусной этиологии	10	178 $\pm$ 4,1**	3,44 $\pm$ 0,431*	1,80 $\pm$ 0,164*
Цирроз печени активной вирусной этиологии	9	236 $\pm$ 1,74*	2,48 $\pm$ 0,358	1,20 $\pm$ 0,1124*
Первичный билиарный цирроз	9	245 $\pm$ 7,54*	1,94 $\pm$ 0,168	1,83 $\pm$ 0,426

Примечание. Одна звездочка —  $p < 0,05$ , две звездочки —  $p < 0,02$ , три звездочки —  $p < 0,01$ , четыре звездочки —  $p < 0,001$ .

В стационаре обследовано 79 человек в возрасте от 18 до 67 лет. Хронические гепатиты и циррозы печени имели преимущественно вирусную этиологию. В большинстве случаев диагноз был подтвержден с помощью пункционной биопсии. Продолжительность лечения составляла в среднем 4 нсд, на протяжении которых больные получали медикаментозное лечение, включающее один или сочетание ряда препаратов (эссенциале, карсил, преднизолон, нуклеинат натрия, колхицин и витамины). Показатели активности СОД, ГП, а также содержание глутатиона и церулоплазмينا определяли в динамике фармакотерапии в сопоставлении с клинико-биохимическими проявлениями заболевания. Статистическую обработку полученных результатов проводили параметрическим методом с применением критерия Стьюдента. Выполнялось также построение вариационных рядов (при  $n \geq 50$ ) с последующим анализом гистограмм распределения изученных показателей.

Результаты и обсуждение. Супероксиддисмутазная активность эритроцитов больных с гепатобилиарной патологией была, как правило, увеличена (см. таблицу). Более высокая активность СОД отмечена у больных первичным билиарным циррозом (ПБЦ) и циррозом печени активной формы, что может быть следствием

компенсаторного повышения уровня инактивации  $O_2^-$  при его гепатоцеллюлярной недостаточности. Для СОД эритроцитов установлены также асимметрический характер распределения на гистограмме и наличие двух максимумов активности фермента, что свидетельствует о неоднородности значений СОД при патологии печени (рис. 1, б). Активность ГП эритроцитов была увеличенной при неактивном циррозе печени, а при хронических гепатитах и ПБЦ выявлена тенденция к ее снижению. Содержание восстановленного глутатиона эритроцитов больных хроническими заболеваниями печени было в основном снижено. Более низкая концентрация глутатиона выявлена при циррозе печени активной формы. Снижение содержания глутатиона обнаружено также при хроническом активном гепатите (ХАГ) и жировой дистрофии печени, что указывает на его истощение как кофермента, инактивирующего свободные радикалы и АФК в частности, на ранних стадиях хронического процесса.

В плазме крови обнаружено уменьшение дисмутазной активности при циррозах печени в среднем на 25%. Оксидазная активность церулоплазмينا, напротив, была увеличенной у больных ХАГ (на 18% при  $p < 0,05$ ), хроническим персистирующим гепатитом (на 30,2% при  $p < 0,05$ ) и активным циррозом печени (на 39,8% при  $p < 0,001$ ). Более высокая активность церулоплазмينا установлена при холестатическом гепатите (увеличение на 77,5% при  $p < 0,01$ ) и ПБЦ (увеличение на 96,6% при  $p < 0,001$ ). При сопоставлении супероксиддисмутазной и оксидазной активности церулоплазмينا установлен обратный характер связи между активностью СОД и содержанием церулоплазмينا плазмы крови больных с холестатическим поражением печени. Снижение метаболической активности СОД в плазме крови, а также в клетках печени больных [2] способствует, вероятно, индукции радикальных процессов на уровне генерации АФК и вызывает повреждение мембранных структур гепатоцита. В этой связи клиническое значение имеет оценка состояния антиоксидантных ферментов крови в динамике при медикаментозном лечении.

Оценка динамики показателей активности антиоксидантной защиты крови проведена путем сопоставления гистограмм распределения изученных показателей до и после лечения. Уста-

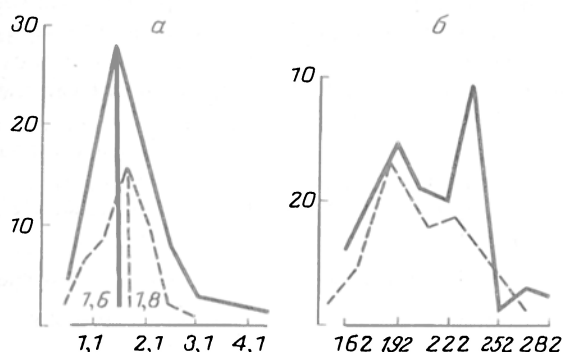


Рис. 1. Гистограмма распределения содержания глутатиона (а) и активности СОД (б) эритроцитов крови до и после медикаментозного лечения больных с хроническими поражениями печени.

По оси абсцисс — значения классовых вариантов содержания глутатиона (в мкмоль/мл) и активности СОД (в ед/мл); по оси ординат — число случаев. Здесь и на рис. 2 сплошная линия — распределение показателей до лечения, пунктирная — после лечения.

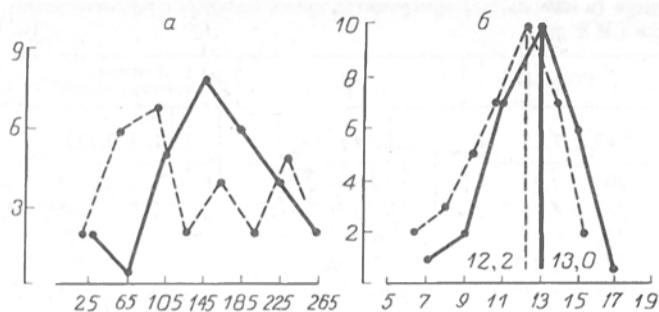


Рис. 2. Гистограмма распределения активности ГП (а) и СОД (б) плазмы крови до и после медикаментозного лечения больных с хроническими поражениями печени.

По оси абсцисс — значения классовых вариант активности фермента (в ед/мл); по оси ординат — число случаев.

новлено снижение активности СОД эритроцитов и сохранение двух максимумов фермента, а также увеличение содержания глутатиона и церулоплазмينا, что указывает на позитивные изменения функционального состояния антиоксидантных энзимов в целом и способствует, вероятно, стабилизации радикальных процессов (см. рис. 1, а и б). Вместе с тем при активном хроническом процессе (ХАГ) обычно выявлялось увеличение активности СОД эритроцитов (2-я неделя лечения), что обусловлено скорее всего усилением продукции АФК фагоцитарными клетками и проявлением противовоспалительных свойств СОД [3]. В дальнейшем (примерно через месяц) дисмутазная активность больных ХАГ снижалась и клинически соответствовала ремиссии заболевания.

По данным гистограммы установлено снижение дисмутазной активности плазмы, что связано, вероятно, с уменьшением секреции гепатоцеллюлярной СОД и выраженности радикальных процессов в условиях фармакотерапии (рис. 2, б). Существенные изменения при лечении выявлены для ГП плазмы. Глутатионпероксидазная активность в целом снижалась (рис. 2, а). Однако динамика пероксидазной активности была неоднозначной, что нашло отражение в виде трех вариантов значений ГП: с уменьшением активности (наибольшее число случаев), без изменения и с увеличением активности ГП. Различия в пероксидазной реакции связаны, вероятно, с особенностями течения патологического процесса и проявлением эффективности препарата на уровне регуляции механизмов антиоксидантной защиты.

Выявлены особенности в динамике активности антиоксидантных энзимов крови в зависимости от нозологической формы. При жировой дистрофии печени чаще, чем при других поражениях, наблюдалось снижение активности СОД, ГП крови и увеличение содержания глутатиона эритроцитов. Положительные изменения были менее выражены при активных формах хронического процесса. Только в 11% случаев отмечено снижение активности СОД плазмы и в 44% — СОД и ГП эритроцитов при циррозе печени активной формы, что указывает на ограниченный

эффект гепатотропных препаратов в регуляции радикальных процессов.

Результаты исследования свидетельствуют об увеличении супероксиддисмутазной активности эритроцитов при хронических поражениях печени, что может иметь компенсаторное значение в условиях гепатоцеллюлярной недостаточности уровня инактивации  $O_2^-$  [2] и указывает на неоднородный характер изменений в крови и печени энзимных механизмов регуляции свободнорадикальных процессов. При циррозах уменьшается активность СОД плазмы, как и в паренхиме печени. Увеличение активности СОД эритроцитов при циррозах и независимость фагоцитарных клесток от СОД плазмы создают предпосылки для усиления генерации АФК в крови и проявления их цитотоксического действия. Данные сопоставления активности антиоксидантных ферментов крови с клинико-биохимическими показателями указывают на то, что особенности состояния энзимов антиоксидантной защиты отражают развитие хронического процесса на уровне регуляции реакций свободнорадикального окисления и могут служить метаболическим критерием эффективности медикаментозного лечения.

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Логинов А. С., Матюшин Б. Н. // Вестн. Рос. АМН. — 1994. — № 5. — С. 3-7.
2. Матюшин Б. Н., Логинов А. С., Ткачев В. Д. // Пат. физиол. — 1992. — № 2. — С. 41-42.
3. Побережкина И. Б., Осинская Л. Ф. // Укр. биохим. журн. — 1989. — № 2. — С. 14-27.
4. Свободные радикалы в живых системах / Владимиров Ю. А., Азизова О. А., Деев А. И. и др. (Итоги науки и техники. Биофизика. Т. 29). — М., 1991.
5. Bauman P. F., Smith T. K., Bray T. M. // Can. J. Physiol. Pharmacol. — 1988. — Vol. 66. — P. 1048-1052.
6. Cross C. E. // Ann. intern. Med. — 1987. — Vol. 107. — P. 526-546.
7. Hafeman D. C., Sunde R. A., Hoekstra W. C. // J. Nutr. — 1974. — Vol. 104. — P. 580-587.
8. Sadrzaden S. M. H., Graf E., Panter S. S. et al. // J. biol. Chem. — 1984. — Vol. 259. — P. 14354.
9. Sun Y. I., Oberley L. W., Ying L. I. // Clin. Chem. — 1988. — Vol. 34. — P. 497-500.
10. Sunderman F. W., Nomoto J. R. // Ibid. — 1970. — Vol. 16. — P. 903-911.
11. Violi F., Juliano L., Alessandri C. et al. // Scand. J. clin. Lab. Invest. — 1985. — Vol. 45. — P. 713-716.

Поступила 27.09.94

#### ACTIVITY OF BLOOD ANTIOXIDATIVE ENZYMES IN CHRONIC HEPATIC LESIONS

B. N. Matyushin, A. S. Loginov, G. N. Yakimchuk, V. D. Tkachev

Central Research Institute of Gastroenterology, Moscow

Patients with chronic hepatic disease have higher superoxide dismutase (SOD) activity and lower erythrocytic glutathione levels. There was a decrease in plasma SOD activity in cirrhosis, a feedback between the dismutase and oxidase activities of ceruloplasmin in cholestatic damages to the liver. Drug therapy resulted in positive dynamics in the levels of SOD, glutathione peroxidase, glutathione, ceruloplasmin, which is likely to be associated with the control of the enzymatic mechanisms of antioxidative protection. It is suggested that the enhanced erythrocytic SOD activity in hepatic diseases might trigger free radical oxidation.

В. И. ТЕЛЬНОВ, Г. В. ЖУНТОВА

# МОЧЕВАЯ КИСЛОТА СЫВОРОТКИ КРОВИ И РАСПРОСТРАНЕННОСТЬ ГИПЕРУРИКЕМИИ У ОБЛУЧЕННЫХ ЛЮДЕЙ, СВЯЗЬ С РАДИАЦИОННЫМИ И НЕРАДИАЦИОННЫМИ ФАКТОРАМИ

Филиал № 1 Института биофизики Минздравмедпрома России, Озерск, Челябинская область

Содержание мочевой кислоты (МК) в крови является одним из основных показателей состояния пуринового обмена и ряда врожденных и приобретенных заболеваний у человека. В связи с этим определение уровня МК, как и некоторых других обменных показателей, наряду с клиническими задачами широко используется в эпидемиологических исследованиях для характеристики состояния здоровья популяции [6, 15]. Большое внимание при этом уделяется выявлению факторов различной природы, влияющих на уровень МК. Однако до настоящего времени вопрос о характере воздействия ионизирующего излучения на пуриновый обмен человека остается практически неизученным. О возможности неблагоприятного влияния радиации на обмен пуринов за счет нарушения различных его звеньев свидетельствуют результаты ряда экспериментальных наблюдений [2, 10, 13]. Ранее нами было выявлено повышение уровня МК у людей, подвергавшихся хроническому внешнему гамма-облучению в значительных дозах, превышавших 4,0 Гр [4].

Исходя из вышесказанного, целью настоящего исследования явилась оценка содержания МК в сыворотке крови и распространенности гиперурикемии (ГУ), а также сравнительная характеристика вклада радиации и комплекса нерадикационных факторов в их изменения у большого контингента людей, облученных в широком диапазоне доз.

**Методика.** Обследовано 1002 работника предприятий атомной промышленности (672 мужчины и 330 женщин) в возрасте от 36 до 72 лет, подвергшихся 18-40 лет назад хроническому внешнему и внутреннему радиационному воздействию. В возрасте до 40 лет было 2,9%, от 40 до 49 лет — 13,5%, от 50 до 59 лет — 44,4% и старше 59 лет — 39,2% лиц. Суммарные дозы внешнего гамма-облучения колебались от 0,01 до 7,6 Гр, составляя менее 0,51 Гр у 29,6%, от 0,51 до 1,00 Гр у 14,9%, 1,01 — 2,00 Гр у 18,3%,

2,01 — 4,00 Гр у 26,4% и более 4,00 Гр у 10,8% лиц. Инкорпорация плутония-239 в организме обнаружена у 729 обследованных лиц, из них в 26,7% случаев превышала допустимое содержание. В зависимости от уровней радиационного воздействия обследованные были подразделены на 2 группы. Основную группу составили 763 человека (502 мужчины и 261 женщина), у которых уровни радиационного воздействия превосходили допустимые значения, в частности дозы внешнего гамма-облучения, полученные за год, превышали 0,05 Гр или(и) инкорпорация плутония-239 была выше 1,48 кБк [3]. Группу сравнения составили 239 человек (170 мужчин и 69 женщин), уровни радиационного воздействия у которых не выходили за рамки допустимых пределов. При этом суммарные дозы внешнего гамма-облучения у них были менее 0,46 Гр.

У обследованных лиц в сыворотке крови, взятой натощак, определяли содержание МК по методу [16]. С помощью электрофореза в ПААГ проводили определение типа гаптоглобина (Нр) [8]. ГУ выделяли на основе собственных верхних границ нормы для МК: более 480 мкмоль/л у мужчин и более 420 мкмоль/л у женщин. Оценивали связь уровня МК и случаев ГУ с 14 факторами: 2 радиационными и 12 нерадикационными, из них биологическими — возрастом, полом, индексом массы тела (ИМТ), определяемым как отношение массы тела (в кг) к квадрату роста (в м), и типом Нр; рядом соматических заболеваний — ишемической болезнью сердца (ИБС), церебральным атеросклерозом (ЦАС), гипертонической болезнью (ГБ) или симптоматической гипертензией (СГ), сахарным диабетом (СД), заболеваниями печени, почек и суставов. Включение перечисленных нерадикационных факторов в исследование проводили исходя из данных литературы об их возможной связи с показателями пуринового обмена [5, 7, 14]. Обследование у выделенного контингента лиц выполняли при отсутствии острых или обострения хроничес-

Таблица 1

Уровни МК (в мкмоль/л) и распространенность ГУ (в %) у обследованных людей

Показатель	Группа сравнения			Основная группа		
	мужчины	женщины	оба пола	мужчины	женщины	оба пола
	170	69	239	502	261	763
МК	312 ± 7,5	271 ± 9,8	300 ± 6,3	341 ± 4,8*	300 ± 7,0*	327 ± 4,0*
	110 — 520	100 — 540	100 — 540	80 — 780	100 — 970	80 — 970
ГУ	3,5	4,3	3,8	8,2*	10,0**	8,8*

Примечание. В числителе — средняя арифметическая с ее ошибкой, в знаменателе — пределы колебаний. Звездочка —  $p < 0,05-0,001$ , две звездочки —  $p < 0,01$  (по отношению к группе сравнения).

Коэффициенты парной корреляции между показателями пуринового обмена, радиационным и нерадикационным факторами

Показатели и факторы	Показатели и факторы										
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
1. МК	1,0										
2. ГУ	0,586*	1,0									
3. Доза гамма-облучения	0,104*	0,100*	1,0								
4. Возраст	0,051	0,095*	0,121*	1,0							
5. Пол	0,161*	-0,056	-0,031	-0,220*	1,0						
6. ИМТ	0,210*	0,197*	-0,003	0,170*	-0,258*	1,0					
7. Тип Нр	0,072*	0,072*	0,047	0,059	-0,063	0,053	1,0				
8. ИБС	0,130*	0,088*	0,057	0,337*	0,096*	0,123*	0,036	1,0			
9. ЦАС	0,017	0,114*	0,115*	0,647*	-0,267*	0,167*	0,011	0,179*	1,0		
10. ГБ	0,139*	0,094*	0,039	0,082*	-0,021	0,170*	0,043	0,062	0,093*	1,0	
11. СГ	0,071*	0,036	-0,027	0,075*	-0,030	0,096*	0,012	-0,007	0,094*	-	1,0

Примечание. Звездочкой отмечены достоверные коэффициенты корреляции ( $p < 0,05-0,001$ ); анализ связи СГ с МК и ГУ проводили отдельно от ГБ.

ких заболеваний. Оценку зависимости уровня МК и частоты ГУ от названных факторов осуществляли с помощью корреляционно-регрессионного анализа по программе SAS. При этом для качественных признаков были приняты следующие градации — ГУ: 0 — нет, 1 — есть; пол: 1 — женский, 2 — мужской; ИБС, ЦАС, ГБ, СГ, СД, заболевания печени, почек или суставов: 1 — нет, 2 — есть; тип Нр: 1 — типы 2-1 и 2-2, 2 — тип 1-1.

**Результаты и обсуждение.** Из табл. 1 следует, что уровни МК и распространенность ГУ у персобируемых людей были достоверно выше, чем в группе сравнения. Это повышение отмечалось как у мужчин, так и у женщин. В обеих группах содержание МК у мужчин было выше, чем у женщин, что хорошо согласуется с данными литературы [7]. В целом полученные результаты указывают на связь повышения уровня МК и распространенности ГУ у лиц основной группы с радиационным воздействием. Для уточнения зависимости показателей пуринового обмена от внешнего или внутреннего радиационного воздействия и определения вклада облучения и нерадикационных факторов в их изменения у объединенного контингента людей проведен многофакторный анализ.

В результате оценки коэффициентов парной корреляции были выявлены факторы, которые имели достоверную связь с содержанием МК и ГУ (табл. 2). При этом уровень МК обнаружил положительную связь с 7 факторами: полом (у мужчин выше, чем у женщин), ИМТ, суммарной дозой внешнего гамма-облучения, ИБС, ГБ, СГ и типом Нр 1-1. Распространенность ГУ обнаружила положительную связь также с 7 факторами: возрастом, ИМТ, суммарной дозой внешнего гамма-облучения, ИБС, ЦАС, ГБ и типом Нр 1-1. Перечисленные факторы явились предметом дальнейшего анализа. Принимая во внимание то обстоятельство, что между этими факторами в половине случаев имелась достоверная корреляция (см. табл. 2), оценку действительного вклада каждого из факторов проводили с помощью шагового множественного регрессионного анализа. Как известно, шаговая регрессия позволяет ис-

ключить факторы, имеющие опосредованную связь с изучаемым признаком, на основе определения частных коэффициентов корреляции [1]. При этом уровень значимости коэффициентов для включения фактора в регрессионную модель составлял 0,10, а для исключения — 0,05.

В итоге шаговой регрессии установлено, что из взятых в анализ согласно табл. 2 факторов достоверное влияние ( $p < 0,05$ ) на уровень МК оказывали [5], а на распространенность ГУ — 4 фактора. В табл. 3 представлены частные коэффициенты детерминации, величина и знак которых характеризуют влияние каждого фактора, что позволяет сравнить их между собой. В этой таблице приведены и множественные коэффициенты детерминации, показывающие ту долю общей дисперсии исследуемого показателя, которая обусловлена всеми влияющими факторами. Из табл. 3 следует, что наибольшее влияние на уровень МК у облученных людей оказывают нерадикационные факторы — пол, ИМТ и наличие ГБ. Влияние внешнего гамма-облучения оказалось существенно меньшим. Степень зависимости уровня МК от типа Нр 1-1 была наименьшей, хотя и достоверной. В целом, как свидетельствует значение множественного коэффициента детерминации, перечисленные факторы определяли 10,8% дисперсии МК. Распространенность ГУ в наибольшей степени была связана с ИМТ и ГБ и в меньшей степени — с внешним облучением и

Таблица 3

Коэффициенты детерминации (в %) факторов с достоверным влиянием на показатели пуринового обмена

Факторы	МК			ГУ		
	<i>d</i>	<i>F</i>	<i>p</i>	<i>d</i>	<i>F</i>	<i>p</i>
Пол	4,6	43,91	<0,001	-	-	-
ИМТ	3,3	30,29	<0,001	3,4	31,28	<0,001
ГБ	1,4	13,47	<0,001	0,8	7,20	<0,01
Доза гамма-облучения	1,0	9,51	<0,01	0,6	5,26	<0,05
Тип Нр	0,5	4,81	<0,05	0,45	4,23	<0,05
<i>D</i>	10,8			5,25		

Примечание. *d* — частный коэффициент детерминации; *D* — множественный коэффициент детерминации; *F* — критерий Фишера.

типом Нр. Суммарное влияние этих факторов на ГУ оказалось несколько меньшим, чем для МК, о чем свидетельствует величина множественного коэффициента детерминации, равная 5,3%.

В результате шагового регрессионного анализа были получены линейные уравнения множественной регрессии, отражающие зависимость показателей пуринового обмена от достоверно влияющих факторов:

$$\text{МК, мкмоль/л} = 24 + 50,6X_1 + 5,1X_2 + 30,1X_3 + 6,1X_4 + 20,6X_5;$$

$$F = 21,61; p < 0,001.$$

$$\text{ГУ, в долях} = -0,339 + 0,010X_2 + 0,055X_3 + 0,011X_4 + 0,044X_5;$$

$$F = 14,71; p < 0,001,$$

где  $X_1$  — пол (1 — женский, 2 — мужской);  $X_2$  — ИМТ;  $X_3$  — ГБ (1 — нет, 2 — есть);  $X_4$  — суммарная доза гамма-облучения (в Гр);  $X_5$  — тип Нр (1 — типы 2-1 и 2-2, 2 — тип 1-1);  $F$  — критерий Фишера.

Значения коэффициентов регрессии для суммарной дозы гамма-облучения свидетельствуют о том, что увеличение дозы облучения на 1,0 Гр обуславливает повышение уровня МК на 6,1 мкмоль/л и увеличение частоты ГУ на 0,011, т.е. на 1,1%.

При обсуждении полученных результатов следует отметить, что обнаруженное ранее повышение содержания МК у людей, подвергавшихся значительному внешнему радиационному воздействию, подтвердилось в настоящем исследовании в более широком диапазоне доз гамма-облучения. При этом установлен линейный характер зависимости МК и ГУ от суммарной дозы облучения. В отличие от внешнего радиационного воздействия зависимости показателей пуринового обмена от инкорпорации плутония-239 не отмечено. Выявленная связь уровня МК с полом, ИМТ и ГБ и ее отсутствие с возрастом хорошо согласуются с подавляющим большинством данных литературы [1, 14]. Отсутствие зависимости МК от СГ подчеркивает особые взаимоотношения сдвигов пуринового обмена именно с ГБ, а не с гипертензией любого генеза. Природа связи МК с ГБ достаточно сложна и до конца не ясна. Полагают, что она обусловлена несколькими причинами, в частности нейрогуморальными, наследственными, эффектом от приема диуретиков и др. [9, 17]. Более высокий уровень МК, как и некоторых других биохимических показателей, у людей с типом Нр 1-1 установлен в последнее время [5, 8]. Возможно, наблюдаемые изменения отражают физиологические особенности людей с типом Нр 1-1. Отсутствие связи уровня МК с ИБС, ЦАС, СД, заболеваниями печени, почек и суставов в конечном счете также не противоречит данным литературы, поскольку нарушения пуринового обмена при этих заболеваниях в большей степени проявляются при их обострении или более тяжелом течении [7]. Видимо, по этой причине в литературе встречаются указания и на отсутствие такой связи [11]. Кроме того, в

отдельных случаях эта связь, отмечаемая при монофакторном анализе, не подтверждалась при многофакторной оценке, что свидетельствует об ее опосредованном характере [9]. Следует подчеркнуть, что включение названных заболеваний в анализ определялось необходимостью более полного учета нерадиационных факторов при оценке влияния радиации. В результате множественной шаговой регрессии показано, что степень зависимости параметров пуринового обмена от суммарной дозы внешнего гамма-облучения была меньше, чем каждого из большинства влияющих нерадиационных факторов (см. табл. 3).

Обнаруженная в исследовании положительная связь уровня МК с суммарной дозой внешнего гамма-облучения представляет большой интерес, и требуется дальнейшее изучение патогенетических механизмов и возможных последствий для облученных людей. В этом отношении привлекают внимание данные об учащении мутаций в локусе фермента пуринового обмена — гипоксантингуанинфосфорибозилтрансферазы у человека под влиянием радиации [12]. Также наряду с общизвестными последствиями ГУ [6] вызывают большой интерес полученные в последнее время сведения о повышении смертности от всех причин среди людей с более высоким уровнем МК [15].

В целом результаты исследования свидетельствуют о целесообразности введения контроля за уровнем МК в систему медицинского наблюдения облученных людей.

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Вучков И., Бояджиева Л. Б., Салаков Е. Прикладной линейный регрессионный анализ. Пер. с болг. — М., 1987.
2. Кожемякин Л. А., Шелепина Е. П., Антонова В. Г., Краевой С. А. // Радиобиология. — 1989. — Т. 29, № 6. — С. 749-753.
3. Нормы радиационной безопасности НРБ-76/87 и Основные санитарные правила работы с радиоактивными веществами и другими источниками ионизирующих излучений ОСП-72/87. — М., 1988.
4. Тельнов В. И. // Мед. труда и пром. экология. — 1994. — № 2. — С. 4-8.
5. Тельнов В. И. // Клин. лаб. диагност. — 1994. — № 1. — С. 35-37.
6. Тиле П., Шредер Х. Е. // Тер. арх. — 1987. — № 4. — С. 14-18.
7. Титов В. И., Творогова М. Г. // Клин. лаб. диагност. — 1993. — № 5. — С. 67-72.
8. Токарская З. Б., Тельнов В. И., Сурина А. Г. // Лаб. дело. — 1991. — № 4. — С. 52-55.
9. Brand F. N., McGee D. L., Kannel W. B. et al. // Amer. J. Epidemiol. — 1985. — Vol. 121, N 1. — P. 11-18.
10. Cadet J., Berger M. // Int. J. Radiat. Biol. — 1985. — Vol. 47, N 2. — P. 127-143.
11. Goldbourt U., Medalie J. H., Herman J. B., Neufeld H. N. // J. chron. Dis. — 1980. — Vol. 33, N 7. — P. 435-445.
12. Nakoda M., Hirai Y., Shimba H., Akiyama M. // Mutat. Res. — 1989. — Vol. 216, N 1. — P. 75-76.
13. Hosek B., Bohasek J., Sikulova J. // Gen. Physiol. Biophys. — 1989. — Vol. 8, N 1. — P. 63-71.
14. Kuznits R., Muller M. M. // J. clin. Chem. clin. Biochem. — 1980. — Vol. 18, N 10. — P. 745.
15. Levine W., Dyer A. R., Shekelle R. B. et al. // J. clin. Epidemiol. — 1989. — Vol. 42, N 3. — P. 257-267.
16. Misefari M., Miceli M. T., Borrata S. // Quad. Sclavo Diagn. clin. Lab. — 1979. — Vol. 15, N 1. — P. 103-108.

BLOOD SERUM URIC ACID AND INCIDENCE OF HYPERURICEMIA IN SUBJECTS EXPOSED TO RADIATION: RELATIONSHIP WITH RADIATION AND NONRADIATION FACTORS

V. I. Telnov, G. V. Zhuntova

Branch No. 1, Institute of Biophysics, Russia's Ministry of Health and Medical Industry, Ozyorsk, Chelyabinsk Region

A total of 1,002 workers aged 36 to 72 years who were engaged in atomic industry and exposed to external  $\gamma$ -irradiation and incor-

porated plutonium 239 in a wide dosage range. The levels of uric acid (UA), the incidence of hyperuricemia and their association with 2 radiation and 12 nonradiation factors were studied in the examinees. There was a positive correlation between the purine metabolic parameters and the total dosage of external  $\gamma$ -irradiation, sex (UC levels were higher in males than in females), body weight index, essential hypertension, and the type of haptoglobin 1-1. The influence of nonradiation factors on the parameters in question were substantially greater than that of external irradiation. Linear regression equations were derived for the dependence of the levels of UA and hyperuricemia upon the influencing factors.

## ДИСКУССИЯ

© В. Н. УШКАЛОВА, 1995

УДК 378.661:54

В. Н. УШКАЛОВА

### ПУТИ СОВЕРШЕНСТВОВАНИЯ ХИМИЧЕСКОЙ ПОДГОТОВКИ СТУДЕНТОВ МЕДИЦИНСКИХ ВУЗОВ

Кафедра медицинской химии Тюменского медицинского института

Медицинское образование в России всегда базировалось на прочной естественно-научной подготовке. Среди первых трех кафедр медицинского факультета Московского университета была предусмотрена кафедра химии с профессором во главе. В письме М. В. Ломоносова графу Шувалову об организации Московского университета обращалось большое внимание химической подготовке врачей [4]. Очевидно, что серьезное внимание к химии на медицинских факультетах позволило подготовить выдающихся естествоиспытателей и врачей, таких, как Н. И. Пирогов, И. М. Сеченов, И. И. Мечников, С. П. Боткин, и обеспечило славу российской медицины во всем мире.

В советский период наука претерпела колоссальную дифференциацию, что не могло не сказаться на дифференциации вузовских дисциплин. В итоге сложилась практика преподавания химии на медицинских факультетах в виде общей, органической и физико-коллоидной химии, позднее эти курсы были заменены курсами бионеорганической, биофизической и биоорганической химии. В настоящее время преподается химия в виде двух дисциплин — общей и биоорганической химии. На реальное содержание курсов не могли не повлиять сложившиеся научные школы и авторитеты. Физико-химическая подготовка студентов все больше отдается в жертву идеям специализации, профилизации, дифференциации, идет жесткое сокращение учебной программы по химии. В итоге на первом семестре преподается курс, который именуются в отдельных вузах как общая химия, а в столичных — бионеорганическая и биофизическая химия с итоговым экзаменом. На втором семестре препода-

ется курс бионеорганической химии с итоговым зачетом. Если название курсов может не вызывать возражений, то их содержание не лишено многих недостатков и не всегда соответствует целям подготовки современных врачей, реальному содержанию этих курсов в мировой практике.

В соответствии с отечественными традициями общая химия воспринимается как наука об элементах и закономерностях их превращений. При этом в известных пособиях для студентов [1, 2, 5], в практике преподавания общей химии на медицинских факультетах все физико-химические закономерности рассматриваются на примерах, далеких от объектов живой природы и медицины. Энергетика химических процессов рассматривается на примере сгорания углерода или термического разложения карбоната кальция, мицеллообразование рассматривается на примере свойств мицелл сульфата бария или гидроксида железа. Механизм радикально-цепных реакций рассматривается на примере процесса хлорирования водорода, протолитическую теорию подтверждают процессами диссоциации воды или минеральных кислот. Кроме того, что все приведенные примеры имеют мало общего с проблемами живого организма и медицины, они достаточно подробно изложены в школьных учебниках и включены в программу вступительных экзаменов.

Химия комплексных соединений рассматривается на примере комплексов Вернера. На фоне этих основных подходов курса общей химии упоминание об энергетике живых систем, буферных системах крови, природе связи железа с лигандами в гемоглобине выглядит достаточно повер-хотно и нелогично.

Как следствие указанного содержания курса общей химии существующий для медицинских специальностей курс биоорганической химии включает несвойственные этой науке вопросы. В то время как в мировой практике биоорганическая химия представляет собой химию компонентов клетки, а именно химию аминокислот и белков, химию липидов и углеводов, нуклеиновых кислот, химию ферментов и коферментов, существующий вузовский курс на 2/3 состоит из вопросов общей органической химии.

Учитывая реальные цели и задачи подготовки врачей, современный уровень развития химии, биохимии, нанотехнологии, молекулярной биологии, физиологии, патологии, кафедра медицинской химии Тюменского медицинского института разработала рабочую программу обучения химии студентов медицинских факультетов. Основным подходом при составлении этой программы явилось приведение в единство целей, задач подготовки врачей и содержания курсов общей, биоорганической химии в соответствии с мировой практикой.

Мы постарались максимально приблизить этот курс к современным требованиям базовой дисциплины для изучения молекулярных и физико-химических основ биохимии, фармакологии, физиологии, патофизиологии, клинических биохимии и фармакологии.

В предлагаемой программе курсы общей и биоорганической химии рассматриваются как единый курс медицинской химии. Предусмотрен зачет осенью и итоговый экзамен весной. В содержание первой части курса включены вопросы электронной пространственной структуры, номенклатуры, изомерии органических, неорганических и комплексных соединений. Первая часть курса также включает вопросы термодинамики, кинетики, электронной теории химических реакций, теорию растворов и кислотно-основных свойств всех классов органических и неорганических соединений. Некоторые физико-химические закономерности и свойства биоорганических молекул рассматриваются во второй части. Например, поверхностные явления рассмотрены в химии липидов как важнейших поверхностно-активных компонентов клетки. Коллоидные состояния веществ рассмотрены в химии белков как важнейших компонентов коллоидных структур организма. Свойства ионов металлов рассмотрены в химии белков и коферментов в связи с их биологическими функциями.

Вторая часть курса включает химию аминокислот и белков, химию липидов, углеводов, ферментов и коферментов, нуклеиновых кислот, химию гормонов и типичных лекарственных препаратов. Вторая часть курса построена так, что базируется на теоретических вопросах первой части курса и развивает их. В заключение курса приводятся примеры рассмотрения молекулярных основ некоторых видов патологии, что может служить подтверждением базовой роли химической подготовки в освоении всех медико-

биологических дисциплин и практической деятельности врача.

Большое внимание в предлагаемой программе уделено профилизации практикума, который полностью ориентирован на задачи клинической биохимии, гистохимии, клинической фармакологии и лишь частично решает задачи иллюстрации теоретических положений курса.

Лабораторный практикум включает отработку умений обнаруживать элементы, характерные соединения в растворах и биологических средах, определения pH, буферной емкости растворов и биологических жидкостей, обнаружения белков, липидов, углеводов, нуклеиновых кислот, гормонов в растворах и биологических средах, экспериментального исследования их физико-химических свойств.

В заключение хотелось бы обратить внимание, что предлагаемая программа предусматривает прежде всего базовую подготовку студентов для освоения биохимии, но ни в коей мере не подменяет эту науку. Даже поверхностный просмотр современных учебников биохимии [3] показывает, сколь основательной должна быть химическая подготовка, чтобы понять и освоить биохимию. Именно цели базовой химической подготовки студентов медицинских факультетов предусматривает курс медицинской химии. Очевидно, чтобы освоить биохимию аминокислот и белков, или ферментов, или углеводов, или гормонов, необходимо иметь представления о природе и прочности связей, конформационной и конфигурационной их структуре. Именно эти вопросы заложены в содержание курса медицинской химии. Очевидно, чтобы изучить физиологическую активность, метаболизм лекарственных препаратов, необходимо знать структуру важнейших классов лекарственных препаратов, именно вопросы номенклатуры, структуры изучаются в курсе медицинской химии.

Приступая к разработке предлагаемой программы, мы отчетливо сознавали все трудности на этом пути, необходимость преодоления стереотипов в понимании сущности отдельных химических дисциплин, учета больших достижений химической науки, приведения в единство современного уровня химической науки и задач подготовки врачей, использования реального учебного пространства для химической подготовки.

Однако использование описанных выше подходов позволяет легко преодолеть существующие трудности, избежать существующих недостатков и подняться на новый уровень преподавания химии для студентов медицинских факультетов.

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Глинка Н. Л. Общая химия. — М., 1974.
2. Ленский А. С. Введение в биосорганическую и биофизическую химию. — М., 1989.
3. Марри Р., Греннер Л., Мейес П., Родуэлл В. Биохимия человека. В 2-х томах. — М., 1993.
4. Московский университет в воспоминаниях современников / Сост. Емельянов Ю. Н. — М., 1989.
5. Некрасов Б. В. Учебник общей химии. — М., 1963.

Поступила 08.11.93

The paper considers how to extend medical students' knowledge and to provide chemical education within the framework of routine curricula. For this, the paper proposes that the view of re-

garding general chemistry as chemistry of elements should be given up and that the first part of the routine course of general chemistry should be supplemented with aspects of general inorganic, organic, and physical chemistry, that course of biological organic chemistry should contain chemistry of cell elements, as generally accepted in the world, obviating its irrespective issues of general organic chemistry. The results of introducing the approaches in question into teaching practice at the author-headed Department of Medical Chemistry, Therapeutical Faculty, Tyumen Medical Institute are given.

## НЕКРОЛОГ

УДК 615:92 ЛИФШИЦ

### ПАМЯТИ ЛИФШИЦА РОМАНА ИОСИФОВИЧА (1929—1994 ГГ.)



20 декабря 1994 г. на 66-м году жизни скоропостижно скончался заведующий кафедрой биохимии Челябинского медицинского института, член-корреспондент РАЕН, заслуженный деятель науки РФ, член Королевского общества комбустиологов Великобритании, руководитель Челябинского ожогового центра профессор Роман Иосифович Лифшиц.

Научная деятельность Р. И. Лифшица началась с изучения пиримидиновых производных как факторов белкового анаболизма в норме и при различных патологических состояниях. В дальнейшем под руководством Р. И. Лифшица на кафедре стала изучаться проблема патохимии термических ожогов. Развернулись исследования по изучению молекулярных механизмов эндогенной интоксикации при ожогах и комбинированных радиационно-термических поражениях. Научные достижения в этой области сопровождались, как правило, разработкой и внедрением в клиническую практику новых методов диагностики и новых патогенетически обоснованных способов инфузионно-трансфузионной и

экстракорпоральной терапии при ожогах и комбинированных радиационно-термических поражениях.

Существенным итогом работы коллектива кафедры по указанному направлению явилась разработка нового белкового препарата для трансфузионного лечения шока и острой ожоговой токсемии, получившего название БИТО (белок-ингибитор токсических олигопептидов), который по решению Фармкомитета прошел клиническую апробацию в ведущих клиниках термических поражений России и стран СНГ и получил высокую оценку своей терапевтической эффективности.

Результатом успешно проведенных исследований явились защита сотрудниками кафедры, института и других научных учреждений 13 докторских, 50 кандидатских диссертаций, издание 6 монографий, 5 сборников научных трудов, 12 методических указаний и рекомендаций, получение 12 авторских свидетельств на изобретения.

Таким образом, была создана научная школа в области патохимии термических и комбинированных поражений. Талант и энтузиазм Р. И. Лифшица как ученого и организатора реализовались в блестящем соединении глубоких теоретических разработок в области биохимии и практической медицины. Р. И. Лифшиц — один из организаторов создания Челябинского областного ожогового центра, который является в настоящее время клинической базой кафедры. Было создано учебно-научно-практическое объединение, в котором не только разрабатываются и апробируются новые методы лечения обожженных, но и осуществляется повышение квалификации врачей области в вопросах лечения термических ожогов. Решением Фармкомитета ожоговый центр определен в качестве одного из учреждений для апробации новых препаратов в клинике термических поражений, а приказом Минздравмедпрома РФ он преобразован в Межтерриториальный ожоговый центр.

Ушел из жизни замечательный человек, педагог, ученый и организатор здравоохранения. Вся