

611-018
Б633

экспериментальная

медицина

морфология

физиология

биохимия

иммунология

Биологические
мембраны
и патология
клетки

Биологические
мембраны
и патология
клетки

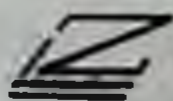
РЕДАКЦИОННАЯ КОЛЛЕГИЯ СЕРИИ:

акад. АН ЛатвССР, д-р мед. наук,
проф. А. Ф. БЛЮГЕР (ответственный редактор),
акад. АМН СССР, д-р мед. наук, проф. В. В. КАНЕП,
д-р мед. наук, проф. В. А. КОРЗАН,
чл.-кор. АН ЛатвССР, д-р мед. наук А. А. КРАУКЛИС,
чл.-кор. АМН СССР, д-р мед. наук, проф. В. К. КАЛНБЕРЗ,
канд. мед. наук В. М. БРАМБЕРГА,
д-р мед. наук, проф. К. Б. СЕГЛЕНИЕЦЕ (ответственный секретарь).

АКАДЕМИЯ НАУК ЛАТВИЙСКОЙ ССР
ОТДЕЛЕНИЕ ХИМИЧЕСКИХ И БИОЛОГИЧЕСКИХ НАУК
МИНИСТЕРСТВО ЗДРАВООХРАНЕНИЯ ЛАТВИЙСКОЙ ССР

11-018
8633

Биологические мембраны и патология клетки



РИГА «ЗИНАТНЕ» 1986

52.5
Б 638

Научный редактор канд. биол. наук А. Я. МАЙОРЕ

Печатается по решению Редакционно-издательского совета
Академии наук Латвийской ССР от 14 февраля 1985 года

Б $\frac{4106000000-089}{M811(11)-86}$ 95-86

© Издательство «Зинатне», 1986

А. Ф. Блюгер, А. Я. Майоре

БИОЛОГИЧЕСКАЯ МЕМБРАНА —
ОСНОВНАЯ СТРУКТУРА
ОРГАНИЗАЦИИ ЖИЗНЕДЕЯТЕЛЬНОСТИ КЛЕТКИ
(вместо предисловия)

Известно, что не только внешний) диффузионный барьер, но и все клеточные органеллы (за исключением части рибосом, хромосом делящихся клеток, ядрышка и некоторых специализированных структур, таких, как миофибриллы) имеют липопротеидные мембраны. В настоящее время с полной уверенностью можно говорить, что биологическая мембрана — это такая надмолекулярная структура, которая благодаря способности в широком диапазоне менять свои свойства может приспособиться к выполнению множества чрезвычайно разнообразных функций — от переноса ионов и метаболитов и трансформации энергии до биосинтеза различных химических соединений, необходимых для жизнедеятельности самих клеток или для обеспечения функций других видов клеток и тканей. При этом важную биологическую роль выполняет как белковый, так и липидный слой мембран.

Данные о жидкостном состоянии внутренней части липидного слоя и о наличии в мембранах гидрофобных белков говорят о том, что липиды мембран выполняют функцию гидрофобного растворителя. Именно эта часть мембраны участвует в реакциях метаболизма неполярных веществ — гидрофобных белков, жирорастворимых небольших молекул (стероидов, витаминов и др.) и соединений, обладающих одновременно гидрофильными и гидрофобными свойствами. Это возможно благодаря мозаичности структуры мембран, т. е. белки не покрывают сплошным слоем биослой липидов, так же как и липиды не полностью покрывают глобулы белков.

Не менее важна функциональная роль мембран в каче-

стве формы пространственной организации мультиэнзимных комплексов: во-первых, это гидрофобно-гидрофильные ферментные системы; во-вторых, расположенные на мембранах цепи водорастворимых белков-ферментов. При этом следует отметить как функциональную, так и структурную асимметричность биологической мембраны. Функциональная векторность мембранных процессов проявляется в виде градиентов концентраций ионов, аминокислот, сахаров и других метаболитов между пространствами, отделенными биологической мембраной. Структурная асимметричность выражается в том, что компоненты мембран, по крайней мере белковые, на внутренней стороне отличаются от таковых на внешней. Так, например, выяснено, что в цитоплазматической мембране большинство мембранных ферментов ориентировано внутрь клетки, а на внешней стороне располагается основная масса углеводных компонентов.

Имеются сведения также и о количественных и качественных различиях в липидном составе внешней и внутренней сторон мембран (эритроцитов, бактерий и других клеток). Например, фосфатидилхолин локализован преимущественно на внешней, а фосфатидилэтаноламин и фосфатидилсерин — на внутренней стороне мембраны эритроцитов.

Многие факты свидетельствуют о сильном взаимодействии двух основных компонентов мембран — белков и липидов. Известно, что модификация мембранных липидов приводит к изменениям активности, а иногда — и к солиubilизации мембранных ферментов. Ряд мембранно-связанных ферментов вообще не могут функционировать в отсутствие липидов. В то же время состояние белковых молекул активно влияет на структуру липидной части мембраны. Например, упаковка липидов в микросомальных мембранах меняется в ответ на изменения состояния K^+ - Na^+ -АТФазы.

Уникальные свойства биомембран определяют их участие в таких процессах, как преобразование трансмембранной разности электрического потенциала в химическую энергию, запасаемую в макроэргических соединениях, поддержание ионной асимметричности, направленный транспорт веществ, накопление минеральных и органических ионов, восприятие и передача в клетку сигналов к сокращению, возбуждению, делению и др. Следует также отметить, что в мембранах локализованы специализированные мембранные структуры — рецепторы, осуществляющие распознавание и связывание гормонов, медиаторов и т. д. В цитоплазматической мембране расположена система об-

разования циклического АМФ — внутриклеточного медиатора, обладающего широким спектром действия.

Изложенные выше факты о роли биологических мембран в осуществлении процессов жизнедеятельности клеток и организма в целом объясняют большой интерес исследователей к изучению структуры и функций мембранной системы клеток различных органов и тканей в условиях действия патогенных агентов. Ряд статей, посвященных этой проблеме, представлен в настоящем сборнике.

Изучением патологических процессов на уровне субклеточных и мембранных структур характеризуются многие направления современной медицины, в том числе гепатология. Основным объектом действия гепатотропных агентов являются гепатоциты — высокодифференцированные клетки с большим количеством органоидов и развитой внутриклеточной мембранной системой. Мембраны отдельных видов субклеточных структур отличаются как по строению, так и по выполняемым ими функциям. Поэтому ход патологического процесса может существенно зависеть от того, какого рода органеллы повреждаются первично.

Многие гепатологи считают, что ведущее значение в патогенезе заболеваний печени играет раннее поражение целостности митохондрий гепатоцитов, влекущее за собой нарушение энергетического обмена, подавление энергозависимых функций клеток и др. Интересные данные в этом отношении получены Е. И. Варгановой с соавт. на модели интоксикации крыс α -нафтилизотиоцианатом (АНИТ), повреждающее действие которого на печень проявляется в холестазах и цитолизе. В первые сутки эксперимента авторы наблюдали функциональный переход митохондрий гепатоцитов из ортодоксальной конфигурации (которая свойственна интактным клеткам) в конденсированную, для которой характерны электронно-плотный матрикс и увеличенное число крист. О переходе гепатоцитов на усиленное энергообразование, необходимое для устранения холестаза, свидетельствуют и биохимические показатели. По всей видимости, результаты этого исследования исключают прямое токсическое воздействие АНИТ на митохондрии гепатоцитов.

В отличие от этого АНИТ инициирует коррелирующее со степенью выраженности холестаза поражение эндоплазматической сети (ЭПС) гепатоцитов. Это проявляется в снижении содержания микросомального цитохрома Р-450 аналогично наблюдаемому при интоксикации известным гепатотропным ядом CCl_4 (статья Э. С. Горштейн). Повидимому, в этом случае мы имеем дело с веществами, метаболизм которых происходит непосредственно в мембра-

нах ЭПС. В них же первично выявляется и патогенное действие самих агентов или их метаболитов.

Результатом взаимодействия патогенного агента с ферментами микросомальных мембран является также гепатотропное действие акриламида (статья Ю. В. Котловского с соавт.). Авторы предполагают, что с участием ферментов ЭПС из акриламида образуется эпокись его, отличающаяся высокой реакционной способностью. При этом установлено, что повреждение печени указанным ядом не обусловлено интенсификацией процессов перекисного окисления липидов (ПОЛ) — известного модификатора мембран. В других же статьях настоящего сборника приведены данные о патогенетическом значении изменений ПОЛ как при отравлении животных гепатотропными ядами (CCl_4 , АНИТ, гидразин, этанол) (статья А. Я. Майоре с соавт.), так и при хронических поражениях печени у людей (статья Ю. П. Гичева, В. И. Хаснулина). В этой связи интересно отметить, что получены данные (статья Л. Б. Дудник и А. Я. Майоре), позволяющие рассматривать гипербилирубинемию, наблюдаемую при большинстве заболеваний печени, в качестве направленной на нормализацию ПОЛ реакции организма.

В патогенезе заболеваний печени существенную роль может играть нарушение метаболизма холестерина и желчных кислот в гепатоцитах. В статье Б. Р. Гедулиной показано, что подавление гидроксилирования желчных кислот в ЭПС клеток печени, ведущее к повышению уровня мембранлабилизирующих дигидроксикислот при интоксикации этанолом, причем большое значение в возникновении указанных изменений липидного обмена играет метаболит этилового спирта — ацетальдегид.

В последнее время определенное значение придают нарушению кислородного режима в гепатоцитах при поражении клеток печени патогенными агентами. В этой связи особый интерес представляют факты, свидетельствующие об изменениях мембран эритроцитов при экспериментальной (статья Т. Н. Снiedzе и В. А. Васарини) и клинической (статья В. Ю. Сондоре с соавт.) патологии печени. Повышение осмотической резистентности эритроцитов говорит об уплотнении мембран, что может быть причиной нарушения кислородтранспортной функции их, влекущего за собой усугубление гипоксии гепатоцитов.

Гепатотропные агенты действуют не только на внутриклеточные мембраны гепатоцитов, но также изменяют морфофункциональное состояние цитоплазматической мембраны (ЦПМ). Результаты электронно-микроскопического исследования ультратонких срезов печени больных и под-

опытных животных (статья В. К. Залцмане) показывают, что уменьшение длины и числа микроворсинок ЦПМ в синусоидальном полюсе клеток характерно для дистрофически-некротического типа повреждения гепатоцита (при остром вирусном гепатите, хронических гепатитах, иногда и при синдроме Жильбера). При хроническом гепатите и циррозе печени выявляются и сильно набухшие микроворсинки, содержащие различные цитоплазматические органеллы. Нередко происходит аутоампутация таких микроворсинок. Описанные изменения ЦПМ в синусоидальном полюсе являются морфологическим субстратом нарушения обмена веществ между гепатоцитом и кровеносной системой, в результате которого наступают нарушения питания и альтерация паренхиматозных клеток.

Изменения ЦПМ в билиарном полюсе клетки характерны для холестазов различного генеза. Частичная или полная редукция микроворсинок, сильное набухание отдельных из них создают условия для нарушения процессов выделения желчи.

Помимо изменений микроворсинок наблюдают и увеличение или уменьшение образования пиноцитозных пузырьков и фагоцитарных вакуолей, изменения межклеточных контактов, утолщение или локальные прорывы ЦПМ, имеющие место при определенных видах патологии печени.

В настоящем сборнике представлены статьи, посвященные изучению повреждения мембран и других видов клеток. Сдвиги активности и латентности лизосомальных ферментов, связанные с повреждением лизосомальной мембраны клеток миокарда, выявлены при тотальной ишемии сердца, адреналиновом миокардите, глубокой гипотермии (статья В. Р. Бауман с соавт.). В последнем случае обнаружено также изменение целостности ЦПМ (статья В. А. Корзан с соавт.) и дисбаланс фосфолипидного состава клеток сердца крыс (статья Л. Я. Утно и С. П. Витолинь).

Ряд статей посвящен изучению мембран клеток крови. Выше уже были обсуждены изменения мембран эритроцитов при патологии печени. В статье Х. М. Векслера с соавт. отражены результаты изучения мембран иммуноцитов, в частности их рецепторного аппарата, при вирусном гепатите В и его исходах. Установлен различный состав рецепторов на мембране лимфоцитов крови к антигенам гетерологичных и аутологичных эритроцитов, в зависимости от тяжести течения патологического процесса. Эти данные объясняют особенности формирования иммунологического ответа у отдельных групп больных вирусным гепатитом В.

Тесная взаимосвязь между состоянием мембран и

активностью отдельных ферментов (миелопероксидазы, супероксиддисмутаза) в лейкоцитах выявлена И. В. Скардсом и Е. П. Райпулисом.

Следует отметить, что изменения клеточных мембран могут наступить и в результате применения различных лечебных средств, например при воздействии терапевтическими дозами гипербарического кислорода (статья Н. И. Гольдштейн с соавт.) или фенобарбиталом (статья В. Ю. Сондоре с соавт.).

Таким образом, представленные в настоящем сборнике статьи еще раз подтверждают, что повреждение ответственных за жизнедеятельность и поддержание химического гомеостаза клеток мембран является существенным звеном различных патологических процессов. Поэтому целенаправленными следует считать поиски новых терапевтических средств среди мембраноактивных соединений. Этой проблеме посвящены статьи А. Г. Одинца с соавт., Л. Р. Пфафрод с соавт., Л. И. Сушко с соавт.

І. МЕМБРАНЫ КЛЕТОК ПЕЧЕНИ

УДК 611.36—018.11:616.36—008.811.5

Е. И. Варганова, Н. А. Макарова, А. Я. Майоре

Рижский медицинский институт

СТРУКТУРНО-ФУНКЦИОНАЛЬНОЕ СОСТОЯНИЕ МИТОХОНДРИЙ ГЕПАТОЦИТОВ ПРИ ВНУТРИПЕЧЕНОЧНОМ ХОЛЕСТАЗЕ У КРЫС

Модель внутрипеченочного холестаза у крыс, вызванного α -нафтилизотиоцианатом (АНИТ), широко используют гепатологи для изучения патогенеза данного заболевания [24, 26, 28], механизмы которого до настоящего времени окончательно не выяснены.

Полагают, что в генезе внутрипеченочного холестаза ведущую роль играют функциональные и механические факторы, обуславливающие нарушение секреции желчи гепатоцитом или недостаточный ее отток из печеночной дольки [10]. Механизмы же развития названных нарушений могут быть различными, и важную роль в этом играет этиологический фактор, определяющий морфологический уровень, на котором возникает внутрипеченочный холестаз (гепатоцит, желчные ходы), скорость его образования и степень выраженности [3].

Динамика изменений биохимических и морфологических признаков холестаза (выраженная гипербилирубинемия, повышение активности щелочной фосфатазы в сыворотке крови и в печени крыс, повышение содержания триглицеридов, фосфолипидов и свободного холестерина в печени, дилатация желчных канальцев в портальных трактах, пролиферация желчных протоков в портальных трактах и внутри долек, расширение желчных капилляров и редуцирование в них микроворсинок) [12, 21] свидетельствует о том, что при интоксикации АНИТ холестаз развивается у животных очень быстро и достигает максимальной степени выраженности через 48—72 ч после однократного введения яда.

Важно подчеркнуть, что влияние выбранной нами дозы АНИТ не ограничивается только холестатическим эффектом, опосредствованным, по мнению ряда авторов [23, 26, 28],

действием яда на желчные капилляры, но вызывает характерные для цитологического процесса метаболические нарушения в клетках печени (гипертрансаминаземию и очаговые некрозы гепатоцитов) [12]. Здесь уместно отметить, что в данном случае по сравнению с очаговым некротическим поражением печени, имеющим место при интоксикации крыс аллиловым спиртом, некрозогенный эффект АНИТ выражен значительно слабее и представлен обычно отдельными измененными клетками.

Аналогичные факты наблюдались и при использовании АНИТ в меньшей дозе — 70 мг/кг [21].

Что же касается интимных механизмов холестаза, то выдвинутая в 1969 году гипотеза, согласно которой холестаз есть результат гипоактивности гипертрофированного эндоплазматического ретикулума (ЭПР) гепатоцитов [30], в настоящее время отвергается в связи с новыми данными, полученными при исследовании ЭПР печени на модели внутрипеченочного холестаза крыс, вызванного действием CoCl_2 в сочетании с фенобарбиталом [29], или действием АНИТ у хомяков [20].

Обнаруженные гипоактивность ЭПР, скопление лизосом в цитоплазме гепатоцитов, повреждение их билиарного полюса, по всей видимости, являются не причинами, а последствиями холестаза. Очевидно, холестаз начинается с каких-то других нарушений, возникающих в самой печеночной клетке [3, 7].

В соответствии с вышесказанным возникает вопрос о состоянии энергообеспечения гепатоцитов при интоксикации АНИТ, тем более что имеются данные, свидетельствующие о расстройстве энергетики печени при любом нарушении оттока желчи [1, 5, 27]. Так, например, нами ранее было доказано нарушение структуры и функции митохондрий (Мх) гепатоцитов при перевязке общего желчного протока и изучена их роль в развитии подпеченочного холестаза у крыс [8].

Вопрос становится особенно интересным, если учесть, что:

1) нарушение энергетики в той или иной степени встречается при любых патологических процессах [4];

2) катаболизм холестерина и синтез желчных кислот, а именно окисление их боковых цепей, происходит в Мх гепатоцитов [10];

3) секреция желчи требует значительных затрат энергии, источником которой является митохондриальная АТФ [5].

Что же касается исследования структуры и функции Мх при отравлении крыс АНИТ, то этому вопросу посвящены лишь единичные работы, свидетельствующие о тенденциях к повышению содержания фосфолипида — кардиолипина [12], играющего существенную роль в функциональной и структурной целостности внутренней мембраны Мх, и к увеличению в митохондриальной фракции гепатоцитов содержания первичных продуктов липопероксидации [16].

Авторы настоящей статьи исследовали изменения ультраструктуры и функциональных параметров Мх печени крыс после однократного введения животным АНИТ.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДИКА ИССЛЕДОВАНИЯ

В исследовании были использованы белые крысы-самцы линии Вистар массой 180—200 г. Экспериментальные животные были разделены на три группы:

- 1 — интактные животные;
- 2 — животные, которым натошак перорально (через зонд) вводили оливковое масло (по 0,5 мл/100 г массы);
- 3 — животные, которые аналогичным способом получали по 0,5 мл 2%-ного раствора АНИТ на оливковом масле в дозе 100 мг/кг.

В митохондриальной фракции гепатоцитов, выделенной путем ультрацентрифугирования по методу Де Дюва [19], определяли в динамике (через 24, 48 и 72 ч после введения АНИТ) следующие биохимические параметры функционального состояния Мх: активность сукцинатдегидрогеназы (СД) (К.Ф. 1.3.99.1) [14], активность Mg^{2+} -АТФ-азы (К.Ф. 3.6.1.3) [6], оптическую плотность (D) митохондриальной суспензии [18], скорость (V) и интенсивность (I) индуцированного неорганическим фосфатом набухания Мх [15] и интенсивность флюоресценции тетрациклинового зонда в гидрофобной зоне внутренней мембраны органелл [17]. Определение белка проводили по Лоури [25]. Полученные данные обрабатывали методом вариационной статистики, используя t -критерий Стьюдента.

Параллельно с биохимическим исследованием Мх гепатоцитов проводили электронно-микроскопическое изучение митохондриальной фракции.

Для электронно-микроскопических исследований ткань печени фиксировали в 2%-ном растворе OsO_4 на фосфатном буфере (рН 7,4) в течение 2 ч при 4°С. Срезы ткани, залитой в эпон, получали на ультрамикротоме фирмы «ЛКВ» (Швеция), контрастировали уранилацетатом и цитратом свинца и просматривали в электронном микроскопе JEM-100.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Структурно-функциональное состояние Мх гепатоцитов при внутрипеченочном холестазае, вызванном АНИТ, мы исследовали в разгар поражения печени, когда в сыворотке крови наблюдается максимальное повышение активности АлАТ, щелочной фосфатазы и содержания билирубина [12].

Исследование ультраструктуры Мх гепатоцитов крыс в 1-е

сутки после введения яда показало преобладание в значительной степени измененных органелл. Как видно из рис. 1, для Мх гепатоцитов крыс, получивших АНИТ, характерен электронно-плотный матрикс с увеличенным числом крист. Наружная мембрана органелл имеет извилистый контур и часто образует выпячивания в виде пузырей. Выявляется и локальное набухание Мх. Ультраструктурные изменения Мх согласуются с полученными данными биохимического определения состояния процессов набухания Мх: снижением оптической плотности митохондриальной суспензии и торможением индуцированного неорганическим фосфатом набухания органелл (табл. 1). Эти факты свидетельствуют о наличии уже набухших *in situ* Мх после 24-часового действия яда.

Изменений же в структурно-функциональном состоянии Мх крыс 2-й группы нами не обнаружено во все исследуемые сроки опыта (см. табл. 1, 2).

Таким образом, в 1-е сутки после введения АНИТ наблюдается функциональный переход Мх гепатоцитов из ортодоксальной конфигурации, свойственной органеллам в интактной клетке, в конденсированную, для которой характерны электронно-плот-

Таблица 1

Показатели набухания, интенсивности флюоресценции тетрациклинового зонда в митохондриях гепатоцитов при интоксикации крыс АНИТ ($M \pm m$)

Длительность опыта, ч	Введенное вещество	Показатели набухания			Интенсивность флюоресценции зонда, ед. флюор./мг белка Мх
		$D_{L_{520}}$, ед. экст./мг белка	V, %	I, %	
24	АНИТ	$0,123 \pm 0,008^*$ (13)**	$9,2 \pm 1,5^*$ (11)	$22,4 \pm 4,8^*$ (11)	$40,60 \pm 1,41$ (5)
	Масло	$0,158 \pm 0,010$ (5)	$22,4 \pm 3,6$ (5)	$40,3 \pm 3,8$ (5)	$42,64 \pm 1,18$ (4)
48	АНИТ	$0,149 \pm 0,005$ (14)	$19,7 \pm 3,1$ (12)	$27,5 \pm 3,5^*$ (12)	$39,89 \pm 1,30$ (6)
	Масло	$0,155 \pm 0,010$ (5)	$27,5 \pm 5,7$ (5)	$43,2 \pm 2,8$ (5)	$36,70 \pm 2,10$ (5)
72	АНИТ	$0,101 \pm 0,008^*$ (18)	$11,1 \pm 2,1^*$ (10)	$25,0 \pm 5,9^*$ (15)	$35,5 \pm 3,22$ (9)
	Масло	—	—	—	$39,89 \pm 2,70$ (4)
Интактные животные		$0,148 \pm 0,006$ (8)	$22,3 \pm 4,3$ (8)	$41,2 \pm 2,9$ (8)	$44,49 \pm 3,62$ (6)

* Различия результатов достоверны по отношению к норме.

** Здесь и далее в скобках указано число животных.

Таблица 2

Изменения активности сукцинатдегидрогеназы (СД) и Mg^{2+} -АТФ-азы в митохондриях гепатоцитов крыс при интоксикации АНИТ ($M \pm m$)

Длительность опыта, ч	Введенное вещество	СД. ед. акт./мг белка	Mg^{2+} -АТФ-аза. % от нормы
24	АНИТ	$0,333 \pm 0,024$ (7)	$100,2 \pm 8,4$ (7)
	Масло	$0,368 \pm 0,033$ (5)	$110,2 \pm 8,7$ (5)
48	АНИТ	$0,408 \pm 0,016^*$ (6)	$136,1 \pm 12,3^*$ (8)
	Масло	$0,395 \pm 0,029$ (4)	$87,8 \pm 8,3$ (5)
72	АНИТ	$0,228 \pm 0,019^*$ (8)	$182,1 \pm 28,2^*$ (7)
	Масло	—	—
Интактные животные		$0,318 \pm 0,022$ (8)	$100,0 \pm 3,8$ (8)

Пояснения см. в табл. 1.

ный матрикс и увеличенное число крист [4]. Есть предположение, что конденсированные Мх отличаются высокой активностью СД, трактуемой как признак их высокой функциональной активности. Кроме того, в таких Мх отмечается и большее содержание АТФ по сравнению с ортодоксальными формами органелл, хотя синтез АТФ на экспорт у них значительно снижен, чем у последних [2].

Многочисленные опыты на Мх печени крыс показали, что конформационные переходы их мембран связаны с регуляцией энергетического метаболизма и их генетической функцией [9] и находятся в соответствии с изменением активности мембранных ферментов [4] и фосфолипидного состава мембран органелл [13].

В нашем опыте изменения активности митохондриальных СД и Mg^{2+} -АТФ-азы отчетливо наблюдались через 48 ч после введения яда, т. е. несколько позже, чем выявлялись ультраструктурные изменения мембран Мх, и выражались они в повышении активности обоих ферментов (см. табл. 2).

Следует признать, что механизм ультраструктурных изменений, связанных с изменением функционального состояния, остается до конца невыясненным. По-видимому, конформационные изменения мембран Мх гепатоцитов, возникающие под влиянием АНИТ, отражают также и изменения конформации

ферментов, участвующих в процессе дыхания и окислительного фосфорилирования, приводящие к сдвигам их активности.

Учитывая существенный рост активности СД через 48 ч после введения АНИТ, можно предположить, что у Мх возрастает энергетическая регуляция дыхания и усиливается энергообеспечение гепатоцитов, необходимые для нормализации процесса желчеобразования и желчевыделения. Об изменениях в системе окислительного фосфорилирования Мх свидетельствует наблюдаемое нами набухание органелл и повышение активности Mg^{2+} -АТФ-азы, достигающее к 3-м суткам опыта в среднем 182% от контроля (см. табл. 2). По-видимому, на данном этапе патологического процесса в печени при развивающемся низкоэнергетическом состоянии Мх вступает в действие другой механизм регуляции энергообмена, ведущий к ингибированию активности СД и имеющий адаптационное значение [11].

Следует заметить, что на фоне выраженных холестатических изменений в ткани печени на 2-е сутки после начала стаза желчи электронно-микроскопически уже наблюдается процесс нормализации структуры Мх и лишь отдельные из них сохраняют извилистый контур наружной мембраны и увеличенное число крист. А через 72 ч после введения АНИТ каких-либо изменений в ультраструктуре Мх не наблюдалось.

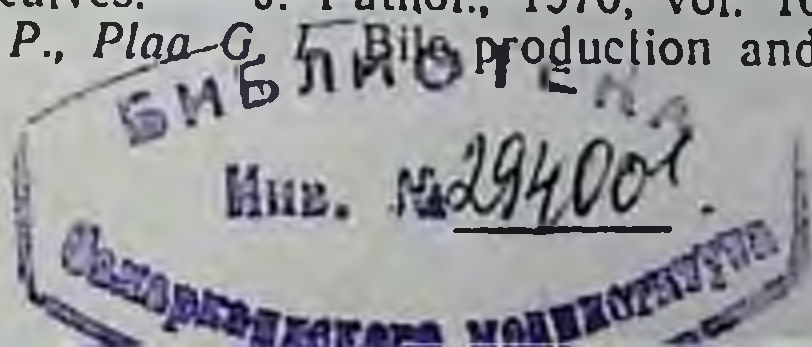
Здесь уместно отметить, что энергетический дефицит в разных случаях может вызвать различную и даже противоположно направленную ответную реакцию Мх [11].

В нашем случае отсутствие изменений в структуре внутренней мембраны органелл, нормальное функционирование энергозависимого транспорта кальция, оцениваемого по флюоресценции тетрациклина [17], по всей видимости, исключают прямое токсическое действие АНИТ на Мх гепатоцитов, а обнаруженные нами изменения структурной организации наружной мембраны Мх и функциональной активности ферментов СД и Mg^{2+} -АТФ-азы скорее отражают функциональную перестройку энергетической функции Мх в условиях холестаза, вызванного АНИТ.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Батрутдинов М. Г., Мартынов А. П. Энергетический обмен при внепеченочном холестазе. — *Вопр. мед. химии*, 1980, т. 26, № 3, с. 385—387.
2. Бекетова Т. П. Соотношение между ультраструктурой изолированных митохондрий и их метаболическим состоянием. — В кн.: *Ультраструктурные аспекты морфогенеза и регенерации в норме и при патологии*. М., 1976, с. 11—17.
3. Блюгер А. Ф. Холестазы. — В кн.: *Печеночно-клеточная недостаточность. Холестазы*. Рига, 1974, с. 63—97.

4. Бульчев А. Г. Конфигурационные переходы мембран митохондрий в связи с их энергетическим метаболизмом. — В кн.: Структура и функции биологических мембран. М., 1975, с. 59—77.
5. Воронель В. Л., Назаров Г. Ф., Шестакова С. А. Особенности энергетического обмена печени при экспериментальном внутрипеченочном холестазах. — В кн.: Механизм повреждения, резистентности, адаптации и компенсации. Ташкент, 1976, т. 2, с. 22—23.
6. Глебов Н. М. Действие катехоламинов на АТФ-азную активность митохондрий сердца. — Биохимия, 1973, т. 38, вып. 4, с. 128—130.
7. Горштейн Э. С., Майоре А. Я., Макарова Н. А. Активность микросомальной системы гидроксилирования при внутрипеченочном холестазах у крыс, вызванном α -нафтилизотиоцианатом. — В кн.: Экспериментальная патология печени. Рига, 1983, с. 63—69.
8. Елисеева Е. И., Майоре А. Я. Характеристика энергозависимых функций митохондрий гепатоцитов при экспериментальной подпеченочной желтухе. — В кн.: Биохимические исследования патологических процессов. Рига, 1983, с. 37—44.
9. Казакова Т. Б. О генетических функциях митохондрий. Автореф. дис. ... канд. биол. наук. Л., 1972. 24 с.
10. Карташова О. Я., Максимова Л. А. Функциональная морфология печени. Рига, 1979. 118 с.
11. Кондрашова М. Н., Евтодченко Ю. В., Кудзина Л. Ю. Влияние обычных экспериментальных факторов на состояние митохондрий. — В кн.: Руководство по изучению биологического окисления полярографическим методом. М., 1973, с. 93—106.
12. Майоре А. Я., Горштейн Э. С., Кузнецова Т. В. и др. Некоторые аспекты гепатотропного действия α -нафтилизотиоцианата. — В кн.: Экспериментальная патология печени. Рига, 1983, с. 77—86.
13. Микельсаар Х., Северина И. И., Скулачев В. П. Фосфолипиды и окислительное фосфорилирование. — Успехи соврем. биологии, 1974, т. 78, вып. 3(6), с. 348—385.
14. Покровский А. А., Арчаков А. И., Любимова Н. А. Современные методы в биохимии. М., 1968. 430 с.
15. Разумович А. Н. Структура и функция митохондрий при старении. — В кн.: Биоэнергетические процессы и старение организма. Минск, 1972, с. 72—90.
16. Элрте Д. Л., Майоре А. Я. Перекисное окисление липидов в митохондриях печени крыс при отравлении α -нафтилизотиоцианатом. — В кн.: Экспериментальная патология печени. Рига, 1983, с. 106—110.
17. Caswell A. H. The migration of divalent cations in mitochondria visualized by a fluorescent chelate probe. — J. Membrane Biol., 1972, vol. 7, N 4, p. 345—364.
18. Cleland K. W. Permeability of isolated rat heart sarcosomes. — Nature, 1952, vol. 170, N 4325, p. 497—499.
19. De Duve Ch., Pressman R., Gianetto R. Tissues fractionation. — Biochem. J., 1955, vol. 60, N 4, p. 604—617.
20. El-hawari A. M., Plaa G. L. Impairment of hepatic mixed-function oxidase activity by α - and β -naphthylisothiocyanate: relationship to hepatotoxicity. — Toxicol. a. Appl. Pharmacol., 1978, vol. 48, N 3, p. 445—458.
21. Fregnan G. B., Frigerio L., Porta P. et al. Therapeutic properties of dihydroxydibutyl ether on sub-acute liver damage induced by several hepatotoxic agents in rats. — Intern. J. Tissue Reaction, 1982, vol. 4, N 4, p. 309—318.
22. Goldfarb S., Singer E., Popper H. Experimental cholangitis due to alpha-naphthyl-isothiocyanate. — Amer. J. Pathol., 1962, vol. 40, N 6, p. 685—698.
23. Gopinath C., Ford E. J. The effect of alpha-naphthyl-isothiocyanate on the liver of sheep and calves. — J. Pathol., 1970, vol. 100, N 4, p. 269—280.
24. Lock S., Witschi H. P., Plaa G. Bile production and flow in rats treated



- with α -naphthylisothiocyanate (ANIT). — *Canad. Fed. Biol. Soc.*, 1976, vol. 19, N 1, p. 101—103.
25. *Lowry O. H., Rosebrough N. I., Farr L. et al.* Protein measurement with the folin phenol reagent. — *J. Biol. Chem.*, 1951, vol. 193, N 1, p. 265—275.
26. *Moran E., Eliakin M., Suchowolski A. et al.* Serum vitamin B₁₂ and glutamicoxalacetic transaminase in experimental intrahepatic obstructive jaundice. — *Gastroenterology*, 1961, vol. 4, p. 408—411.
27. *Nilius R., Schinidt N.* Pathophysiologie and Labordiagnostik der Cholestase. — *Dt. L. Verdauungs- u. Stoffwechselkrankheiten*, 1982, Bd 42, H. 6, S. 245—257.
28. *Plaa G. L., Priestly B. G.* Intrahepatic cholestasis induced by drugs and chemicals. — *Pharmacol. Rev.*, 1977, vol. 28, N 3, p. 207—273.
29. *Roger D., Priestly B. G.* Failure of hypoactive hypertrophic smooth endoplasmatic reticulum to produce cholestasis in rats. — *Toxicol. a. Appl. Pharmacol.*, 1978, vol. 45, N 1, p. 191—199.
30. *Schaffner F., Scharnbeck H., Hutterer F. et al.* Mechanism of cholestasis. 7 α -Naphthylisothiocyanate intuced jaundice. — *Lab. Investig.*, 1973, vol. 28, N 3, p. 321—331.

Б. Р. Гедулина

Рижский медицинский институт

ВЛИЯНИЕ АЦЕТАЛЬДЕГИДНОЙ ИНТОКСИКАЦИИ НА СОДЕРЖАНИЕ ЖЕЛЧНЫХ КИСЛОТ В ТКАНИ ПЕЧЕНИ КРЫС

Одной из наиболее частых причин поражения печени является отравление алкоголем [1]. Влияние ацетальдегида, первичного метаболита окисления этанола в организме, в патогенном воздействии алкоголя мало изучено, и его роль лишь недавно стала предметом научного интереса [9, 10, 12]. Тот факт, что 80% ацетальдегида, накапливаемого в организме после алкогольной интоксикации, окисляется в печени [8], доказывает, что значительные морфологические и функциональные нарушения в печени, в том числе, по-видимому, желчеобразование и желчевыделение, при алкогольной интоксикации могут быть связаны также и с действием этого сильного токсина на печень. Следует отметить, что в доступной нам литературе отсутствуют публикации, посвященные изучению влияния ацетальдегида на биосинтез желчных кислот и холестерина.

Целью нашей работы явилось исследование влияния ацетальдегида на состав и содержание желчных кислот и холестерина в печени крыс на фоне интактной печени, а также на фоне хронической алкогольной интоксикации.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДИКА ИССЛЕДОВАНИЯ

В опытах использовали крыс-самцов линии Вистар массой 180—200 г, которым перорально вводили 50%-ный раствор ацетальдегида из расчета 0,5 мл на 100 г массы тела интактных животных; параллельно раствор ацетальдегида в этой же дозе вводили крысам, хронически потреблявшим вместо питьевой воды 15%-ный этанол в течение 2 мес. Животных декапитировали под эфирным наркозом спустя 4 и 24 ч. Контролем служили в первом случае интактные животные, во втором — животные, хронически потреблявшие этанол в течение 2 мес.

В гомогенатах ткани печени методом тонкослойной хроматографии (ТСХ) на силикагеле [2] определяли содержание таурохолевой (ТХ), таурохенодезоксихолевой (ТХДХ), холевой (Х), гликохолевой (ГХ), гликохенодезоксихолевой (ГХДХ) желчных кислот (ЖК), общее количество ЖК, коэффициент гидроксилирования (отношение тригидроксижелчных к дигидроксижелчным кислотам) — $3\text{ОН}/2\text{ОН}$, коэффициент соотношения глико- и таурокоњуговатов желчных кислот (Г/Т). Содержание холестерина и эфиров холестерина определяли методом ТСХ на силикагеле [7].

Полученные данные обрабатывали статистически [6].

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Влияние ацетальдегида на метаболизм ЖК и холестерина было изучено на интактных животных и на крысах, в течение 2 мес получавших вместо воды 15%-ный этанол.

Результаты исследования общего количества ЖК, содержания индивидуальных ЖК, холестерина и его фракций в ткани печени экспериментальных животных представлены на рис. 1, 2 и в табл. 1.

Проведенные исследования показали, что через 4 и 24 ч после введения ацетальдегида здоровым животным наблюдалось, со-

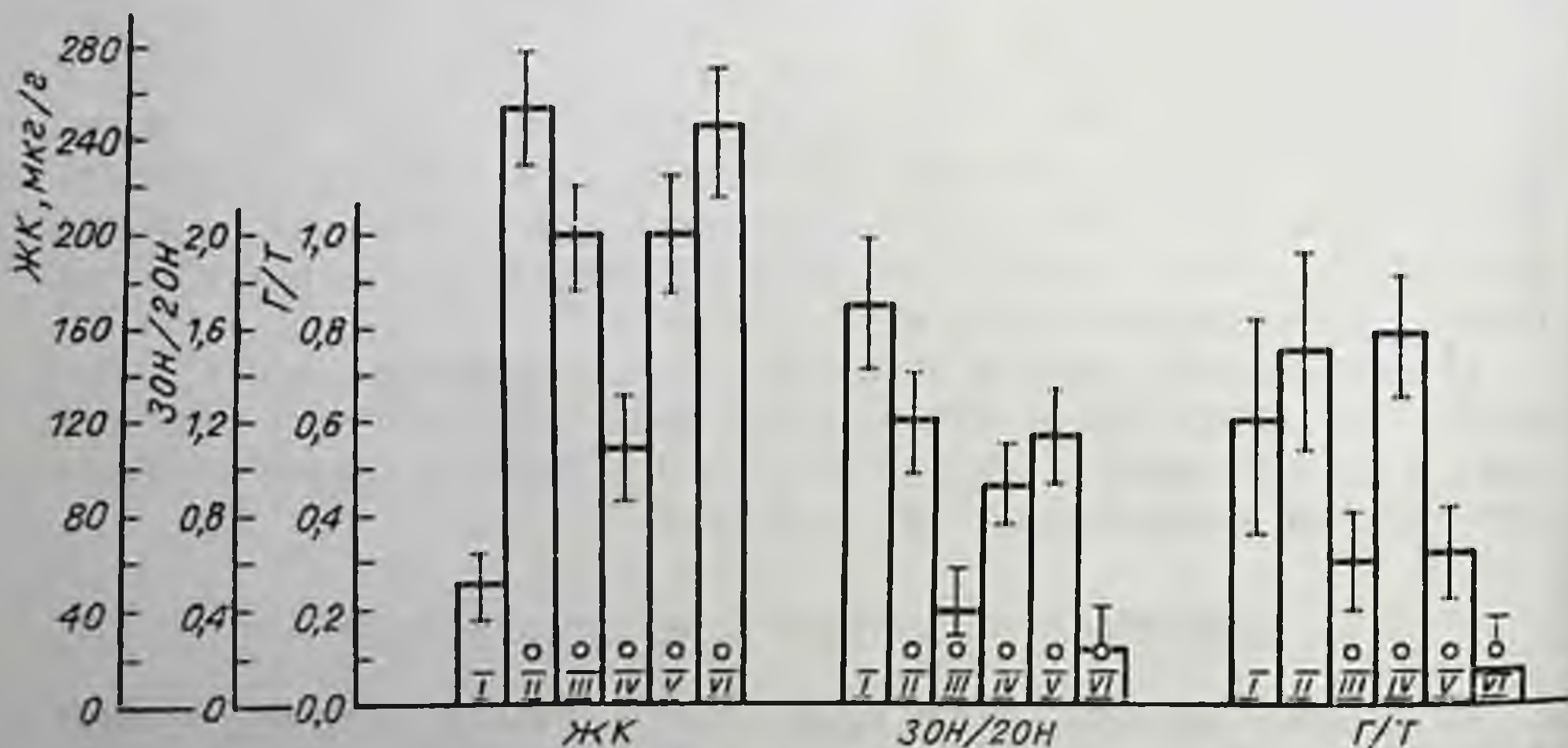


Рис. 1. Содержание общего количества желчных кислот (ЖК), коэффициент гидроксилирования ($3\text{ОН}/2\text{ОН}$), коэффициент соотношения глико- и таурокоњуговатов желчных кислот (Г/Т) в ткани печени крыс с острой интоксикацией ацетальдегидом:

I — контроль; II — через 4 ч после введения токсической дозы ацетальдегида; III — то же самое через 24 ч; IV — хроническое введение 15%-ного этанола в течение 2 мес; V — через 4 ч после введения токсической дозы ацетальдегида на фоне хронического введения этанола в течение 2 мес; VI — то же самое через 24 ч. Кружками обозначена достоверность различий по сравнению с контролем при $p < 0,05$.

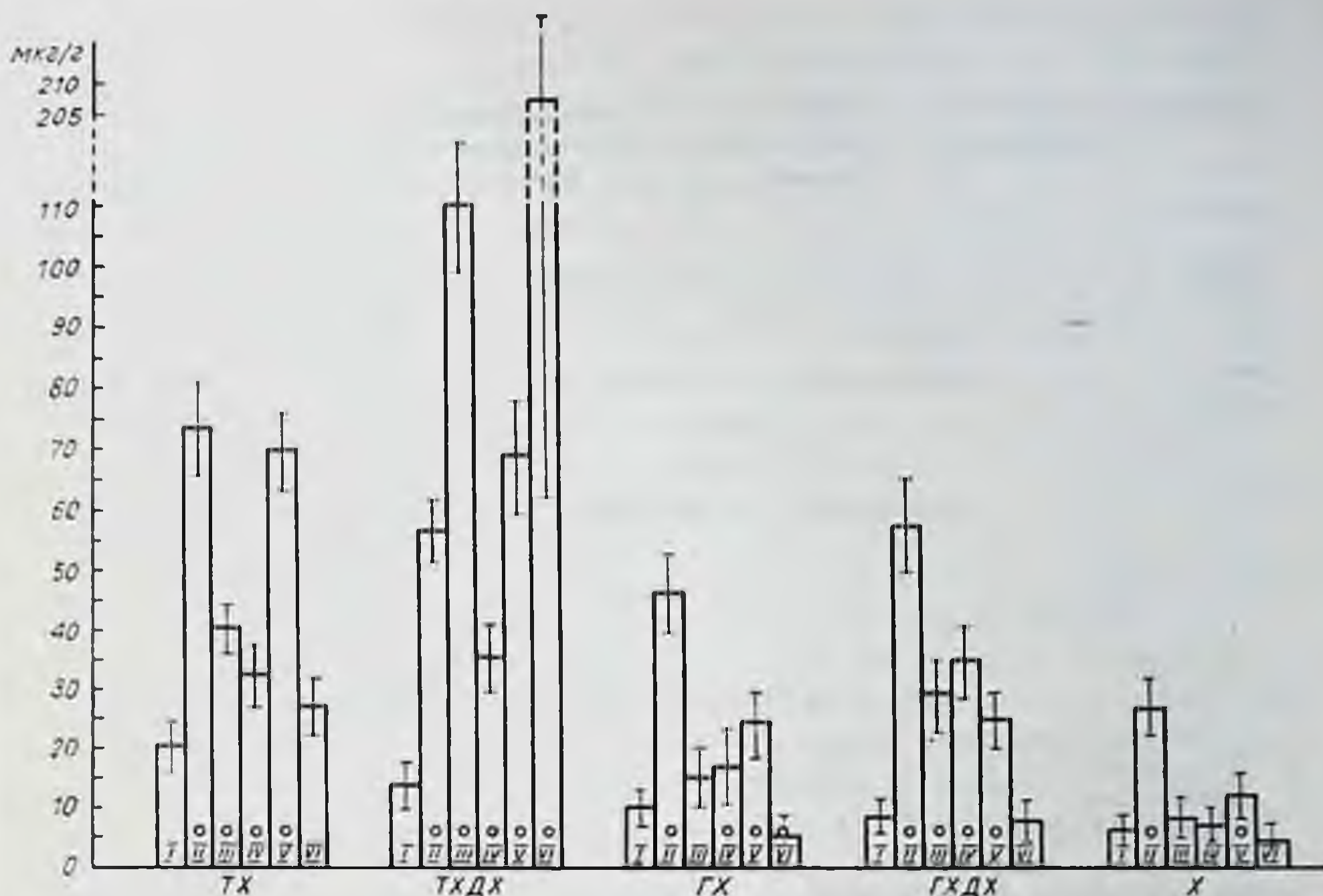


Рис. 2. Содержание индивидуальных желчных кислот в ткани печени крыс с острой интоксикацией ацетальдегидом: таурохолевой (ТХ); таурохенодезоксихолевой (ТХДХ); гликохолевой (ГХ); гликохенодезоксихолевой (ГХДХ); холевой (Х).

Обозначения такие же, как и на рис. 1. Кружками обозначена достоверность различий по сравнению с контролем при $p \leq 0,05$.

ответственно, 5- и 4-кратное увеличение общего количества ЖК по сравнению с таковым у животных контрольной группы ($p < 0,001$; $p < 0,001$). Причем это увеличение сопровождалось изменением спектра индивидуальных ЖК: в большей степени повышалось содержание конъюгатов ХДХ кислоты и, соответственно, снижался коэффициент $3ОН/2ОН$. Через 24 ч после введения ацетальдегида коэффициент $3ОН/2ОН$ снижался более чем в 4 раза и составлял $0,42 \pm 0,03$ (в контрольной группе — $1,88 \pm 0,21$). В эти же сроки эксперимента ЖК появлялись в сыворотке крови животных: через 4 ч после введения ацетальдегида ЖК выявлялись в сыворотке крови в количестве $16,6 \pm 1,9$ ммоль/л. Спустя 24 ч концентрация ГХ кислоты в ткани печени снизилась в 2 раза по сравнению с таковой в группе контрольных животных ($p < 0,05$), а содержание ТХДХ кислоты увеличилось почти в 8 раз ($p < 0,01$), коэффициент гидроксилирования составлял $0,21 \pm 0,05$, что было в 9 раз ниже, чем у контрольных животных ($p < 0,001$). ЖК в сыворотке крови в этот период эксперимента выявлялись в следовых количествах.

Таблица 1

Содержание общего, свободного и этерифицированного холестерина (мг/г) и коэффициент этерификации холестерина в ткани печени крыс с острой интоксикацией ацетальдегидом

Группа животных	Свободный холестерин	Эфиры холестерина	Общий холестерин	Коэффициент этерификации
Контроль (интактные животные) (n=18)*	2,60±0,38	2,53±0,37	5,13±0,47	0,49±0,03
Токсическая доза ацетальдегида (декапитация спустя 4 ч) (n=10)	1,57±0,23*	1,32±0,11*	2,89±0,18**	0,48±0,03
Токсическая доза ацетальдегида (декапитация спустя 24 ч) (n=8)	2,82±0,39	3,40±0,34	6,22±0,36	0,54±0,05
Контроль (хроническая алкогольная интоксикация в течение 2 мес) (n=12)	1,60±0,31	1,51±0,32**	3,11±0,31**	0,49±0,03
Токсическая доза ацетальдегида на фоне хронической алкогольной интоксикации (декапитация спустя 4 ч) (n=9)	2,78±0,33	2,24±0,12	5,09±0,21	0,45±0,02
Токсическая доза ацетальдегида на фоне хронической алкогольной интоксикации (декапитация спустя 24 ч) (n=9)	5,40±0,47**	3,22±0,18	8,62±0,35**	0,37±0,02

* n — количество животных в группе.

** Различия достоверны по сравнению с контролем при $p < 0,05$.

При введении ацетальдегида крысам было выявлено значительное снижение содержания глюкоконъюгатов ЖК. В группе животных, хронически получавших этанол и исследуемых затем через 24 ч после введения ацетальдегида, коэффициент Г/Т составлял $0,06 \pm 0,02$, что в 10 раз ниже, чем у контрольных крыс и у крыс, хронически получавших этанол ($p < 0,001$). В группах интактных животных с острым введением ацетальдегида через 24 ч и у животных с введением ацетальдегида на фоне хронического потребления этанола через 4 ч коэффициент Г/Т был ниже более чем в 2 раза, чем у контрольных животных, хронически потреблявших этанол в течение 2 мес ($p < 0,05$ и $p < 0,05$ соответственно) (см. рис. 1). Таким образом, коэффициент Г/Т достоверно понижался у трех групп животных при введении ацетальдегида; в то же время, как показали полученные нами ранее данные [3, 5], введение токсической дозы этанола при этих же условиях не влияло на содержание ЖК в печени.

Как видно из данных, представленных в табл. 1, содержание свободного холестерина и его фракций в ткани печени через 4 ч после введения ацетальдегида интактным крысам снижалось почти в 2 раза по сравнению с контролем ($p < 0,05$). Через 4 ч после введения ацетальдегида на фоне хронической интоксикации этанолом изменений, по сравнению с контролем, не было обнаружено, через 24 ч достоверно возросло содержание свободного и общего холестерина — соответственно $5,4 \pm 0,5$ и $8,6 \pm 0,5$ мг/г ($p < 0,05$).

Следует отметить, что выявленные изменения показателей холестерина и его фракций как при хроническом, так и при однократном введении токсической дозы этанола [5] не столь значительны, как количественные и качественные изменения ЖК, что подтверждает имеющиеся предположения о роли ЖК в сохранении постоянства концентрации холестерина в печени [13] и, по-видимому, играет определенную роль в сохранении нормального функционирования мембран как в норме, так и при различных поражениях печени.

Наши исследования показали, что токсическое действие ацетальдегида на показатели ЖК и холестерина у крыс более выражено, чем действие токсических доз самого этанола [5]. При введении ацетальдегида на фоне хронической алкогольной интоксикации, особенно через 24 ч, наблюдаются более сильные изменения, чем у животных, которым вводили ацетальдегид на фоне интактной печени. Коэффициент ЗОН/2ОН снижается в этой группе почти в 10 раз по сравнению с таковым у животных контрольной группы (см. рис. 1). Таким образом, хроническое введение этанола не предотвращает значительных изменений при введении ацетальдегида, как это наблюдается при введении токсической дозы этанола [3, 5], а, наоборот, усугубляет и усиливает изменения состава ЖК и их гидроксилирования. Следует

отметить, что данные, представленные в [11], подтверждают наши результаты. Авторы обнаружили, что действие экзогенного ацетальдегида на микросомы усиливает токсическое действие ацетальдегида, образованного в организме из этанола при хроническом его потреблении. По всей видимости, ацетальдегид, накапливаясь в организме в значительных количествах при хронической алкогольной интоксикации, вызывает выраженные нарушения гидроксилирующей и экскреторной функций печени.

Выявленное нами значительное повышение концентрации дигидроксижелчных кислот, являющихся сильными детергентами как в ранние, так и в более поздние сроки интоксикации ацетальдегидом, а также, как ранее нами было показано, этанолом [5] и аллиловым спиртом [4], по всей видимости, связано с тем, что введение экзогенных веществ усиливает микросомальные процессы детоксикации; при этом, вероятно, конкурентно снижается гидроксилирование ЖК, в первую очередь в положении 12- α , что приводит к значительному накоплению дигидроксихолановых кислот. Полученные нами результаты совпадают с данными ряда авторов, выявивших при печеночно-клеточном поражении в первую очередь угнетение активности фермента 12- α гидроксилазы, в результате чего растет продукция ХДХ кислоты [14].

Оценивая полученные результаты, следует отметить, что столь значительное увеличение общего количества ЖК в ткани печени и особенно более активных детергентов — дигидроксихолановых кислот — может приводить к ослаблению гидрофобных липидбелковых взаимодействий мембран ультраструктур гепатоцитов, в том числе микросом и митохондрий [15], изменению структурно-функциональных мембран и изменению активности мембранно-связанных ферментных систем клетки [16].

Таким образом, результаты проделанной работы свидетельствуют о наличии значительных изменений качественного и количественного состава ЖК при введении ацетальдегида, что доказывает его важную роль в патогенезе поражений печени, особенно при приеме токсических доз этанола при хроническом алкоголизме.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Блюгер А. Ф., Максимова Л. А., Карташова О. Я. и др. Исследование механизма влияния алкоголя на печень на примере острого алкогольного гепатита — В кн.: Успехи гепатологии. Рига, 1977, вып. 7, с. 202—221.
2. Блюгер А. Ф., Гедулина Б. Р., Максимова Л. А., Смоголь В. А. Метод изучения содержания желчных кислот в биологических тканях. — Лаборатор. дело, 1979, № 12, с. 738—741.
3. Гедулина Б. Р. Исследование содержания желчных кислот в ткани печени крыс при острой и хронической алкогольной интоксикации. — В кн.: Вопросы биохимии патологических процессов. Рига, 1979, с. 7—10.

4. Гедулина Б. Р., Залцмане В. К. Влияние аллилового спирта на метаболизм желчных кислот и ультраструктуру клеток печени крыс. — Патол. физиология и эксперим. терапия, 1982, № 3, с. 53—57.
5. Гедулина Б. Р., Максимова Л. А. Изменение метаболизма желчных кислот у крыс при алкогольной интоксикации. — В кн.: Клеточная и субклеточная экспериментальная патология печени. Рига, 1982, с. 10—15.
6. Плохинский Н. А. Биометрия. М., 1970. 362 с.
7. Dabels J., von. Erfahrungen mit einer Dünnschichtchromatografischen Methode zur quantativen Neutralfettbestimmung in Serum. — Ztschr. Inn. Med., 1970, Bd 25, N 4, S. 391—394.
8. Erikson C. J., Sippel H. W. The disturbance and metabolism of acetaldehyde in rats during ethanol oxidation. — J. Biochem. Pharmacol., 1977, vol. 26, p. 241—247.
9. Grant L., Powis G. The effect of inhibitors of alcohol metabolism on the changes in the hepatic microsomal metabolism of foreign compounds produced by a single dose of ethanol in the rat. — Brit. J. Pharm., 1976, vol. 56, N 3, p. 376—377.
10. Lundquist F., Grunnet N., Damgaard S., Thieden H. Metabolism of ethanol hydrogen in mammals. — Trends Biochem. Sci., 1977, vol. 2, N 8, p. 173—175.
11. Nomura F., Lieber C. Binding of acetaldehyde to rat liver-microsomes: enhancement after chronic alcohol consumption. — Biochemistry, 1981, vol. 100, N 1, p. 137—140.
12. Popper H. L., Schaffner F. Structural studies in alcohol and drug induced liver injury. — In: Alcoholic cirrhosis and other toxic hepatopathias. Stockholm, Sil. Sugel, 1970, p. 15—46.
13. Reynier M. O., Matean Ch., Vigne J. L., Mule A. Action of free bile acids on hepatic and intestinal cholesterolgenesis in the rat. — Lipids, 1977, vol. 12, N 3, p. 254—257.
14. Sanson R. F., Staples A. B., Ellis G., Levitt M. D. Bile acid metabolism in the cirrhotic rat. — Lab. Investig., 1979, vol. 41, N 6, p. 500—503.
15. Sarya R. P., Fromm H., Farivar S. et al. Comparison of the effects between ursodeoxycholic acids and chenodeoxycholic acids on liver function in the Rhesus monkey. — Gastroenterology, 1980, vol. 79, p. 629—636.
16. Simon F. R., Sutherland E., Davis R. A. Studies of the liver surface membrane in the pathogenesis of intrahepatic cholestasis. — In: Problems in intrahepatic cholestasis. 2nd Intern. symp. Florence, 1978, p. 30—37.

Э. С. Горштейн

Рижский медицинский институт

СООТНОШЕНИЕ СОДЕРЖАНИЯ
ЦИТОХРОМА P-450 В МИКРОСОМАХ ПЕЧЕНИ
С НЕКОТОРЫМИ БИОХИМИЧЕСКИМИ
ПОКАЗАТЕЛЯМИ СЫВОРОТКИ КРОВИ
ПРИ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОМ
ГЕПАТОЗОГЕПАТИТЕ И ХОЛЕСТАЗЕ

Биотрансформация и детоксикация промышленных и сельскохозяйственных ядохимикатов, лекарственных препаратов и других ксенобиотиков, а также многих эндогенных субстратов стероидной природы осуществляется преимущественно микросомальной монооксигеназной системой (ММС) печеночных клеток. ММС представляет собой встроенный в эндоплазматический ретикулум ферментный комплекс, чрезвычайно чувствительный к повреждениям данной мембранной структуры [5, 11]. Нарушение функциональной активности ММС, в свою очередь, может повлечь за собой изменение фармакологического действия лекарственных препаратов, повышение концентрации токсических метаболитов в крови, изменение гормонального фона организма и другие сдвиги химического гомеостаза.

Прямым показателем, характеризующим интегральный функциональный статус ММС, может служить концентрация в печени основного компонента ферментной системы — цитохрома P-450.

Мы попытались определить, как изменения содержания цитохрома P-450 при двух экспериментальных моделях поражения печени — внутрипеченочном холестазе и гепатозогепатите — соотносятся с другими биохимическими показателями функционального состояния паренхимы печени.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДИКА ИССЛЕДОВАНИЯ

Эксперимент проводили на крысах-самцах линии Вистар массой 200—250 г. Животным первой группы внутримышечно вводили CCl_4 в дозе 0,16 мг на 100 г массы, биохимические показатели определяли через 1, 2 и 3 сут после отравления. Контролем служили животные, которым вводили физиологический раствор.

Животным второй группы перорально вводили α -нафтилизотиоцианат (АНИТ) в дозе 10 мг на 100 г массы в виде 4%-ного раствора в оливковом масле. Биохимические показатели определяли через 1, 2, 3, 5 и 7 сут после отравления. Контролем служили животные, получавшие масло.

Животных обескровливали под легким эфирным наркозом. В микросомальной фракции печени, выделенной путем ультрацентрифугирования на 1,15%-ном КСI при 105 тыс. г, определяли содержание цитохрома Р-450 [13] и белка [12].

В сыворотке крови определяли активность щелочной фосфатазы (ЩФ), аланинаминотрансферазы (АлАТ) [7] и содержание билирубина (Merco-test).

Полученные данные обрабатывали методами вариационной статистики [4].

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

CCl_4 и АНИТ — гепатотропные яды, поражение которыми приводит к развитию двух различных патологических процессов в печени.

Острое отравление CCl_4 в зависимости от дозы введенного яда вызывает либо ожирение и некроз ткани печени, либо только жировую дистрофию органа. Множество публикаций, посвященных анализу механизма действия CCl_4 на гепатоциты, убедительно свидетельствует о том, что данный яд в первую очередь воздействует на мембраны эндоплазматического ретикулума [1]. Связываясь в качестве субстрата с цитохромом Р-450, CCl_4 метаболизируется с образованием свободных радикалов — трихлорметина и хлорина. Реактивные метаболиты CCl_4 и индуцированные ими перекиси липидов, с одной стороны, вызывают нарушение биосинтеза белка в рибосомах, в результате чего возникает жировая инфильтрация в печени [1]; с другой стороны, свободные радикалы ковалентно реагируют с макромолекулами внутриклеточных и цитоплазматических мембран, нарушая их проницаемость и вызывая тем самым лизис гепатоцитов [10].

На рис. 1 показана динамика изменений биохимических показателей сыворотки крови при поражении печени CCl_4 . В то время как содержание билирубина и активность ЩФ не изменяются с 1-х по 3-и сутки эксперимента, активность АлАТ резко возрастает, достигая 4-кратной величины уже к концу 1-х суток.

Представленные результаты свидетельствуют о цитолитическом процессе в паренхиме печени, разгар которого приходится на 2-е сутки после интоксикации. Судя по неизменной активности ЩФ и нормальному содержанию билирубина, процессы

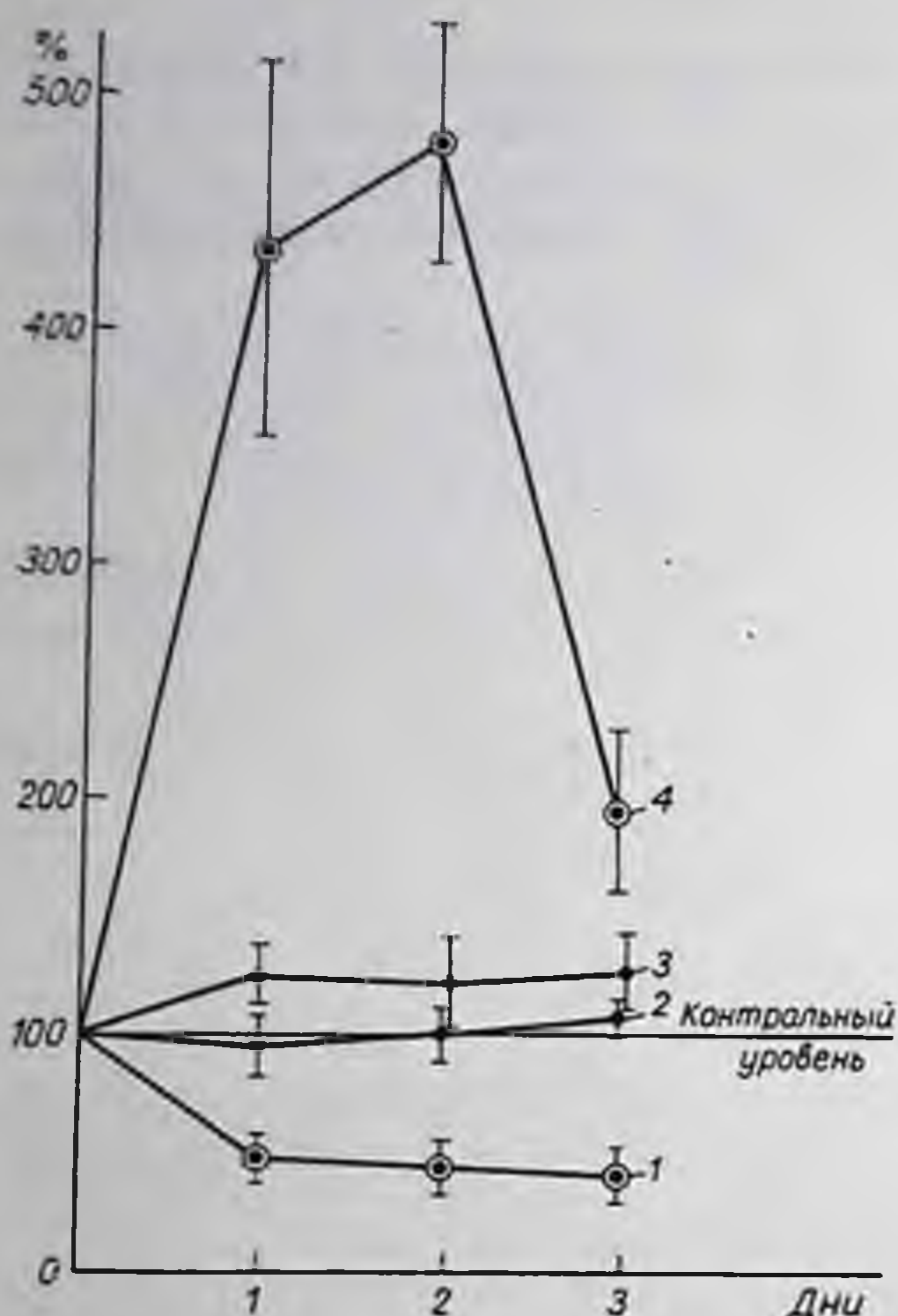


Рис. 1. Изменение содержания цитохрома Р-450 в печени и биохимических показателей сыворотки крови крыс, пораженных CCl_4 (% от контрольного уровня).

Здесь и на рис. 2 кружками отмечены группы наблюдений, отличающиеся от контроля при $p \leq 0.05$. 1 — Р-450, 2 — ЩФ, 3 — билирубин, 4 — АЛТ.

желчеобразования и желчевыведения при поражении печени CCl_4 не нарушаются.

Существенное влияние CCl_4 оказывает на ММС. На рис. 1 отражено значительное снижение концентрации цитохрома Р-450 в паренхиме печени, имеющее даже более затяжной характер, чем процесс цитолиза. На 3-и сутки содержание цитохрома Р-450 составляет $0,40 \pm 0,03$ нмоль/мг белка (42% от исходного уровня). Объясняется это, по-видимому, тем, что радикалы CCl_4 , образуясь непосредственно в ММС, действуют прежде всего на компоненты этой ферментной системы. Снижение содержания цитохрома Р-450, в свою очередь, может тормозить образование свободных радикалов и последующее развитие некробиоза.

Действие АНИТ в отличие от CCl_4 прежде всего направлено на механизмы образования и выведения желчи, в результате чего складывается общая картина внутрипеченочного холестаза [6, 14]. Морфологически это проявляется в дилатации и пролиферации желчных протоков и канальцев. Другим проявлением действия АНИТ является повышение активности трансаминаз в сыворотке крови, связанное, по-видимому, с нарушением ультраструктуры цитоплазматической мембраны [6].

На рис. 2 показана динамика изменения биохимических показателей сыворотки крови при отравлении крыс АНИТ. Зна-

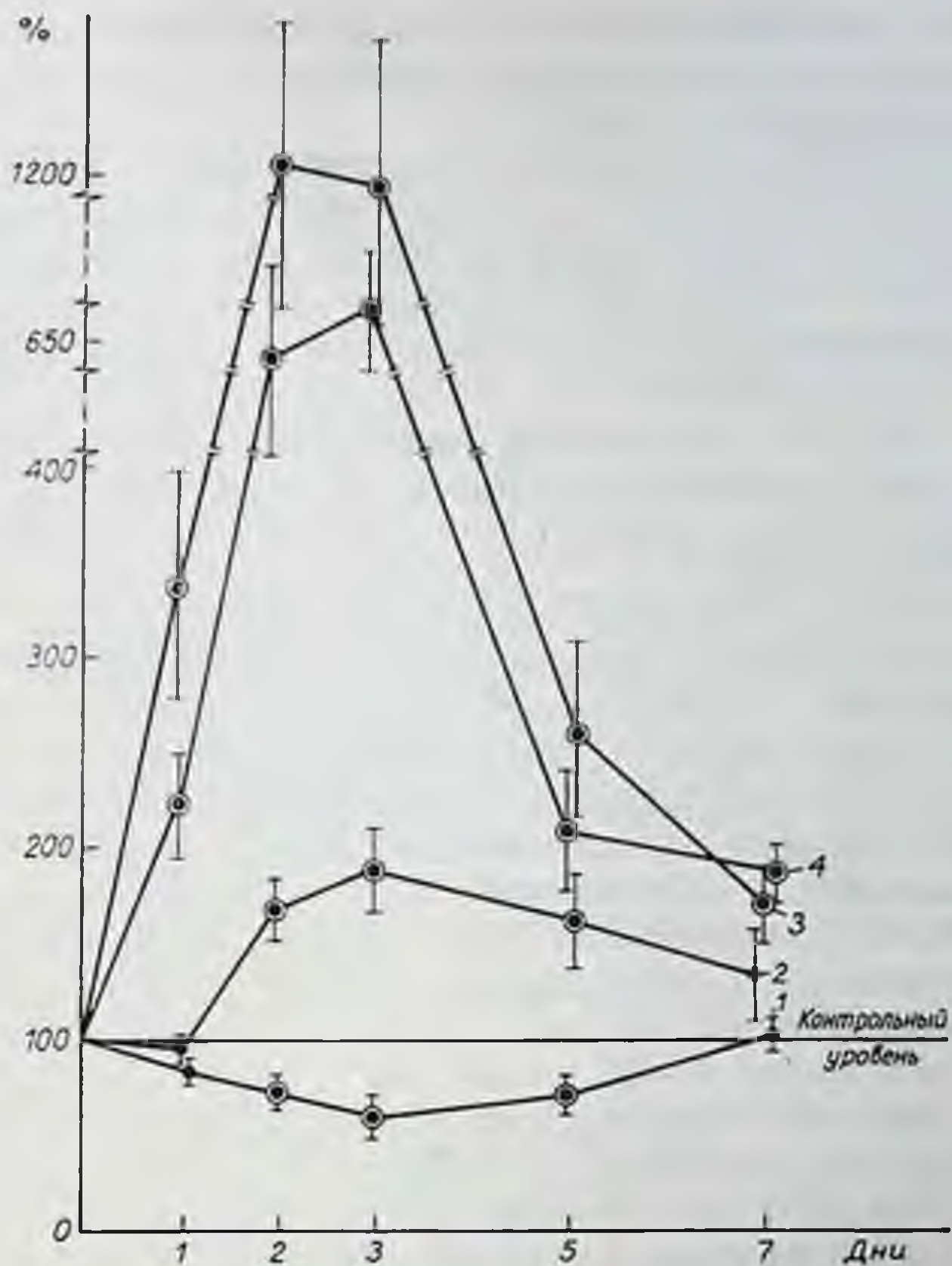


Рис. 2. Изменение содержания цитохрома Р-450 в печени и биохимических показателей сыворотки крови крыс, пораженных АНИТ (% от контрольного уровня).

чительная гипербилирубинемия, свидетельствующая о нарушении поглотительно-выделительной функции гепатоцитов [14], обнаружена уже в 1-е сутки эксперимента; судя по активности АЛТ, цитолитиз также выражен к концу 1-х суток, достигая максимума на 2-е и 3-и сутки. Биохимические признаки холестаза нарастают позднее, к концу 2-х суток, и проявляются в повышении активности ЩФ на фоне имеющейся уже к этому времени гипербилирубинемии. Нормализация показателей сыворотки крови происходит между 5-ми и 7-ми сутками, хотя к концу этого периода окончательно не завершается.

АНИТ, как и CCl_4 , вызывает поражение ММС. Значительное снижение концентрации цитохрома Р-450 в печени выявляется к концу 2-х суток, а к концу 3-х составляет $0,57 \pm 0,08$ нмоль/мг белка (58% от контрольного уровня). Содержание цитохрома

P-450 полностью возвращается к исходному уровню к концу 7-х суток в отличие от содержания билирубина и повышенной еще в это время активности АлАТ.

Снижение функциональной активности ММС при отравлении АНИТ вызвано, очевидно, тем, что АНИТ является субстратом цитохрома P-450 и окисляется в ММС; при этом исходное вещество или его токсический метаболит могут остаться связанными с эндоплазматическим ретикуломом, препятствуя метаболизму других субстратов [15].

Таким образом, поражение мембран эндоплазматического ретикулула при воздействии CCl_4 и АНИТ на печень приводит к изменениям в ММС, в результате которых снижается содержание цитохрома P-450.

Сопоставление динамики изменения концентрации фермента с другими показателями функциональной активности паренхимы печени позволяет сделать заключение о том, что, во-первых, снижение содержания цитохрома P-450 коррелирует с биохимическими показателями холестаза (поражение печени АНИТ) — гипербилирубинемией и повышением активности ЩФ. Это связано, по-видимому, с действием больших концентраций желчных кислот в печени, которые, как показано в опытах *in vitro*, могут вызвать диссоциацию компонентов ММС, а затем — инактивацию и солюбилизацию цитохрома P-450 [9]. Во-вторых, концентрация цитохрома P-450 может быть снижена на фоне нормального содержания билирубина и активности ЩФ в сыворотке крови (поражение печени CCl_4). Наибольшие изменения ММС при этом совпадают по времени с максимальным повышением активности АлАТ. Поражение ММС имеет место также при других моделях цитолиза печеночных клеток [2, 3, 8] и, возможно, является следствием инициирования свободнорадикальных реакций в эндоплазматическом ретикулуле, а также результатом действия высвобождающихся лизосомальных гидролаз.

Таким образом, снижение содержания цитохрома P-450 может быть чувствительной реакцией ММС на прямое действие ядов и их метаболитов, а также может явиться следствием развития синдромов холестаза и цитолиза.

На стадии восстановления паренхимы печени возвращение содержания цитохрома P-450 к исходному уровню может значительно отставать от нормализации активности АлАТ (поражение CCl_4), но может и опережать восстановление других биохимических показателей (поражение АНИТ).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Арчаков А. И., Карузина И. И. Молекулярные механизмы взаимодействия четыреххлористого углерода с мембранами эндоплазматического ретикулума печени. — В кн.: Успехи гепатологии. Рига, 1973, вып. 4, с. 39—59.
2. Дудник Л. Б., Тихазе А. К., Алесенко А. В. и др. Изменение активности супероксиддисмутазы и глутатионпероксидазы в процессе интенсификации перекисного окисления липидов при ишемии печени. — Бюл. эксперим. биологии и медицины, 1981, № 4, с. 451—453.
3. Копылова Т. Н., Вицупе З. В. Перекисное окисление липидов при острым токсическом поражении печени. — В кн.: Биохимия патологических процессов. Рига, 1978, с. 58—61.
4. Лакин Г. Ф. Биометрия. М., 1980. 293 с.
5. Ляхович В. В., Цырлов И. Б. Структурные аспекты биохимии монооксигеназ. Новосибирск, 1978, 213 с.
6. Майоре А. Я., Горштейн Э. С., Кузнецова А. В. и др. Некоторые аспекты гепатотропного действия α -нафтилизотиоцианата. — В кн.: Экспериментальная патология печени. Рига, 1983, с. 77—86.
7. Методические указания по применению унифицированных клинических лабораторных методов исследования. М., 1973. 90 с.
8. Снiedzе Т. Н., Бакане И. Я., Майоре А. Я. Исследование механизмов действия аллилового спирта на лизосомы печени. — В кн.: Биохимическая характеристика патологических процессов. Рига, 1980, с. 40—46.
9. Denk H., Schenkman J. B., Bachin P. G. et al. A comparison between the effects of detergents. The effects of bile acids and the findings in bile duct ligation rats. — Experimental Molecular Pathol., 1971, vol. 14, N 2, p. 263—276.
10. Farber J. L. Molecular mechanisms of toxic cell death. — In: Scientific basis of toxicity assess. Proc. symp. Gatlinburg, 1979. Amsterdam, 1980, p. 201—210.
11. Kato R. Drug metabolism under pathological and abnormal physiological states in animals and man. — Xenobiotica, 1977, vol. 7, N 1/2, p. 25—92.
12. Lowry O. H., Rosebrough N., Farr L., Randall R. Protein measurement with the folin phenol reagent. — J. Biol. Chem., 1951, vol. 193, N 1, p. 265—275.
13. Omura T., Sato R. The carbon monoxide-binding pigment of liver microsomes. I. Evidence for its hemoprotein nature. — J. Biol. Chem., 1964, vol. 239, N 7, p. 2370—2378.
14. Plaa G. L., Priestly B. G. Intrahepatic cholestasis induced by drugs and chemicals. — Pharmacol. Rev., 1976, vol. 28, N 3, p. 207—273.
15. Schaffner F., Scharnbeck H., Hutterer F. et al. Mechanism of cholestasis. 7. α -Naphthylisothiocyanate induced jaundice. — Lab. Investig., 1973, vol. 28, N 3, p. 321—331.

Л. Б. Дудник, А. Я. Майоре

Рижский медицинский институт

ГИПЕРБИЛИРУБИНЕМИЯ КАК ФАКТОР ЗАЩИТЫ
ЛИПИДОВ БИОЛОГИЧЕСКИХ МЕМБРАН
ОТ ПЕРЕКИСНОГО ОКИСЛЕНИЯ
ПРИ ОСТРОМ ВИРУСНОМ ГЕПАТИТЕ
И НЕКОТОРЫХ ДРУГИХ ПАТОЛОГИЧЕСКИХ
И ФИЗИОЛОГИЧЕСКИХ СОСТОЯНИЯХ

Одним из наиболее характерных синдромов при заболеваниях печени (а также при поражениях желчных путей и системы эритропоэза) является желтуха. Общий для всех видов желтух биохимический признак — повышение уровня билирубина в крови. Поскольку известно, что билирубин может оказывать на организм токсическое действие (например, вызывать необратимые поражения центральной нервной системы у новорожденных), гипербилирубинемия рассматривается обычно как отрицательное явление, а больным назначают терапевтическое лечение, направленное на снижение уровня билирубина в крови.

Однако имеется ряд публикаций, в которых показано, что билирубин в модельных системах эффективно тормозит свободнорадикальные реакции и, следовательно, может выполнять функции природного антиоксиданта в защите липидов биологических мембран от перекисного окисления.

Перекисное окисление липидов (ПОЛ) как универсальный фактор повреждения мембранных структур клетки играет существенную роль в патологии печени, поскольку цитолитический синдром (повышение проницаемости мембран гепатоцитов) наблюдается при большинстве заболеваний печени. Не исключено, что гипербилирубинемия, сопровождающая эти заболевания, может явиться фактором, направленным на снижение интенсивности ПОЛ и, соответственно, на сохранение структуры и функций мембран гепатоцитов. Ниже приводятся краткий обзор литературных данных, подтверждающих это предположение, а также результаты, полученные авторами данной статьи при исследовании зависимости интенсивности ПОЛ в сыворотке крови от уровня билирубинемии при остром вирусном гепатите.

Предположение, что биологическая роль билирубина может определяться его антиоксидантными свойствами, впервые было высказано К. Бернхардом с соавт. в 1954 году [2]. Авторы обнаружили, что небольшие добавки билирубина эффективно ингибируют *in vitro* окисление витамина А, каротина, линолевой кислоты. Кроме того, в экспериментах *in vivo* было показано, что у животных с желчной фистулой, когда нарушается поступление билирубина в кишечник, происходит полное разрушение попадающих с пищей витамина А и каротина. Это разрушение не предотвращалось введением других компонентов желчи, но исчезало при введении антиоксиданта — токоферола.

Х. Кауфман и Х. Гарлофф [3] изучали кинетику поглощения кислорода при окислении эмульсий метиллинолеата; при этом было показано, что антиокислительная активность билирубина примерно равна активности α -токоферола и в 4—5 раз превышает активность убихинонов Q_6 и Q_{10} .

Данные двух упомянутых выше работ свидетельствуют о том, что билирубин может ингибировать перекисное окисление, ре-

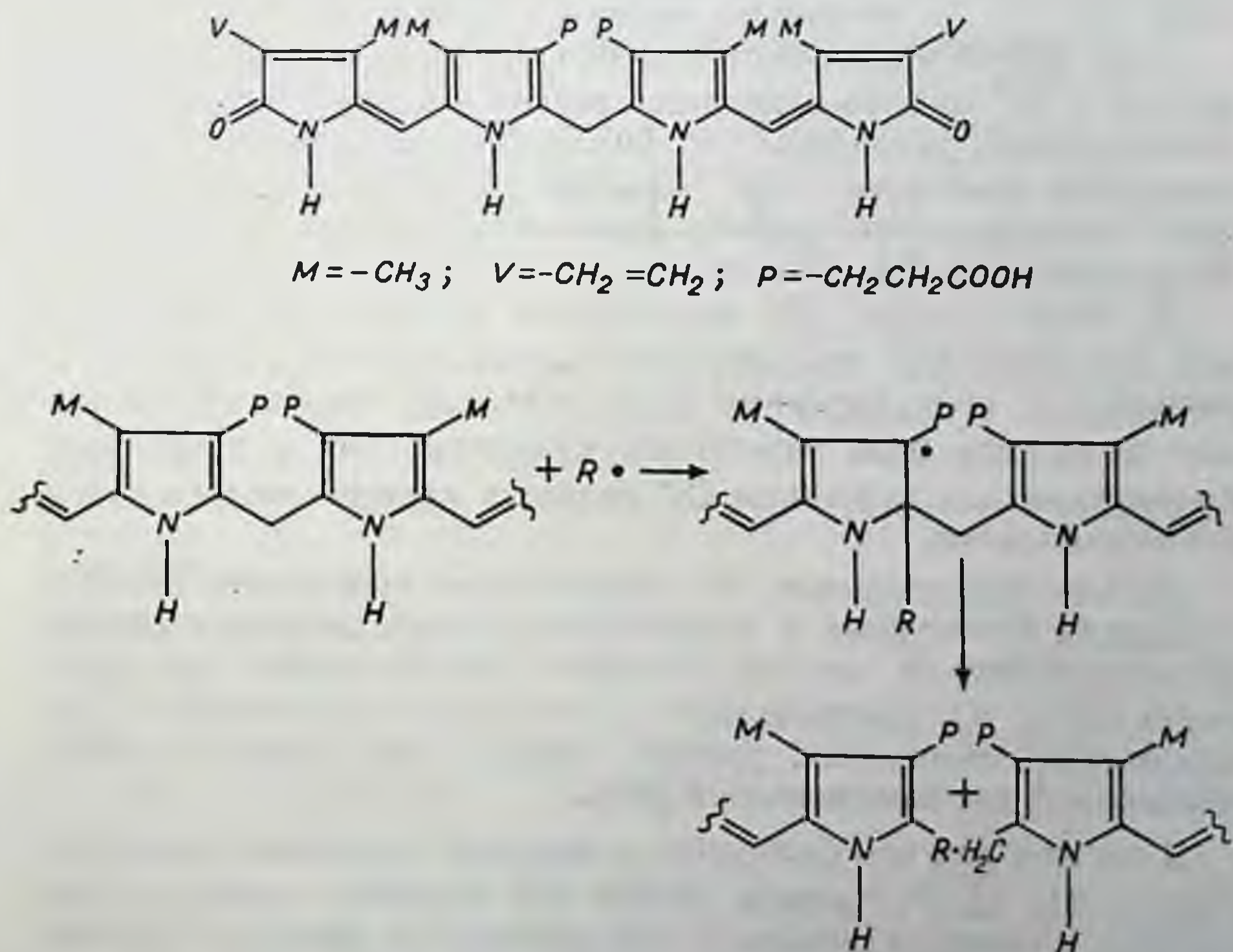


Рис. 1. Структурная формула билирубина IX- α и схема его реакции со свободным радикалом ($R\cdot$).

агируя с гидроперекисными радикалами, либо восстанавливая гидроперекиси, т. е. на стадии обрыва или разветвления цепей окисления. Схема реакции билирубина со свободным радикалом [8] приведена на рис. 1.

В связи с применением в медицинской практике метода светолечения желтухи новорожденных в последние годы появился ряд публикаций, посвященных фотокислению билирубина. Установлено, что активным интермедиа́том в процессе разрушения пигмента являются активные формы кислорода — синглетный кислород $^1\text{O}_2$ и супероксидный анион-радикал $\text{O}_2^{\bullet-}$. Известно, что $\text{O}_2^{\bullet-}$ и $^1\text{O}_2$ являются агентами, инициирующими цепи свободно-радикального окисления, т. е. реагируя с «активным» кислородом, билирубин может существенно влиять на скорость инициирования ПОЛ. В работах ряда авторов [7, 9] приводятся значения константы скорости тушения и реакции $^1\text{O}_2$ с билирубином порядка $10^8 - 10^9$ л·моль $^{-1}$ ·с $^{-1}$. Тот факт, что билирубин взаимодействует с $^1\text{O}_2$ с такой высокой скоростью, позволяет предположить, что он подвергается атаке $^1\text{O}_2$ раньше других клеточных компонентов. Так, например, установлено, что холестерин в липосомах, содержащих билирубин, не подвергается фотоокислению [6].

При определении константы скорости взаимодействия билирубина с $\text{O}_2^{\bullet-}$ *in vitro* в процессе реакции, катализируемой ксантиноксидазой, оказалось, что билирубин с достаточно высокой скоростью реагирует с $\text{O}_2^{\bullet-}$; перехват же $\text{O}_2^{\bullet-}$ супероксиддисульфатом подавлял этот процесс. Константа скорости реакции при 23°С равнялась $2,3 \cdot 10^4$ л·моль $^{-1}$ ·с $^{-1}$ [10].

Р. Каул с соавт. [4] исследовали деградацию билирубина под действием $\text{O}_2^{\bullet-}$, генерируемого системой ксантин—ксантиноксидаза *in vivo*. Авторами было показано, что билирубин может выполнять роль эндогенной «ловушки» $\text{O}_2^{\bullet-}$, а деградация билирубина под действием $\text{O}_2^{\bullet-}$ является альтернативным путем его метаболизма.

Можно предположить, что таким путем происходит обмен и экскреция билирубина у людей и животных с дефектом глюкуронилтрансферазы, так как показано, что билирубин при окислении $\text{O}_2^{\bullet-}$ и $^1\text{O}_2$ превращается в полярные метаболиты — дипирроловые соединения, уровень которых при дефектах конъюгационной системы повышен [11].

В связи с тем что билирубин с высокой скоростью реагирует с $\text{O}_2^{\bullet-}$ и $^1\text{O}_2$, Ц. Р. Кришна Мурти [5] выдвинул гипотезу, что желтуха у новорожденных — это проявление процесса адаптации к гипербарическому стрессу, который возникает при переходе от частично анаэробных условий существования плода

в матке к нормоксическим условиям. Защитной биохимической реакцией от такого стресса является индукция гемоксигеназной активности, которая приводит к быстрому разрушению гема эритроцитов материнской крови до билирубина, который, в свою очередь, начинает выполнять роль эндогенной «ловушки» для O_2^{\bullet} и 1O_2 , в большом количестве генерируемых в условиях гипербарического стресса. Свободный билирубин, который в значительных количествах остается неконъюгированным из-за низкой активности глюкуронилтрансферазы микросом печени у новорожденных, либо связывается с липопротеидами крови и, попадая с кровотоком в мозг, производит там необратимые нарушения, либо связывается с коллагеном кожи и позже подвергается естественному или терапевтическому фоторазрушению до полярных метаболитов, которые легко экскретируются.

Из представленных литературных данных можно заключить, что билирубин, по-видимому, является существенным фактором в защите липидов биологических мембран от перекисного окис-

Таблица 1

Изменение биохимических показателей
при различных формах тяжести острого вирусного гепатита

Показатель ($M \pm m$)	Практически здоровые доноры ($n = 35$)	Больные ВГ		
		Легкая форма ($n = 29$)	Среднетяжелая форма ($n = 34$)	Тяжелая форма ($n = 12$)
Активность аланинамино- трансферазы, ммоль/ч мл	$0,4 \pm 0,3$	$6,0 \pm 0,4^*$	$6,8 \pm 0,5^*$	$8,4 \pm 0,5^*$
Содержание общего били- рубина, мг%	$0,9 \pm 0,4$	$5,1 \pm 0,3^*$	$7,9 \pm 0,4^*$	$13,7 \pm 1,8^*$
Содержание свободного билирубина, мг%	$0,9 \pm 0,4$	$1,5 \pm 0,1$	$2,8 \pm 0,2^*$	$3,7 \pm 0,5^*$
Содержание дненовых конъюгатов, $E_{233}/мг$ липидов	$1,4 \pm 0,1$	$1,5 \pm 0,1$	$1,1 \pm 0,1^*$	$0,7 \pm 0,1^*$
Антиокисли- тельная активность липидов, $ч/г/мл \cdot 10^{-3}$	$-1,28 \pm 0,28$	$-1,70 \pm 0,33$	$-0,96 \pm 0,22$	—

* Различие с соответствующим показателем у группы практически здоровых доноров достоверно ($p < 0,05$).

ления при различных физиологических и патологических состояниях. В связи с этим мы исследовали влияние билирубина на изменение некоторых параметров перекисного окисления липидов при остром вирусном гепатите (ВГ) — патологии печени, когда наблюдается лабильзация мембран гепатоцитов (цитолитический синдром) и гипербилирубинемия (желтуха), усиливающиеся с нарастанием степени тяжести заболевания.

Данные обследования 75 больных ВГ (А и В) различной степени тяжести приведены в табл. 1. Содержание одного из первичных продуктов ПОЛ — дневных конъюгатов в липидах сыворотки крови больных — снижалось в зависимости от тяжести заболевания. Некоторое повышение содержания дневных конъюгатов (в 1,1 раза по сравнению с таковым у практически здоровых доноров) наблюдалось лишь при легкой форме ВГ, при среднетяжелой форме ВГ содержание дневных конъюгатов снижалось в 1,3 раза по сравнению с его содержанием при лег-

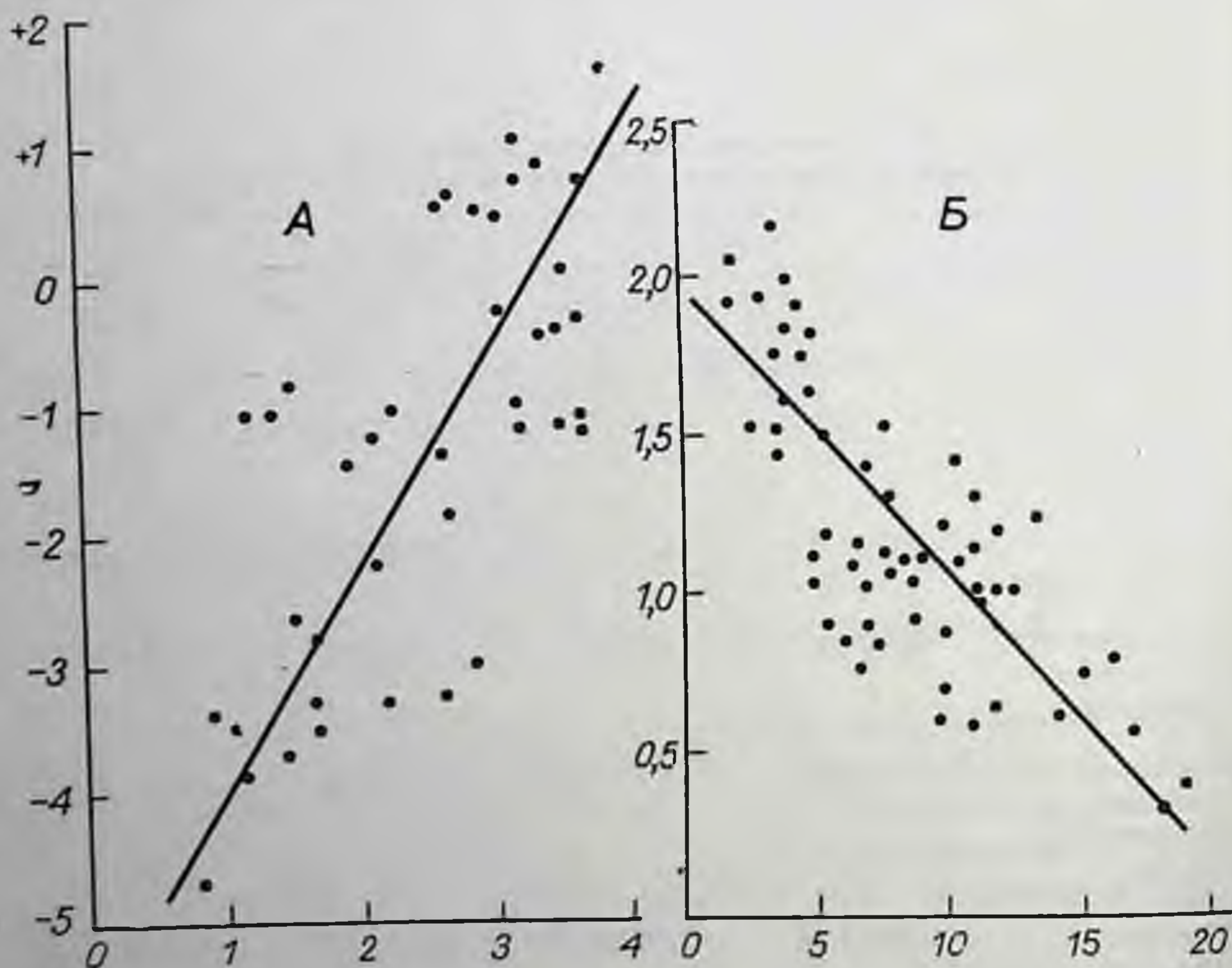


Рис. 2. Зависимость антиокислительной активности липидов (А) и степени окисленности липидов (Б) от содержания билирубина в сыворотке крови больных острым вирусным гепатитом.

По оси абсцисс — содержание свободного (А) и общего (Б) билирубина, мг%. По оси ординат: А — антиокислительная активность липидов, $\text{ч/г/мл} \cdot 10^{-1}$ и Б — содержание дневных конъюгатов, $E_{223}/\text{мг}$ липидов.

кой форме ВГ и в 1,5 раза — по сравнению с таковым у здоровых доноров, а при тяжелой форме заболевания снижалось, соответственно, в 2,5 и 2,2 раза.

Антиокислительная активность липидов, отражающая уровень природных антиоксидантов у больных ВГ средней тяжести, имела тенденцию к повышению по сравнению с нормой и была существенно повышена по сравнению с таковой у больных легкой формой ВГ. Может показаться парадоксальным, что с усилением степени тяжести ВГ, когда в крови больных наблюдается прогрессирующее повышение активности индикаторных ферментов (см. табл. 1), свидетельствующее о возрастающей лабильности мембран гепатоцитов, не наблюдается интенсификации ПОЛ. Однако уровень билирубина — ингибитора свободнорадикального окисления — с усилением степени тяжести ВГ также возрастает. Для исследования влияния билирубина на интенсивность ПОЛ нами был проведен корреляционный анализ. Как видно из рис. 2, между содержанием общего билирубина и дневных конъюгатов существует обратная, а между уровнем антиокислительной активности липидов и липидорастворимого свободного билирубина — прямая корреляция ($R = -0,78$ и $0,56$ соответственно), т. е. у больных с высоким уровнем билирубина в крови (более тяжелые формы ВГ) содержание продуктов перекисного окисления в липидах было ниже, а природных антиоксидантов — выше, чем у больных с низким уровнем билирубина (более легкие формы ВГ), а это хорошо согласуется с тем фактом, что билирубин обладает антиоксидантными свойствами.

Известно, что антиоксиданты играют важную роль в регуляции клеточной пролиферации; процессы, связанные с усилением размножения клеток (физиологическая и репаративная регенерация, опухолевый рост), протекают при повышенном уровне антиокислительной активности липидов. Антиоксиданты влияют на скорость пролиферации, ингибируя свободнорадикальные реакции, в ходе которых образуются репрессоры клеточного размножения [1]. Возникает вопрос: нельзя ли в таком случае рассматривать гипербилирубинемия как благоприятную реакцию, направленную не только на снижение интенсивности ПОЛ, но и на усиление репаративных процессов? Особый интерес в этом плане представляет гипербилирубинемия в разгар острого вирусного гепатита, когда происходит интенсивная регенерация гепатоцитов, а также при экскреторно-билиарном синдроме, наблюдающемся у больных в послеоперационный период после различных хирургических вмешательств. Однако следует признать, что вопрос этот остается пока открытым. Хотя то, что билирубин является эффективным природным антиоксидантом, подтверждено экспериментально [2—11], в литературе отсутствуют данные о корреляции между уровнем билирубинемии и

степенью лабильности мембран, а также о морфологических и биохимических сопоставлениях уровня билирубинемии с регенерацией гепатоцитов. Очевидно, чтобы подтвердить или опровергнуть высказанное выше предположение, необходимы дальнейшие комплексные экспериментальные исследования в этой области.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Бурлакова Е. Б., Алесенко А. В., Молочкина Е. М. и др. Биоантиоксиданты в лучевом поражении и злокачественном росте. М., 1975. 211 с.
2. Bernhard K. Über eine biologische Bedeutung der Gallenfarbstoffe. Bilirubin und Biliverdin als Antioxidanten für das Vitamin A und essentiellen Fettsäuren. — *Helvetica Chim. Acta*, 1954, vol. 38, N 2, p. 306—313.
3. Kaufmann H. P., Garloff H. Eine Untersuchung der antioxidativen Aktivität von α -Tocopherol, Ubiquinonen und Gallenfarbstoffen in Modellsystem. — *Fette, Seifen, Anstrichmittel*, 1961, Bd 63, N 4, S. 334—344.
4. Kaul R., Kaul H. K., Krischna Murti C. R. An alternate pathway for bilirubin catabolism. — *FEBS Letters*, 1980, vol. 11, N 1, p. 240—242.
5. Krischna Murti C. R. Bilirubin. A model for the study of endogenous toxic chemical. — *Proc. Ind. Nat. Acad. Sci.*, 1982, vol. B48, N2, p. 163—175.
6. Lighter D. A., Quistad G. B. Methylvinylmaleimide from bilirubin photooxidation. — *Science*, 1972, vol. 175, N 4019, p. 324.
7. McDonagh A. F. Evidence for singlet oxygen quenching by biliverdin IX- α -dimethylester and its relevance to bilirubin photooxidation. — *Biochem. Biophys. Research Communications*, 1972, vol. 48, N 2, p. 408—416.
8. McDonagh A. F. Thermal and photochemical reactions of bilirubin IX- α . — *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, 1975, vol. 244, N 3, p. 553—569.
9. Ree J., Matheson I. D. C., Wampler J. E. et al. Inhibition of laser generated singlet oxygen reaction with bilirubin by superoxide dismutase. — *Fed. Proc.*, 1973, vol. 32, N 4, p. 661.
10. Robertson P., Fridovich I. A reaction of the superoxide radical with tetrapyrroles. — *Arch. Biochem. Biophys.*, 1982, vol. 213, N 2, p. 353—357.
11. Schmidt R., Hammaker L. Metabolism and disposition of ^{14}C -bilirubin in congenital non-hemolytic jaundice. — *J. Clin. Investig.*, 1963, vol. 42, N 4, p. 1720—1726.

В. К. Залцмане

Рижский медицинский институт

ЭЛЕКТРОННО-МИКРОСКОПИЧЕСКОЕ
ИССЛЕДОВАНИЕ ЦИТОПЛАЗМАТИЧЕСКОЙ
МЕМБРАНЫ ГЕПАТОЦИТА
ПРИ ПАТОЛОГИИ ПЕЧЕНИ

Цитоплазматическая мембрана (ЦПМ) — плазмалемма гепатоцита — является динамичной структурой, которая активно реагирует на различную функциональную активность клетки и может сильно изменяться под влиянием физических, химических и биологических агентов. С развитием метода электронной микроскопии стало возможным выяснить конкретные морфологические признаки изменений ЦПМ гепатоцита при различной патологии печени, однако до сих пор мало внимания уделяется исследованию ЦПМ клеток на биопсийном материале печени больных. В данной статье обобщены и представлены результаты электронно-микроскопического изучения ЦПМ в норме, при острых и хронических заболеваниях печени и холестазах различного генеза.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДИКА ИССЛЕДОВАНИЯ

Исследования проводили у больных хроническим персистирующим и активным гепатитами (ХПГ и ХАГ), циррозом печени (ЦП), острым вирусным гепатитом (ОВГ), в том числе с холестатическим компонентом, а также синдромом Жильбера. Из каждой вышеупомянутой группы больных на исследование брали биопсированную ткань печени от 10 человек. Контрольные исследования проводили у 5 человек, у которых клинические, биохимические и морфологические исследования позволили исключить поражение печени. Холестаз у 16 кроликов был индуцирован пероральным введением литохсевой желчной кислоты (ЛХ) в дозе 0,15 г на 1 кг массы животного в сутки в течение 1, 2, 3 и 7 сут, а также у 33 крыс через 1, 4, 8, 15, 24 ч

и через 2, 3, 4, 5, 6 и 7 сут лигации общего желчного протока. В качестве контроля была использована ткань печени 6 intact-ных кроликов и крыс.

Для ультраструктурной характеристики ЦПМ гепатоцитов биопсийный материал печени больных и кусочки печени экспериментальных животных фиксировали четырехокисью осмия или 2,5%-ным раствором глутаральдегида с последующей фиксацией четырехокисью осмия и заливали в эпон 812. Ультратонкие срезы изготавляли на ультрамикротоме «ЛКБ-8810» и исследовали в электронном микроскопе «JEM-100S». У 2 контрольных крыс и у 4 крыс через 1 и 4 сут после лигации общего желчного протока электронно-гистохимически выявляли Mg^{2+} -зависимую аденозинтрифосфатазу (Mg^{2+} -АТФ-азу) по методу Вакстайна и Майзеля [2]. В инкубационной среде использовали нитрат свинца в концентрации 3,6 Мкм, который дает положительную реакцию на Mg^{2+} -АТФ-азу в ЦПМ.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

ЦПМ гепатоцита трехслойная: 2 наружных электронно-плотных слоя, построенных из молекул белков, и внутренний электронно-прозрачный липидный слой. В электронном микроскопе эти слои хорошо различимы при больших увеличениях после применения докраски рутениевым красным. Общая толщина ЦПМ гепатоцита колеблется от 7,5 до 10 нм. В зависимости от локализации ЦПМ гепатоцита имеет морфологические и функциональные различия. На синусоидальном и билиарном полюсах ЦПМ образует многочисленные извитые микроворсинки — выросты самой ЦПМ; их размеры в норме колеблются от 0,5 до 1 мк в длину с диаметром около 0,1 мк. Микроворсинки ЦПМ заметно увеличивают свободную функциональную активную поверхность гепатоцита. Число, длина и форма микроворсинок находятся в прямой зависимости от функционального состояния клетки. Латеральная ЦПМ гепатоцита, обращенная к соседнему гепатоциту, обычно гладкая, изредка локально образует короткие микроворсинки. ЦПМ и ее микроворсинки синусоидального полюса гепатоцитов участвуют в захвате многочисленных метаболитов из крови, образуют пиноцитозные и фагоцитарные пузырьки, имеют поры диаметром до 5 нм. ЦПМ и ее микроворсинки билиарного полюса гепатоцита образуют желчные капилляры (рис. 1), принимают участие в выделении компонентов желчи. В процессах мембранного транспорта активно принимают участие энзимы, как, например, щелочная фосфатаза и АТФ-аза.

В микроворсинках гепатоцитов электронно-гистохимически нами обнаружена высокая активность Mg^{2+} -АТФ-азы, причем обычно в микроворсинках в области желчных капилляров продукт реакции образуется в виде компактных электронно-плот-

ных гранул, и более слабая активность этого вида АТФ-аз отмечается на микроворсинках синусоидального полюса гепатоцитов (рис. II). В гладких участках ЦПМ гепатоцитов активность Mg^{2+} -АТФ-азы определяется реже. ЦПМ гепатоцитов играет определяющую роль в формировании контактов с другими клетками — соседними гепатоцитами и клетками кровеносного синусоида. Определенную информацию о структуре этих контактов дает метод электронной микроскопии. В норме микроворсинки ЦПМ синусоидального полюса гепатоцита имеют нерегулярные контакты с отростками эндотелиальных клеток и звездчатых эндотелиоцитов. ЦПМ гепатоцитов между собой образуют следующие контакты (см. рис. I).

1. Простое соединение, при котором ЦПМ разделены межмембранным пространством шириной 15—25 нм и содержат материал с низкой электронной плотностью. ЦПМ простых соединений принимает участие в образовании пиноцитозных пузырьков. Основная функция простых соединений — транспорт веществ между гепатоцитами. С помощью микропиноцитоза происходит трансцитоплазматический транспорт веществ.

2. Соединение типа «замка» — впячивание ЦПМ одного гепатоцита в инвагинаты ЦПМ соседнего гепатоцита. Ширина пространства между ЦПМ составляет 15—25 нм.

3. Плстное соединение, при котором наружные слои ЦПМ контактирующих гепатоцитов образуют плотный слой толщиной 3 нм, представляющий собой барьер для перемещения веществ.

4. Соединение слипания, в котором можно различить десмосому и зону слипания. ЦПМ в районе этого соединения имеет расстояние от 15 до 25—35 нм, это пространство заполнено филаментозными образованиями. Межмембранное пространство десмосомой содержит электронно-плотную пластину толщиной 5 нм.

5. Щелевое соединение, при котором ЦПМ гепатоцитов разделены до 2—4 нм.

В условиях патологии печени в ЦПМ гепатоцитов происходят различные ультраструктурные сдвиги, которые по-разному выражены при различной патологии печени. На уровне электронной микроскопии наиболее наглядно видны изменения микроворсинок ЦПМ гепатоцитов. На синусоидальном полюсе гепатоцитов уменьшается длина и количество микроворсинок (рис. III), иногда — до полного сглаживания ЦПМ. Чаще всего это видно в дистрофически и некротически измененных гепатоцитах при ОВГ, ХПГ и ХАГ, частично — у больных синдромом Жильбера. У больных ХПГ, ХАГ и ЦП на синусоидальном полюсе отдельных гепатоцитов выявляются сильно набухшие микроворсинки (рис. IV), или «влев» образования, по терминологии зарубежных авторов [5]. Такое образование может содержать различные цитоплазматические органеллы, диаметр его достигает значительных размеров — до 3—5 мк. Набухшая микроворсинка в

отдельных случаях может отрываться от гепатоцита (рис. V) — происходит аутоампутация, или микроклазматоз. При этом отделяющаяся часть цитоплазмы гепатоцита попадает в кровеносный синусоид, распадается и ее компоненты могут быть использованы другими клетками.

Описанные изменения микроворсинок ЦПМ синусоидального полюса гепатоцитов при ХГ свидетельствуют о нарушении обмена между гепатоцитами и синусоидом. Очевидно, это связано с тем, что при ХГ по ходу синусоидов и в пространстве Дриссе наблюдается пролиферация ретикулиновых и коллагеновых волокон, отложение мелкогранулярных белковых масс, что ведет к нарушению питания и альтерации гепатоцитов.

Изменения микроворсинок ЦПМ билиарного полюса гепатоцитов характерны для холестаза различного генеза. У больных с холестатическим компонентом и у экспериментальных животных, холестаз у которых вызван ЛХ или лигацией общего желчного протока, ЦПМ реагирует изменением количества, длины и формы микроворсинок. На различных этапах возникновения холестаза степень и характер изменений микроворсинок различаются — встречаются частичная или полная редукция микроворсинок, сильное набухание отдельных редких микроворсинок. В динамике изменений микроворсинок ЦПМ существенное значение имеют микрофиламенты. Уже на 1-е сутки введения ЛХ в печени кроликов вокруг желчных капилляров с выраженными микроворсинками заметно увеличивается количество микрофиламентов (см. рис. I). Густая сеть микрофиламентов в перикапиллярной зоне гепатоцитов сохраняется через 2, 3 и 7 сут после введения ЛХ, когда ЦПМ многих желчных капилляров гладкая, частично или полностью редуцированы микроворсинки (рис. VI). Аналогичная картина наблюдается у больных ОВГ и с холестатическим компонентом и у крыс после лигации общего желчного протока. Ряд авторов предполагают, что микрофиламенты участвуют в секреции желчи, влияют на процесс сокращения и расслабления микроворсинок ЦПМ и на механизмы внутриклеточного транспорта в цитоплазме билиарного полюса гепатоцитов [3, 4]. Образование пиноцитозных и микропиноцитозных пузырьков, фагоцитарных вакуолей в гепатоцитах при различной патологии печени выражено неравномерно. При ХПГ, ХАГ и ЦП сглаживание ЦПМ синусоидального полюса гепатоцитов обычно сопровождается уменьшением количества пиноцитозных пузырьков (см. рис. IV).

Поражение печени часто сопровождается нарушением межклеточных контактов, и, как указывают В. И. Архипенко с соавт. [1], актуальным в настоящее время является изучение нарушения контактных взаимоотношений клеток в процессах патологии. Латеральные ЦПМ гепатоцитов локально или в определенной зоне отходят друг от друга — образуется расширенное

межклеточное пространство, что выявлено нами при ХПГ, ХАГ, ЦП и холестазах. Плотное соединение и десмосомы, которые ограничивают желчные капилляры от пространства Диссе и препятствуют поступлению компонентов желчи в кровь, прочны и сохраняют свою структуру. Корректирующие нарушения оттока желчи — изменения путей выведения компонентов желчи из печени у больных холестазами — электронно-микроскопически отражаются в виде гипертрофии и гиперплазии микроворсинок ЦПМ на синусоидальном полюсе гепатоцитов при редукции их на биллиарном, в виде образования микроворсинок латеральными ЦПМ гепатоцитов и появления компонентов желчи в расширенных межклеточных пространствах и в пространстве Диссе.

При ОВГ эндотелиальные клетки нередко мигрируют из стенки синусоида и ЦПМ утрачивает контакт с этими клетками.

При ХПГ и ХАГ в просветах синусоидов увеличивается количество активных Т-лимфоцитов, мигрирующих из портального поля. При ХПГ (но чаще при ХАГ) наблюдается проникновение лимфоцитов в пространство Диссе, контакт лимфоцита с гепатоцитом и в единичных случаях — внедрение в цитоплазму гепатоцита — эмпериполез. Контакт лимфоцита с гепатоцитом осуществляется при помощи цитоплазматических отростков лимфоцитов путем прикосновения или слипания ЦПМ; иногда на месте контакта наблюдается деструкция ЦПМ гепатоцита.

В отдельных случаях при холестазах происходит утолщение ЦПМ гепатоцита, что может привести к изменению проницаемости ЦПМ для ионов Na^+ и K^+ .

По мнению ряда авторов [5], поражение ЦПМ на синусоидальном полюсе гепатоцитов является морфологическим субстратом нарушения захвата билирубина при синдроме Жильбера. Локальные прорывы ЦПМ синусоидального полюса отдельных гепатоцитов и выход некоторых цитоплазматических органелл в пространство Диссе нами выявлены у 5 из 10 больных синдромом Жильбера. Локальная трансформация ЦПМ в миелиноподобные структуры нами обнаружена при ЦП и холестазах.

Таким образом, на основе наших электронно-микроскопических исследований и литературных данных можно сделать заключение, что в ЦПМ гепатоцитов происходят следующие ультраструктурные изменения, связанные с различными функциональными и патологическими состояниями клеток: изменения количества, длины и формы микроворсинок ЦПМ; увеличение или уменьшение образования пиноцитозных пузырьков и фагоцитарных вакуолей; изменения межклеточных контактов, утолщение ЦПМ, образование миелиноподобных структур, локальные прорывы ЦПМ, усиление микроклизмотоза.

Изменения длины, количества и формы микроворсинок ЦПМ, а также изменения количества микроцитозных пузырьков оцениваются как компенсаторно-приспособительная реакция гепатоцитов в условиях патологии печени.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Архипенко В. И., Маленков А. Г., Гербильский Л. В. и др. Структура и функции межклеточных контактов. Киев, 1982. 167 с.
2. Гайер Г. Электронная гистохимия. Пер. с нем. М., 1974. 488 с.
3. Adler M., Won Chung K., Schaffner F. Pericanalicular hepatocytic and bile ductal microfilaments in cholestasis in man. — Amer. J. Pathol., 1980, vol. 98, N 3, p. 603—609.
4. Imanari H., Kuroda H., Tamura K. Microfilaments around the bile canaliculi in patients with intrahepatic cholestasis. — Gastroenterol. Jap., 1981, vol. 16, N 2, p. 168—173.
5. Trump B. T., Jones R. T. Diagnostic electron microscopy. New York, 1978, vol. 1.

Ю. В. Котловский, В. Е. Бекерев, В. В. Иванов

Красноярский медицинский институт

РОЛЬ МИКРОСОМАЛЬНОЙ СИСТЕМЫ ПЕЧЕНИ В ОКИСЛЕНИИ И ТИОЛОПРИВНВНОМ ЭФФЕКТЕ АКРИЛАМИДА

Органом, включающим значительное количество введенного в организм меченого акриламида (АА), является печень [13], в клетках которой большая часть этого токсического мономера связывается с восстановленным глутатионом (GSH) и выводится в виде нетоксичного конъюгата пропionaмидглутатиона [7, 9]. Снижение уровня GSH — важного компонента антиоксидантной системы клетки — ниже критического может вызвать активацию реакций перекисного окисления липидов (ПОЛ) биомембран [3] или усиление прямого связывания ксенобиотиков, продуктов их окисления с биомакромолекулами [2]. Если механизмы токсичности АА, связанные с реакциями исходной молекулы промышленного мономера, достаточно изучены [8], то роль метаболических превращений АА в патогенезе его повреждающего действия неясна. Мы попытались выяснить возможную роль системы микросомальных оксидаз в одном из основных метаболических эффектов АА — снижении уровня GSH.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДИКА ИССЛЕДОВАНИЯ

Исследования проводили на белых беспородных крысах массой 100—150 г. Микросомальную фракцию печени получали по методам, описанным ранее [5, 11]. Спектры связывания АА с цитохромом Р-450 записывали с помощью регистрирующего спектрофотометра «Хитачи-556» [6]. Определение спектральной константы диссоциации (K_s), константы Михаэлиса (K_m), максимальной амплитуды спектральных изменений ($\Delta O P_{\max}$) и максимальной скорости окисления ксенобиотиков (V_{\max}) проводили в координатах Лайнуивера—Берка. Интенсивность гидроксилирования 3,4-бензпирена (3,4-БП) определяли по флюорес-

Таблица 1

Влияние акриламида (АА) на кинетику окисления диметиланилина (ДМА), аминопиррина (АП) и 3,4-бензпирена (3,4-БП) в микросомах печени крыс

Серия эксперимента	K_M , мМ	V_{\max}^{**}	Серия эксперимента	K_M , мМ	V_{\max}^{**}
ДМА, 6 мМ	0,39	5,9	АП+АА, 50 мМ	0,79*	2,26
ДМА+АА, 3 мМ	0,50	6,5	3,4-БП, 0,16 мМ	0,07	19
ДМА+АА, 50 мМ	1,85*	7,8	3,4-БП+АА, 3 мМ	0,10	22
АП, 5 мМ	0,45	2,02	3,4-БП+АА, 50 мМ	0,20*	10*
АП+АА, 3 мМ	0,44	1,89			

* Данные, достоверно отличающиеся от фоновых кинетических параметров окисления субстратов.

** V_{\max} выражена в нмоль/мг белка·мин — для ДМА и АП и в ед. флуоресценции/мг белка·мин — для 3,4-БП.

Таблица 2

Влияние микросом печени крыс на скорость убыли восстановленного глутатиона под влиянием акриламида (АА)

Серия эксперимента	Скорость снижения уровня GSH, нмоль/мг белка·мин ⁻¹	Серия эксперимента	Скорость снижения уровня GSH, нмоль/мг белка·мин ⁻¹
МК	2,5±0,6	МК+инол	3,0±0,8
МК+АА	9,0±0,8*	МК+инол+АА	8,0±0,5*
МК _{интакт} +АА	1,2±0,3	МК+ЭДТА	3,0±0,8
МК _{со}	2,0±0,4	МК+ЭДТА+АА	8,2±0,6*
МК _{со} +АА	5,0±1,3.*		

Примечание. Инкубационная среда объемом 3,0 мл, термостатируемая при 37°C на протяжении 15 мин, содержала 0,2 мМ трис-НСI буфера (рН 7,4), 1 мМ НАДФ.Н, 0,3 мМ GSH, 1,5 мг микросомального белка, 1,0 мМ акриламида; в ряде опытов — 2 мМ ЭДТА или 1 мМ инола. МК — интактные микросомы печени крыс; МК_{интакт} — микросомы, прогретые при 100°C в течение 10 мин; МК_{со} — микросомы, предварительно продувавшиеся моноокисью углерода в течение 1 мин; * — данные, достоверно отличающиеся от фоновых величин; . — данные, достоверно отличающиеся от данных, полученных в результате предварительных воздействий.

ценции образующейся 3,4-гидроокиси бензпирена [15], активность N-деметилирования диметиланилина (ДМА) и аминопиррина (АП) — по скорости образования формальдегида [5]. Содержание белка определяли биуретовым методом [4]. В табл. 1—3 и на рис. 1 приведены данные, полученные при использовании

Таблица 3

Влияние акриламида (АА) на образование МДА в постмитохондриальной надосадочной жидкости печени крыс

Серия эксперимента	Время инкубации, мин	Кол во малонового диальдегида, нмоль/мг белка	
		Контроль	АА
Постмитохондриальная надосадочная жидкость	30	0,74 ± 0,26	0,69 ± 0,08
	60*	1,02 ± 0,30	1,10 ± 0,21
Постмитохондриальная надосадочная жидкость + НАДФ.Н, 2 мМ	30	1,05 ± 0,07	1,04 ± 0,10
	60	1,39 ± 0,17	1,41 ± 0,08
Постмитохондриальная надосадочная жидкость + аскорбат, 1,6 мМ	30	2,61 ± 1,16	2,36 ± 0,40
	60	5,0 ± 1,25	4,48 ± 0,67

Примечание. Инкубационная среда объемом 2,0 мл, термостатируемая при 37°С, содержала 0,1 М трис-НСI буфера (рН 7,4), 8 мг белка постмитохондриальной надосадочной жидкости печени крыс (18 000 г).

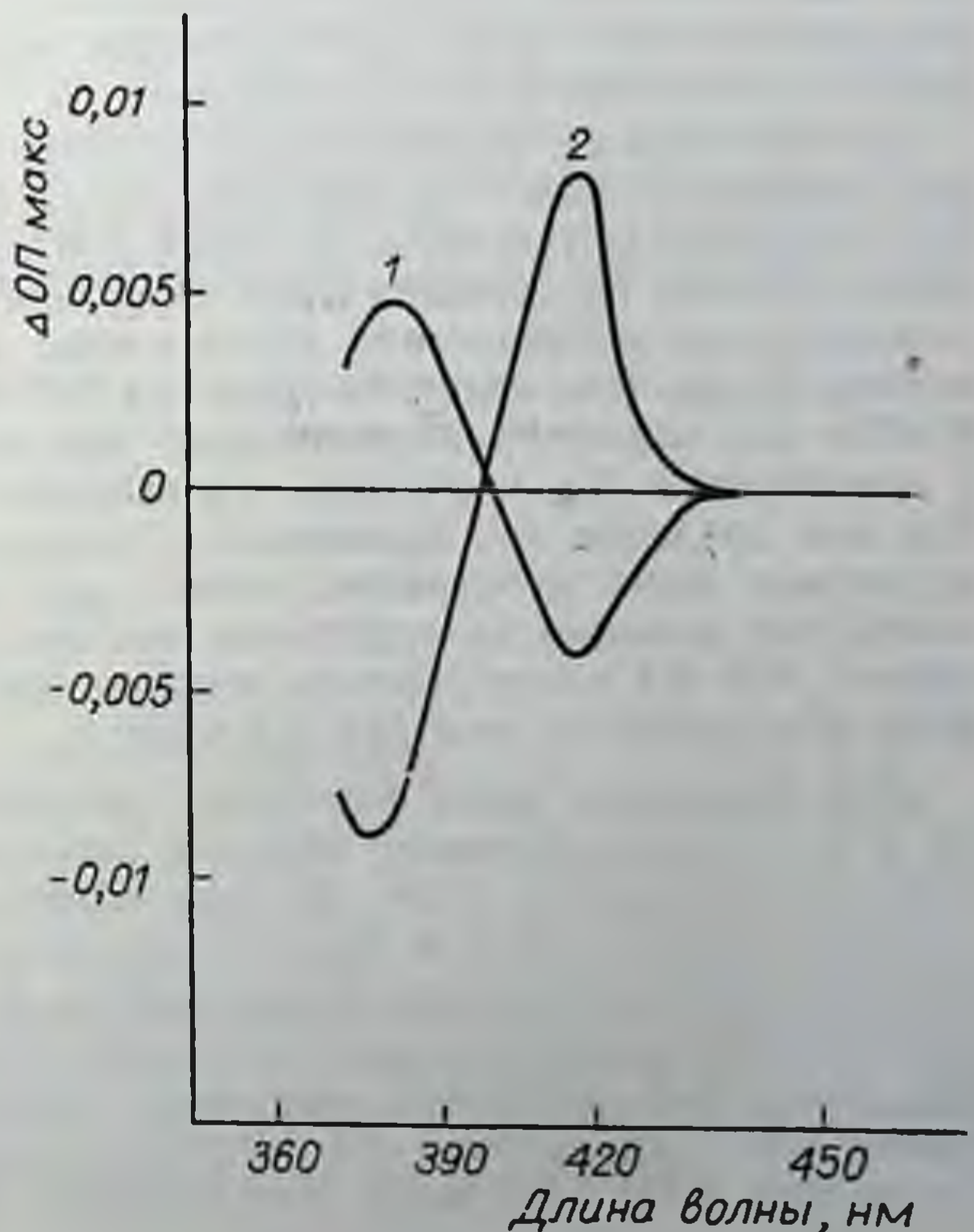


Рис. 1. Спектры связывания акриламида (АА) с микросомами печени контрольных крыс.

Инкубационная смесь объемом 3,0 мл содержала 0,1 М трис-НСI буфера (рН 7,4), 20% глицерина, 6,0 мг микросомального белка, 1,0 мМ АА (1) или 12 мМ, АА (2). По оси ординат отложены $\Delta O P_{\text{макс}}$, ед. опт. плотности/мг белка.

препаратов микросом, постмитохондриальной надосадочной жидкости печени крыс от 8—10 животных. Результаты обрабатывали статистически с использованием *t*-критерия Стьюдента.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Опыты по изучению связывания АА с цитохромом Р-450 проводили на микросомальной фракции печени контрольных крыс. При добавлении в инкубационную среду АА (1 мМ) наблюдались спектральные изменения с максимумом поглощения при длине волны 385 нм и минимумом — при 418 нм (см. рис. 1, кривая 1). При более высокой концентрации АА (11 мМ) возникла картина спектральных изменений, обратных классическому I типу: с максимумом поглощения при 418 нм и минимумом — при 385 нм, что объясняется неспецифическим связыванием субстрата с гемом цитохрома Р-450 [14]. Предварительное, до добавления АА, внесение ДМА (классического субстрата I типа) вызывало повышение K_s для АА с 3,1 до 10 мМ при отсутствии изменений ΔOP_{\max} , равной 0,0004—0,0005 ед. опт. плотности/мг белка. Полученные данные свидетельствуют о возможных конкурентных взаимоотношениях АА с ДМА. Таким образом, проведенные нами спектральные исследования позволяют отнести АА к субстратам I типа.

Другие данные, указывающие на взаимодействие АА с системой микросомальных оксидаз, получены при изучении влияния АА на кинетику N-деметилирования ДМА и АП и гидроксилирования 3,4-БП. Предварительная инкубация АА (50 мМ) с изолированными микросомами печени крыс не приводила к изменениям V_{\max} (см. табл. 1). Для 3,4-БП (субстрата цитохрома Р-448) был характерен смешанный вид ингибирования: наряду с повышением K_M выявилось уменьшение V_{\max} (см. табл. 1). Так как введение АА приводило к повышению K_M у всех трех изучаемых нами субстратов только при дозе его 50 мМ и не оказывало влияния на субстраты при его дозе 3 мМ, то можно сказать, что АА имеет гораздо меньшее сродство к микросомальному гемспротейду, чем АП и 3,4-БП.

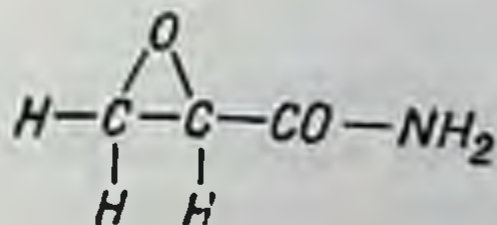
Для выяснения роли ферментов микросомального окисления АА в его тиолопрививном эффекте исследовали влияние мономера на содержание GSH, которое определяли по методу [10] в инкубационной среде в присутствии интактных или инактивированных кипячением микросом печени. В исходную среду добавляли GSH до концентрации 0,3 мМ. Убыль GSH в присутствии интактных микросом составила $2,5 \pm 0,6$ нмоль GSH/мг белка · мин⁻¹. Добавление АА приводило к возрастанию скорости утилизации GSH в 3,6 раза. При внесении же АА в инкубацион-

ную среду, содержащую инактивированные микросомы, отмечалась убыль GSH, но скорость падения тиола была ниже (см. табл. 2). В этом случае падение уровня GSH, вероятно, было обусловлено влиянием исходной молекулы AA, так как микросомальное окисление мономера было невозможно. На тесную связь тиолопрививного эффекта яда с его окислительным превращением в микросомах указывает более низкая (в 7,5 раза) скорость падения уровня GSH по сравнению с таковым инкубационной смеси, содержащей AA и интактные микросомы (см. табл. 2).

Подавление указанного токсического действия AA в результате предварительного продувания через взвесь микросом CO (классический ингибитор цитохрома P-450) позволяет сделать вывод о связи исследуемого эффекта с окислением AA на цитохроме P-450. Падение уровня GSH в таком случае могло быть, с одной стороны, следствием действия исходной молекулы AA и его окисленного продукта, с другой — результатом стимуляции ПОЛ.

Отсутствие влияния инола — «ловушки» свободных радикалов [2, 3] — позволяет отрицать возможность образования в ходе окисления AA свободнорадикальных продуктов, связывающих GSH. Сам инол не влиял на уровень тиола (см. табл. 2). Возможность стимуляции ПОЛ липидов биомембран микросом была проведена в другой серии опытов. При добавлении к постмитохондриальной надосадочной жидкости AA не влиял ни на скорость аскорбат, ни на скорость НАДФ.Н-зависимого ПОЛ (см. табл. 3). Вторым фактором, доказывающим отсутствие прооксидантного механизма в тиолопрививном эффекте яда, является то, что добавление в пробу ЭДТА — ингибитора ПОЛ [1, 4] — не предотвращало падения уровня GSH под влиянием AA (см. табл. 3).

Исходя из полученных нами данных, можно предположить, что биологически активным продуктом микросомального окисления AA является его эпокись.



Резкое усиление тиолопрививного эффекта AA в присутствии микросом, очевидно, объясняется генерированием этой эпокиси, имеющей более высокую реакционную способность по сравнению с исходной молекулой AA.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Арчаков А. И. Микросомальное окисление. М., 1975. 327 с.
2. Бурлакова Е. Б., Веселовский В. А., Кольс О. П. Биоантиокислители в регуляции метаболизма в норме и патологии. М., 1982. 240 с.
3. Владимиров Ю. А., Арчаков А. И. Перекисное окисление в биологических мембранах. М., 1972. 252 с.
4. Девини Г., Гергей Я. Аминокислоты, пептиды и белки. Пер. с англ. М., 1976. с. 69—71.
5. Карузин И. И., Арчаков А. И. Выделение микросомальной фракции печени и характеристика ее окислительных систем. — В кн.: Современные методы в биохимии. Под ред. В. Н. Ореховича. М., 1977, с. 53—54.
6. Cytochrome P₄₅₀ / Ed. by R. Sato, T. Omura. Tokyo, 1978. 224 p.
7. Dixite H. R., Muchtar H., Setu P. K. Effect of acrylamide on biogenic amine levels, monoamine oxidase and cathepsine P activity of rat brain. — Environ. Research, 1981, vol. 20, p. 168—173.
8. Dixite H. R., Muchtar H., Setu P. K. Conjugation of acrylamide with glutathione catalysed by glutathione-S-transferase of rat liver and brain. — Biochem. Pharmacol., 1981, vol. 30, p. 1739—1744.
9. Edwards P. M. The distribution and metabolism of acrylamide and its neurotoxic analoges in rat. — Biochem. Pharmacol., 1975, vol. 24, p. 1277—1282.
10. Ellman G. L. Tissue sulphhydryl groups. — Arch. Biochem., 1959, vol. 82, p. 70—77.
11. Kamath S. A., Rubin E. Interaction of calcium microsomes: modified method for the rapid isolation of rat liver microsomes. — Biochem. Biophys. Research Communications, 1972, vol. 49, p. 52—59.
12. Lample Butshak G. The role of cytochrome P₄₅₀ in the toxicity of xenobiotics. — Pharmazie, 1978, Bd 33, S. 407—412.
13. Miller M. L., Carter P. E., Sipes J. C. Pharmacokinetics of acrylamide in Fisher-334 rats. — Toxicol. Appl. Pharmacol., 1982, vol. 63, p. 36—44.
14. Orrenius S., Wilson B. J., Bahr C. On the significance of drug induced spectral changes in liver microsomes. — In: Hydroxical hydroxylation mechanism / Ed. by G. S. Boyd, R. M. Smellie. New York, 1972, p. 55—77.
15. Robie K. M., Cha Y. N., Talkotte R. E. The method of assay 3,4-benzo(e)pyrene hydroxylase. — Chem.-Biol. Interactions, 1976, vol. 12, p. 285—297.

А. Я. Майоре, Т. Н. Копылова, А. В. Кузнецова

Рижский медицинский институт

ХАРАКТЕРИСТИКА ХЕМИЛЮМИНЕСЦЕНЦИИ ТКАНИ ПЕЧЕНИ КРЫС ПРИ ИНТОКСИКАЦИИ ГЕПАТОТРОПНЫМИ ЯДАМИ

Физико-химические свойства биологических мембран в большой мере зависят от процессов перекисного окисления липидов (ПОЛ), субстратами которых являются ненасыщенные жирные кислоты (НЖК) фосфолипидов самих мембран. Многие авторы считают ПОЛ универсальным фактором регуляции проницаемости мембран. Кроме того, продукты липопероксидации вызывают модификацию мембранно-связанных ферментов, окисление —SH групп трансмембранных белков и др. [1, 6]. Поэтому большое внимание уделяется изучению этих процессов как в физиологических условиях, так и при воздействии на организм патогенными агентами, в том числе гепатотропными факторами. Для этих целей обычно используют определение содержания первичных (диеновых конъюгатов, гидроперекисей) или вторичных (малонового диальдегида) продуктов ПОЛ в исследуемом материале [1]. Относительно редко (главным образом из-за отсутствия необходимой аппаратуры) для характеристики ПОЛ применяют измерение хемилюминесценции (ХЛ, сверхслабое свечение) образцов ткани. Между тем определение интенсивности и других характеристик ХЛ, в основе которой лежит процесс рекомбинации свободных радикалов (пероксирадикалов), дает подробную информацию о ПОЛ [2, 3, 12, 15]. Следует отметить, что для проведения такого анализа требуется небольшое количество исследуемого материала, и поэтому метод может применяться для изучения липопероксидации в биоптатах ткани, в том числе печени больных.

В настоящей статье представлены результаты определения характеристик ХЛ гомогенатов печени крыс при интоксикации различными гепатотропными ядами — четыреххлористым углеродом (CCl₄), α-нафтилизотиоцианатом (АНИТ), солянокислым гидразином и этанолом.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДИКА ИССЛЕДОВАНИЯ

Исследования проводили на белых крысах-самцах линии Вистар массой 180—220 г. В остром эксперименте яды вводили однократно в следующих дозах: CCl_4 — по 0,2 мл 80%-ного масляного раствора/100 г массы животного (внутримышечно); АНИТ — по 0,5 мл 2%-ного масляного раствора/100 г массы (перорально через зонд); солянокислый гидразин — по 0,3 мл 6%-ного водного раствора/100 г массы (внутримышечно); этанол — по 1 мл 50%-ного водного раствора/100 г массы (перорально через зонд). В качестве контроля использовали intact-ных животных, а для тех серий экспериментов, в которых применяли масляный раствор АНИТ, — также и группы животных, которым аналогичным путем вводили адекватное количество оливкового масла. Крыс убивали путем обескровливания под легким эфирным наркозом через 24, 48 и 72 ч после начала интоксикации.

В хронических опытах в качестве патогенных агентов использовали CCl_4 , который вводили внутримышечно по 0,16 мл/100 г массы 2 раза в неделю в течение 2 мес, а также этиловый спирт, который крысы получали вместо питьевой воды в течение 2 мес в виде 15%-ного водного раствора. Крыс убивали вышеуказанным способом.

Животных всех групп содержали на общем рационе вивария РМИ. Забор исследуемого материала проводили в утренние часы, через 12 ч после последнего приема пищи.

Регистрация ХЛ свежеприготовленных гомогенатов печени (изготовленных на 1/16 М фосфатном буфере; рН 7,4) проводили с помощью хемилюминесцентного индикатора, работающего в режиме счета фотонов [2]. В качестве инициатора ХЛ использовали Fe^{2+} (раствор FeSO_4 в концентрации $4 \cdot 10^{-3}$). По кривой ХЛ, записанной в течение 5—7 мин после добавления Fe^{2+} , вычисляли максимальную амплитуду «быстрой» и «медленной» вспышек (БВ и МВ), отражающих, соответственно, содержание гидроперекисей липидов и способность липидов к их перекисному скислению, а также t_{α} для МВ, характеризующий скорость окисления липидов [9].

Результаты обрабатывали общепринятыми методами вариационной статистики (табл. 1—4).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Анализ представленных в табл. 1—4 результатов показывает, что динамика изменений характеристик ХЛ существенно различается в отдельных сериях экспериментов, хотя все использованные для моделирования патологических процессов гепатотропные

Таблица 1

Показатели ХЛ печени крыс при интоксикации солянокислым гидразином

Длительность опыта, ч	Число животных	БВ. отн. ед. ХЛ	МВ. отн. ед. ХЛ	$\lg\alpha$
24	10	$3,39 \pm 0,40$	$6,58 \pm 0,54$	$9,22 \pm 1,66^*$
48	11	$2,63 \pm 0,21$	$5,87 \pm 0,58$	$9,24 \pm 1,36^{**}$
72	13	$2,98 \pm 0,17$	$8,24 \pm 0,78^{**}$	$10,94 \pm 1,34^{**}$
Интактные животные	6	$2,73 \pm 0,27$	$4,89 \pm 0,88$	$4,82 \pm 0,68$

* $p \leq 0,05$.** $p < 0,01$.*** $p < 0,001$.

Таблица 2

Показатели ХЛ печени крыс при острой и хронической интоксикации CCl_4

Длительность опыта	Число животных	БВ. отн. ед. ХЛ	МВ. отн. ед. ХЛ	$\lg\alpha$
24 ч	19	$3,39 \pm 0,16^{**}$	$4,92 \pm 0,29$	$2,71 \pm 0,28$
48 ч	18	$3,89 \pm 0,26^{***}$	$5,82 \pm 0,41^{**}$	$2,82 \pm 0,33$
72 ч	13	$3,80 \pm 0,32^{***}$	$3,99 \pm 0,28$	$3,91 \pm 0,43$
Интактные животные	16	$2,50 \pm 0,16$	$4,22 \pm 0,37$	$3,96 \pm 0,55$
2 мес	13	$2,53 \pm 0,09$	$4,24 \pm 0,33$	$1,64 \pm 0,18$
Интактные животные	6	$2,90 \pm 0,12$	$4,32 \pm 0,32$	$1,84 \pm 0,39$

Примечание. См. пояснения к табл. 1.

яды обладают прооксидантными свойствами [1, 7, 8, 10, 11, 13, 16, 17].

Наиболее сильные изменения кривых ХЛ были выявлены при интоксикации крыс солянокислым гидразином (см. табл. 1) — веществом, гепатотропное действие которого проявляется в жировой дистрофии гепатоцитов и накоплении в клетках печени значительных количеств триглицеридов [11]. Они характеризуются постепенным нарастанием максимальной амплитуды МВ и $\lg\alpha$. Причем выявляются существенные индивидуальные различия в скорости окисления липидов — в каждой группе

Таблица 3

Показатели ХЛ печени крыс при острой и хронической интоксикации этанолом

Длительность опыта	Число животных	БВ. отн. ед. ХЛ	МВ. отн. ед. ХЛ	$\lg\alpha$
24 ч	7	$4,11 \pm 0,29$	$8,12 \pm 0,29^{***}$	$5,90 \pm 0,73^{**}$
48 ч	23	$2,99 \pm 0,16$	$5,99 \pm 0,25$	$6,78 \pm 0,86^{**}$
72 ч	16	$3,55 \pm 0,25$	$6,34 \pm 0,68$	$5,34 \pm 1,03$
Интактные животные	7	$3,53 \pm 0,21$	$5,80 \pm 0,48$	$3,41 \pm 0,61$
2 мес	13	$2,53 \pm 0,09$	$4,24 \pm 0,33$	$1,64 \pm 0,18$
Интактные животные	6	$2,90 \pm 0,12$	$4,32 \pm 0,32$	$1,84 \pm 0,39$

Примечание. См. пояснения к табл. 1.

Таблица 4

Показатели ХЛ печени крыс при интоксикации АНИТ

Длительность опыта, ч	Введенное вещество	БВ. отн. ед. ХЛ	МВ. отн. ед. ХЛ	$\lg\alpha$
24	АНИТ	$2,52 \pm 0,17$ (10)	$4,15 \pm 0,58$ (10)	$4,41 \pm 0,81$ (10)
	Масло	$3,42 \pm 0,50$ (4)	$5,76 \pm 0,36$ (4)	$3,41 \pm 0,20$ (4)
48	АНИТ	$2,64 \pm 0,20..$ (10)	$5,55 \pm 0,36$ (10)	$4,37 \pm 0,85$ (10)
	Масло	$4,52 \pm 0,43^*$ (4)	$6,33 \pm 1,33$ (4)	$3,14 \pm 0,37$ (4)
72	АНИТ	$2,80 \pm 0,16$ (9)	$4,78 \pm 0,52.$ (9)	$4,39 \pm 0,40.$ (9)
	Масло	$3,44 \pm 0,23$ (4)	$6,62 \pm 0,59$ (4)	$2,41 \pm 0,64$ (4)
Интактные животные		$2,81 \pm 0,08$ (10)	$5,13 \pm 0,20$ (10)	$3,52 \pm 0,27$ (10)

- Отклонение достоверно относительно интактных животных.
- Отклонение достоверно относительно группы животных, которым вводили оливковое масло.

В скобках указано число животных в группе.

подвергнутых действию яда животных у части крыс наблюдаются очень высокие показатели I_{ga} (через 24 ч после начала интоксикации у 50% крыс в среднем I_{ga} составляет 13,4, через 48 ч у 45% — 13,6, через 72 ч у 46% — 15,5).

Что касается уровня гидроперекисей (БВ), то в начале эксперимента (через 24 ч) наблюдается тенденция к нарастанию БВ, а на более поздних стадиях патологического процесса относительно этих показателей не установлено разницы между интактными и получавшими патогенный агент крысами.

На модели гепатозогепатита (интоксикация CCl_4) изменения показателей ХЛ имеют другой характер (см. табл. 2). В течение острого эксперимента отмечается повышенный уровень гидроперекисей (БВ). В то же время достоверное увеличение амплитуды МВ имеет место только через 48 ч после введения яда, а I_{ga} практически не отличается от нормы.

При острой интоксикации этанолом максимальные отклонения параметров наблюдаются в начале опыта (через 24 ч). Показатели МВ и I_{ga} остаются завышенными (что не всегда достоверно) до конца эксперимента (см. табл. 3). Как и в случае отравления гидразином, во время максимальных биохимических сдвигов, вызванных введением этанола (через 48 ч), наблюдаются сильные отличия I_{ga} у отдельных особей — у 36% животных показатель был резко повышен ($12,3 \pm 0,61$). Таким образом, изменения липопероксидации в печени крыс имеют место и при интоксикации небольшой дозой этанола, при которой светооптически изменения паренхимы органа не выявляются.

При интоксикации АНИТ, вызывающей внутрипеченочный холестаз в сочетании с синдромом цитолиза [10, 18], наблюдается некоторое повышение I_{ga} в течение всего эксперимента (см. табл. 4). Обращает на себя внимание тот факт, что довольно сильные изменения ХЛ гомогената печени (БВ и МВ) вызывает введение чистого оливкового масла, что необходимо учитывать при проведении опытов с применением масляных растворов различных препаратов (патогенных и лечебных).

В отличие от острых поражений при хронической интоксикации гепатотропными ядами (CCl_4 , этанол) практически не происходит изменений ХЛ (см. табл. 2, 3). Только при длительном введении CCl_4 наблюдается двукратное увеличение I_{ga} .

Таким образом, проведенные нами эксперименты показывают, что ХЛ ткани печени крыс сильнее изменяется при острых поражениях печени, чем при длительном поступлении гепатотропных ядов. Что касается корреляции ХЛ ткани печени с изменениями других показателей ПОЛ в печени (содержание конъюгированных диенов (КД), малонового диальдегида (МДА)), то однозначных закономерностей не наблюдается. Так, например, при интоксикации гидразином ткани печени содержание КД достигает максимума через 24 ч после введения яда, а

амплитуда МВ и $\text{tg}\alpha$ продолжают нарастать до конца эксперимента (через 72 ч), когда наблюдается высокий уровень вторичного продукта ПОЛ — МДА [8, 11]. После введения этанола содержание КД в печени крыс в течение 2 первых суток в среднем в 2,4 и 2,8 раза превышает норму, а через 72 ч не отличается от контрольного уровня; концентрация же МДА, соответственно, в 2,9, 2,4 и 2,7 раза выше, чем у интактных животных [7]. При интоксикации крыс CCl_4 содержание КД в печени животных составляло, соответственно, $5,51 \pm 0,21$; $6,70 \pm 0,38$ и $5,94 \pm 0,36$ усл. ед. экстинкции/г ткани, что в течение эксперимента достоверно превышало контрольный уровень ($p < 0,05$; $p < 0,001$ и $p < 0,02$). Особенно сильные различия имеют место при интоксикации АНИТ — незначительные изменения ХЛ в течение всего эксперимента не согласуются с существенными изменениями уровня КД (в 1,9, 1,4 и 2,0 раза выше нормы) и МДА (в 1,4, 1,9 и 1,3 раза выше нормы) в соответствующие сроки эксперимента [10].

При хронической интоксикации этанолом изменения содержания КД и МДА в печени крыс-самцов нами не выявлены [7], а при двухмесячном введении CCl_4 концентрация КД в 1,9 раза превышала контрольный уровень.

На основе полученных данных можно сделать вывод, что в условиях *in vivo* взаимосвязь между ХЛ и ПОЛ имеет весьма сложный характер. Возможно, что это обусловлено тем фактором, что энергия для свечения поставляется за счет биохимических процессов неферментативного свободнорадикального окисления липидов [3, 15], а в организме, подвергнутом действию яда, стимуляция ПОЛ в большой степени происходит за счет ферментативного ПОЛ, особенно в эндоплазматическом ретикулуме гепатоцитов [1]. Кроме того, нельзя исключать прямое действие на ХЛ самих химических веществ или их метаболитов, а также отдельных эндогенных соединений, концентрация которых в печени при патологических процессах может иногда достигать весьма больших величин (например, содержание билирубина при интоксикации АНИТ).

Итак, изменения характеристик ХЛ при острой интоксикации крыс гепатотропными ядами, по-видимому, отражают глубокие изменения химического гомеостаза, в частности свободнорадикальных процессов, вызванные поступлением в организм прооксидантов. При этом следует отметить, что нормализация ХЛ в ряде случаев наступает позже других биохимических сдвигов, например активности органеллоспецифических ферментов [4, 5, 14] или содержания триглицеридов [8, 10]. В условиях длительного поступления яда изменения ХЛ выражены слабо, что свидетельствует о наличии адаптации организма к действию патогенного агента.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Владимиров Ю. А., Арчаков А. И. Перекисное окисление липидов в биологических мембранах. М., 1975. 252 с.
2. Владимиров Ю. А., Литвин Ф. Ф. Исследование сверхслабых свечений в биологических системах. — Биофизика, 1959, т. 4, № 4, с. 601—604.
3. Владимиров Ю. А., Оленев В. И., Сулова Т. Б. Информация анализа кривых хемилюминесценции при перекисном окислении липидов. — В кн.: Сверхслабое свечение плазмы крови в клинической диагностике. М., 1974, с. 6—34.
4. Горштейн Э. С., Копылова Т. Н. Влияние солянокислого гидразина на микросомальную систему гидроксилирования печени крыс. — В кн.: Биохимические исследования патологических процессов. Рига, 1983, с. 22—26.
5. Елисеева Е. И., Майоре А. Я., Ремберга Л. А. Характер изменения активности некоторых ферментов дыхательной цепи митохондрий печени при отравлении крыс этанолом. — В кн.: Энзимология патологических процессов. Рига, 1980, с. 24—28.
6. Козлов Ю. П. Свободнорадикальное окисление липидов в биомембранах в норме и при патологии. — В кн.: Биоантиокислители. М., 1975, с. 5—14.
7. Копылова Т. Н., Майоре А. Я. Перекисное окисление липидов печени крыс при остром и хроническом отравлении этанолом. — В кн.: Вопросы биохимии патологических процессов. Рига, 1979, с. 24—27.
8. Копылова Т. Н., Майоре А. Я., Элerte Д. Л. и др. Перекисное окисление липидов при поражении печени солянокислым гидразином. — В кн.: Клеточная и субклеточная экспериментальная патология печени. Рига, 1982, с. 35—46.
9. Лопухин Ю. М., Владимиров Ю. А., Молоденков М. Н. и др. Регистрация хемилюминесценции составных частей сыворотки крови в присутствии двухвалентного железа. — Бюл. эксперим. биологии и медицины, 1983, № 2, с. 61—64.
10. Майоре А. Я., Горштейн Э. С., Кузнецова А. В. и др. Некоторые аспекты гепатотропного действия α -нафтилизотиоцианата. — В кн.: Экспериментальная патология печени. Рига, 1983, с. 77—86.
11. Майоре А. Я., Копылова Т. Н., Горштейн Э. С. и др. Структурно-функциональные изменения печени при экспериментальной интоксикации гидразином. — В кн.: Метаболические аспекты действия на организм индустриальных химических соединений. Красноярск, 1982, с. 126—132.
12. Нейфах Е. А. Свободнорадикальный механизм сверхслабой хемилюминесценции, сопряженной с перекисным окислением ненасыщенных жирных кислот. — Биофизика, 1971, т. 16, № 3, с. 561—564.
13. Островский Ю. М. Этанол и обмен веществ. Минск, 1982. 200 с.
14. Снiedzе Т. Н., Майоре А. Я. Влияние острой и хронической алкогольной интоксикации на лизосомы печени крыс. — В кн.: Биохимические исследования патологических процессов. Рига, 1983, с. 88—91.
15. Шестаков В. А., Шерстнев М. П. Применение биохемилюминесценции в медицине. М., 1977. 99 с.
16. Di Luzio N. R. A mechanism of the acute ethanol-induced fatty liver and the modification of liver injury by antioxidants. — Lab. Investig., 1966, vol. 15, N 1, p. 50—63.
17. Di Luzio N. R., Stece T. E., Hoffmann E. O. Protective influence of diphenil-p-phenilendiamine on hydrazine-induced lipid peroxidation and hepatic injury. — Experimental Molecular Pathol., 1973, vol. 19, N 1, p. 284—291.
18. Plaa G. L., Prestly B. G. Intrahepatic cholestasis induced by drugs and chemicals. — Pharmacol. Rev., 1977, vol. 28, N 3, p. 207—273.

*М. С. Маргулис, Е. А. Квицинская, Ю. А. Сорокин,
Б. О. Ткаченко, Т. Г. Инерман*

Рижский медицинский институт

ИНТЕНСИВНОСТЬ ПЕРЕКИСНОГО ОКИСЛЕНИЯ ЛИПИДОВ И НАКОПЛЕНИЯ МОЛЕКУЛ СРЕДНЕЙ МАССЫ В ТКАНИ ПЕЧЕНИ ПРИ ЕЕ КОНСЕРВАЦИИ

Изучение механизма развития и проявления патологических процессов в организме привело к установлению роли токсических веществ среднемолекулярной массы, имеющих пептидную природу, для целого ряда заболеваний (острой ожоговой токсемии, печеночной комы, хронической почечной недостаточности, злокачественных образований, кардиогенного шока и др.) [4, 6, 8, 9—11, 14]. Наряду с этим при изучении роли биологически активных веществ в механизме развития ранних постишемических расстройств установлено, что в процессе длительной ишемии в органах и тканях накапливаются молекулы средней массы (МСМ), степень накопления которых пропорциональна длительности ишемии [5]. Аналогичное происхождение, по-видимому, имеет и гепатоцеребральный токсин, обуславливающий проявление соответствующих признаков поражения мозга при печеночной недостаточности [2].

Однако, изучая влияние МСМ на процессы перекисного окисления липидов (ПОЛ), З. А. Тупикова [7] выявила наличие у МСМ выраженных антиоксидантных свойств, что позволило сделать вывод о возможной защите липидов от избыточной перекисидации при накоплении в крови больных ожоговой болезнью среднемолекулярных веществ, обладающих выраженными антиоксидантными свойствами. Ингибирование процессов ПОЛ под влиянием МСМ наблюдали также Г. С. Березин с соавт. [7]. Так, по данным Г. С. Березина с соавт. [7], 6-часовая ишемия конечности у собак сопровождалась снижением интенсивности индуцируемой Fe^{2+} хемилюминесценции плазмы крови, развивающейся в процессе ПОЛ, что, по мнению вышеуказанных авторов, было обусловлено накоплением в крови животных среднемалекулярных фракций пептидной природы, угнетающих указанное явление.

Вместе с тем при различных способах консервации органов, предназначенных для пересадки и перенесших определенные периоды ишемии и гипоксии, эти вопросы не изучались и не выявлена взаимосвязь между накоплением среднемолекулярных веществ и их влиянием на процессы ПОЛ, хотя вопросам интенсификации ПОЛ при консервации придается особое значение и прилагаются усилия (подготовка донора и реципиента, создание специальных растворов), направленные на снижение интенсивности ПОЛ в тканях консервируемых органов.

Целью нашего исследования явилось изучение корреляции между динамикой ПОЛ и степенью накопления МСМ в ткани консервируемой печени.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДИКА ИССЛЕДОВАНИЯ

Эксперименты проводили на собаках обоего пола. Печень удаляли при общем обезболивании, отмывали от крови раствором специального состава, разработанным в лаборатории. Затем на протяжении 3 ч печень хранили в холодильной камере при температуре 4—6°C, причем в течение каждого часа орган промывали и заполняли перфузатом оригинального состава. В конце 3-го часа консервации печень промывали охлажденным раствором Рингера. Затем консервированную печень подключали к аппарату искусственного кровообращения, заполненному перфузатом, разбавленным (1:1) гепаринизированной кровью, полученной от собак с моделированной острой печеночной недостаточностью. Нормотермическое искусственное кровообращение изолированного консервированного органа проводили в течение 2 ч. В определенные сроки, а именно сразу после лапаротомии, после изъятия печени, через 3 ч ее консервации и в течение каждого последующего часа нормотермического искусственного кровообращения, забирали пробы ткани. В отбираемых образцах исследовали интенсивность ПОЛ с помощью определения концентрации малонового диальдегида (МДА) [12] и количества МСМ [1] в нашей модификации.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Полученные результаты показали (табл. 1), что при отмывании органа отмечалось уменьшение количества МСМ по сравнению с исходным уровнем (с $831 \pm 21,8$ до $742 \pm 13,8 \frac{\text{усл. ед.}}{\text{мг белка}}$). Через 3 ч гипотермической консервации количество среднемолекулярных веществ увеличилось до $1021 \pm 28 \frac{\text{усл. ед.}}{\text{мг белка}}$, что составило 22,8%. Однако в течение последующего периода нормотермического кровообращения изолированного консервированного

Таблица 1

Изменение количества МСМ и МДА в ткани печени
в течение консервации и последующей нормотермической перфузии

Параметр, усл. ед./мг белка	Пробы			
	исходные	после отмывания	через 3 ч консервации	через 2 ч перфузии
МСМ	831 ± 21,8	742 ± 13,8*	1021 ± 28,0*	1075 ± 23,7*
МДА	0,043 ± 0,006	0,05 ± 0,006	0,045 ± 0,005	0,017 ± 0,001*

* Различия достоверны по сравнению с исходными значениями ($p \leq 0,05$).

органа не наблюдалось увеличения количества МСМ по сравнению с таковым в период конца консервации.

Количество МДА статистически достоверно не изменялось при отмывании печени и в течение 3 ч ее консервации, однако на протяжении периода нормотермического искусственного кровообращения было отмечено статистически достоверное уменьшение количества МДА на 62,2%, т. е. его уровень был значительно ниже исходного.

Однозначно объяснить столь резкое уменьшение количества МДА, исходя из имеющихся в литературе данных о высокой связывающей способности МСМ, не представляется возможным [3]. Можно предположить, что одной из причин ингибирования ПОЛ является необратимое связывание ионов Fe^{2+} молекулами средней массы. Как показали полученные нами данные в период резкого угнетения ПОЛ, о котором свидетельствовало уменьшение количества МДА, отмечалось значительное увеличение количества МСМ в ткани печени: оно составило 29% по сравнению с исходным уровнем. В то же время снижение интенсивности ПОЛ некоторые авторы объясняют влиянием сорбированных на МСМ ионов тяжелых металлов, способных ингибировать процессы ПОЛ [15]. Кроме того, существует мнение о непосредственном действии ПОЛ на ферментативные механизмы. В пользу такого предположения свидетельствуют данные авторов, наблюдавших ингибирование под влиянием МСМ активности глюкозо-6-фосфатдегидрогеназы — фермента, поддерживающего необходимый для протекания ПОЛ уровень НАДФ.Н в клетке [13].

Таким образом, накопление в ткани печени значительного количества МСМ на фоне угнетения процессов ПОЛ ниже исходного уровня, необходимого для нормального функционирования клетки, свидетельствует о необходимости применения для защиты органа препаратов, препятствующих развитию наблюдаемого эффекта.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Габриэлян Н. И., Дмитриев А. А., Кулаков Г. П. и др. Диагностическая ценность определения средних молекул в плазме крови при нефрологических заболеваниях. — *Клин. медицина*, 1981, № 10, с. 38—42.
2. Гальперин Э. И., Семендяева М. И., Неклюдова Е. А. Недостаточность печени. М., 1978. 325 с.
3. Гудум В. И., Сигалла П., Иванова В. С. и др. Содержание молекул средней массы в крови детей с хронической почечной недостаточностью в условиях лечения краткосрочным гемодиализом. — *Вопр. мед. химии*, 1980, т. 26, № 6, с. 742—746.
4. Лифшиц Р. И. Система «токсические пептиды—белки—ингибиторы» в механизме раннего периода шока. — В кн.: *Острая ишемия органов и ранние постшемические расстройства*. М., 1978, с. 300—301.
5. Оксман Т. М., Далин М. В., Фиш Н. Г. и др. Биологически активные вещества в механизмах развития ранних постшемических расстройств. — В кн.: *Острая ишемия органов и ранние постшемические расстройства*. М., 1978, с. 316—317.
6. Чарная Л. Ф., Вальдман Б. М., Ефименко Г. П. и др. Характеристика токсических пептидов, выделенных из крови в условиях ожоговой циркуляторной гипоксии. — В кн.: *Острая ишемия органов и ранние постшемические расстройства*. М., 1978, с. 360—361.
7. Тушикова З. А. Влияние молекул средней массы из сыворотки крови обожженных на процессы перекисного окисления липидов. — *Вопр. мед. химии*, 1983, № 3, с. 108—111.
8. Тушикова З. А. Среднемолекулярные уремические токсины. — *Вопр. мед. химии*, 1983, т. 29, № 1, с. 2—10.
9. Bergstrom J., Furst P. Uremic middle molecules. — *Clin. Nephrol.*, 1976, vol. 5, N 4, p. 143—152.
10. Chang T., Migchelsen M., Coffey J. Serum middle molecules level in uremia during long term intermittent hemoperfusion with the ACAC. — *Trans. Amer. Soc. Artificial Internal Organs*, 1974, vol. 20A, p. 254—261.
11. Chapman G., Ward R., Farrell P. Separation and quantification of the middle molecules in uremia. — *Kidney International*, 1980, vol. 17, p. 82—88.
12. Ernster L. *Methods in enzymology*. New York; London, 1967, vol. 10. 750 p.
13. Kumegava M., Hiramatsu M., Yamada T. et al. Effect of intermediate-sized molecular components in uremic sera on nerve tissues in vitro. — *Brain Research*, 1980, vol. 198, p. 234—238.
14. Okuda M., Fukui T. Myocardial depressant factor. — *Jap. Circulation J.*, 1974, vol. 38, p. 497—508.
15. Wills E. Lipid peroxide formation in microsomes. — *Biochem. J.*, 1969, vol. 113, p. 315—324.

*Д. Л. Элерте, А. Я. Майоре, Э. С. Горштейн,
Л. А. Ремберга*

Рижский медицинский институт

ПЕРЕКИСНОЕ ОКИСЛЕНИЕ ЛИПИДОВ В МИТОХОНДРИЯХ ПЕЧЕНИ КРЫС ПРИ ОТРАВЛЕНИИ НЕКОТОРЫМИ ГЕПАТОТРОПНЫМИ ЯДАМИ

Возникновение и развитие патологических изменений в печени сопровождается нарушением функциональной активности и структурной организации мембран митохондрий (Мх) гепатоцитов. Среди факторов, вызывающих повреждение мембран Мх, важное место занимают процессы перекисного окисления липидов (ПОЛ) [5]. Установлено, что такие патологические состояния, как злокачественный рост, лучевое поражение, Е-авитаминоз и др., характеризуются накоплением гидроперекисей в липидной фракции митохондрий [6, 12, 13, 16]. В то же время о состоянии ПОЛ в Мх при патологических процессах в печени известно относительно мало. Учитывая существенное значение повреждения Мх в патогенезе заболеваний печени [9], особенно интересным мы считаем возможное участие ПОЛ в нарушении структурной и функциональной целостности Мх в условиях действия различных патогенных агентов. В настоящей статье приведены результаты изучения ПОЛ в Мх печени крыс при острой интоксикации такими гепатотропными ядами, как четыреххлористый углерод (CCl_4), солянокислый гидразин, аллиловый спирт, этанол и α -нафтилизотиоцианат (АНИТ), моделирующий разные типы патологических процессов в печени (гепатозогепатит, жировую дистрофию, белковую дистрофию, внутрипеченочный холестаз).

МАТЕРИАЛ И МЕТОДИКА ИССЛЕДОВАНИЯ

Исследования проводили на 8 группах белых крыс линии Вистар массой 160—230 г:

1) интактные животные (параллельно каждой из экспериментальных групп);

2) крысы, которым внутримышечно вводили по 0,2 мл 80%-ного масляного раствора CCl_4 на 100 г массы животного;

3) крысы, которым внутримышечно вводили по 0,2 мл оливкового масла на 100 г массы;

4) крысы, которым внутрибрюшинно вводили по 0,3 мл 6%-ного водного раствора гидразина на 100 г массы;

5) крысы, которым перорально (через зонд) вводили по 0,5 мл 1%-ного водного раствора аллилового спирта на 100 г массы;

6) крысы, которым перорально вводили по 0,5 мл 50%-ного этилового спирта на 100 г массы;

7) крысы, которым перорально вводили по 0,5 мл 2%-ного масляного раствора АНИТ на 100 г массы;

8) крысы, которым перорально вводили по 0,5 мл оливкового масла на 100 г массы.

Крыс убивали под легким эфирным наркозом путем обескровливания через 24, 48 и 72 ч после введения яда.

Мх выделяли из 1 г свежей печени по методу Шнайдера [36] и суспендировали в 0,025 М трис-НСI буфере, содержащем 1/10 объема 0,175 М КСI.

Для оценки состояния ПОЛ в изолированных Мх определяли содержание первичных продуктов липопероксидации конъюгированных диенов (КД) по методу И. Д. Стальной [21]. Концентрацию КД выражали в молях на 1 мг белка, используя молярный коэффициент экстинкции при 233 нм для сопряженных диенов полиненасыщенных высших жирных кислот — $2,2 \times 10^5 \text{ см}^{-1} \text{ М}^{-1}$ [33]. Содержание белка в Мх определяли по методу Лоури [31].

Полученные результаты обрабатывали общепринятыми методами вариационной статистики. Достоверность отклонения показателей от контрольных величин оценивали по *t*-критерию Стьюдента.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Известно, что CCl_4 в дозе 0,16 мл на 100 г массы животного вызывает гепатозогепатит, причиной которого является прооксидантное действие CCl_4 и нарушение обмена липопротенов, причем первичным местом действия является эндоплазматический ретикулум (ЭПР). Об этом свидетельствуют ранние структурные изменения этого вида органелл [34] и снижение общей массы микросом [2], а также раннее подавление активности микросомальных ферментов — глюкозо-6-фосфатазы [5], цитохрома Р-450 [1] и др.

Полученные нами данные показывают, что через 24 ч после введения CCl_4 достоверно повышается содержание КД в Мх

Таблица 1

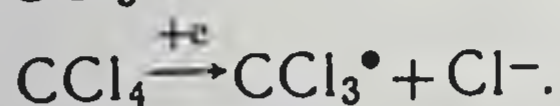
Содержание КД в митохондриях печени крыс после отравления CCl_4 ($M \pm m$)

Длительность опыта, ч	КД. 10^3 моль/мг: белка. при введении	
	масла	масла $\pm \text{CCl}_4$
24	$1,59 \pm 0,05$ (10)	$1,89 \pm 0,13$ (7)
48	$2,19 \pm 0,14^*$ (10)	$2,46 \pm 0,17^*$ (11)
72	$1,96 \pm 0,13$ (8)	$2,09 \pm 0,17$ (11)
Интakтные животные	$1,70 \pm 0,09$ (11)	

Примечание. Здесь и в табл. 2—5 в скобках указано число животных в группе; * — отклонение достоверно в отношении группы интактных животных; . — отклонение достоверно в отношении группы животных, которым вводили чистое масло.

печени (табл. 1) до 119% по сравнению с контролем. В следующие 2 сут уровень КД несколько снижается и составляет в среднем, соответственно, 112% и 106% от контрольных величин (отклонения недостоверны).

Гипотеза о прооксидантном действии CCl_4 [32, 33] указывает на способность НАДФ.Н — специфичной цепи переноса электронов в ЭПР — принимать участие в расщеплении данного яда с образованием свободных радикалов. Для этого необходим конечный акцептор электронов — цитохром P-450 [1]. В таком случае, согласно гомолитическому типу распада CCl_4 , может образоваться радикал CCl_3^\bullet :



Радикал CCl_3^\bullet очень активен и если образуется в липидной фазе, как в данном случае на цитохроме P-450, то в дальнейшем он может атаковать метиленовые мостики ненасыщенных жирных кислот, отнимать у них водород и переходить при этом в инертную молекулу хлороформа, попутно генерируя радикалы ненасыщенных жирных кислот [1].

Как показали Амстад с соавт. [24], перекиси липидов, образующиеся в микросомальной мембране, могут вызвать ряд поражений в митохондриальной мембране. Возможно, что именно поэтому под действием такого типичного микросомповреждающего яда, как CCl_4 , уровень перекисей липидов повышется также и в мембранах Мх.

Солянокислый гидразин вызывает обратимую жировую ди-

Таблица 2

Содержание КД
в митохондриях печени крыс
после отравления гидразином ($M \pm m$)

Длительность опыта, ч	КД. 10^{-8} моль/мг белка
24	$2,43 \pm 0,11^*$ (8)
48	$1,54 \pm 0,07$ (10)
72	$2,00 \pm 0,22$ (10)
Интактные животные	$1,62 \pm 0,11$ (11)

Таблица 3

Содержание КД в митохондриях
печени крыс после отравления
аллиловым спиртом ($M \pm m$)

Длительность опыта, ч	КД. 10^{-8} моль/мг белка
24	$1,55 \pm 0,28$ (8)
48	$1,68 \pm 0,21$ (9)
72	$2,27 \pm 0,31^*$ (9)
Интактные животные	$1,32 \pm 0,08$ (8)

строфию гепатоцитов, выражающуюся накоплением триглицеридов в печени [23]. Сотрудниками Проблемной лаборатории клинической биохимии инфекционных болезней РМИ [3, 15], а также другими авторами [28] установлено прооксидантное действие яда, проявляющееся в повышении уровня продуктов липопероксидации в гомогенатах печени подопытных животных. На основании этого мы выдвинули предположение об участии ПОЛ в патогенезе жирового гепатоза, вызванного гидразином [3]. Возможно, при этом ПОЛ играет определенную роль в дискоординации ферментных систем Мх [3].

Результаты, полученные нами при отравлении крыс солянокислым гидразином, показывают, что через 24 ч после введения яда содержание КД в Мх печени крыс возрастает (табл. 2) и в среднем достигает 150% от контроля. В течение следующих суток содержание КД достигает контрольного уровня, а к 72 ч от начала опыта наблюдается тенденция к повышению концентрации КД, не достигающей, однако, достоверных величин.

В отличие от описанных выше ядов аллиловый спирт является некрозогенным агентом, действие которого проявляется в белковой дистрофии гепатоцитов и формировании очаговых некрозов печени [2]. Имеются сведения о том, что необратимые изменения в печени возникают не под влиянием самого спирта, а являются результатом действия его метаболита — акролеина, который способен включаться и в свободнорадикальную реакцию [19]. Образующиеся при этом свободные радикалы могут вызвать усиление ПОЛ.

В результате повреждения печени аллиловым спиртом наблюдается другая динамика изменения содержания КД в Мх, чем

в двух вышеописанных случаях (интоксикация CCl_4 и гидразином). В первые 2 сут имеет место незначительная тенденция к повышению уровня КД (табл. 3), а к концу 3-х суток показатель достоверно увеличивается и в среднем составляет 172% от контроля.

Такое сильное повышение содержания продуктов ПОЛ может послужить поводом для предположения, что аллиловый спирт влияет на процессы ПОЛ в Мх печени крыс, но это не является первичной причиной повреждения клетки и Мх, так как, по литературным данным, морфологические изменения Мх наблюдаются уже через 3—4 ч с момента действия яда [18]. В течение 1-х суток снижается активность таких митохондриальных ферментов, как цитохромоксидаза и Mg^{2+} -АТФ-аза [11].

По данным некоторых авторов [29, 30], АНИТ вызывает внутрипеченочный холестаз. Сотрудниками Проблемной лаборатории клинической биохимии инфекционных болезней РМН подтверждено, что интоксикация АНИТ вызывает изменения ряда биохимических параметров, характерных для синдрома холестаза [8, 17]. Однако выявлены и некоторые биохимические сдвиги, не ограничивающиеся холестатическим эффектом яда, например повышение активности трансаминаз в сыворотке крови, свидетельствующее о наличии синдрома цитолиза. При этом максимальные изменения наблюдаются через 48 и 72 ч после введения яда. Что касается процессов ПОЛ, то уровень продуктов липопероксидации повышается уже через 24 ч после введения яда [17], а в Мх гепатоцитов — через 48 ч после отравления [22].

Изучение состояния ПОЛ в Мх при интоксикации АНИТ

Таблица 4

Содержание КД в митохондриях печени крыс после отравления АНИТ ($M \pm m$)

Длительность опыта	КД. 10^{-8} моль/мг белка, при введении	
	масла	АНИТ
24 ч	$2,63 \pm 0,25$ (6)	$2,18 \pm 0,30$ (9)
48 ч	$2,52 \pm 0,38$ (11)	$2,65 \pm 0,30$ (8)
72 ч	$3,31 \pm 0,20^*$ (6)	$3,79 \pm 0,30^*$ (8)
5 сут	$2,22 \pm 0,15$ (3)	$3,66 \pm 0,47 \cdot$ (3)
Интakтные животные	$1,78 \pm 0,28$ (11)	

позволяет выявить тенденцию к повышению уровня КД по сравнению с нормой в течение всего эксперимента (табл. 4), причем в более поздние сроки опыта (на 3-и и 5-е сутки) отклонения достигают достоверных величин. Однако повышение содержания КД в печени крыс не является результатом действия одного только яда, а частично обусловлено поступлением в организм ненасыщенных жирных кислот. Об этом свидетельствует повышенный уровень КД практически у животных всех контрольных групп, получавших только масло (см. табл. 4). Следует отметить, что аналогичное явление имеет место и в серии экспериментов, в которых в качестве гепатотропного агента был использован CCl_4 (см. табл. 1). Но в этом случае повышение содержания менее выражено, что, по-видимому, связано с меньшим количеством введенного масла (0,2 и 0,5 мл на 100 г массы соответственно), а также с различными путями поступления масла (перорально или внутримышечно).

Этанол в зависимости от дозы и длительности применения вызывает разные поражения печени: от жировой дистрофии гепатоцитов до цирроза органа. При этом происходят существенные изменения в Мх и ЭПР клеток печени [10, 20, 35]. Установлено, что при интоксикации этиловым спиртом нарушается структура мембранной системы клеток, в печени накапливаются триглицериды и эфиры холестерина [25], изменяются соотношения жирных кислот в фосфолипидах внешней и внутренней мембран Мх.

Согласно результатам ряда авторов, этанол обладает и прооксидантными свойствами [7, 14, 26, 27].

Определение содержания КД в Мх печени крыс при избранной нами дозе этанола не выявило достоверных изменений показателя после однократного введения яда (табл. 5).

Следует отметить, что при аналогичной постановке эксперимента относительно мало изменяются микроструктура и биохимические характеристики функционального состояния гепатоцитов [4], что свидетельствует скорее о кратковременном гиперметаболическом состоянии печени, чем о повреждающем действии этанола.

Таким образом, исследование содержания первичных продуктов ПОЛ в Мх печени крыс при интоксикации рядом гепатотропных ядов, обладающих прооксидантными свойствами и вызывающих раз-

Таблица 5

Содержание КД в митохондриях печени крыс после отравления этанолом ($M \pm m$)	
Длительность опыта, ч	КД. 10^{-8} моль/мг белка
24	$1,56 \pm 0,09$ (11)
48	$2,29 \pm 0,27$ (6)
72	$2,22 \pm 0,24$ (8)
Интактные животные	$1,96 \pm 0,18$ (11)

личные поражения печени, показало, что процессы липопероксидации в Мх при однократном поступлении патогенного агента изменяются мало и в большинстве случаев можно говорить только о тенденции к повышению уровня КД. Но в то же время у животных почти всех подопытных групп средние величины показателя превышают уровень, наблюдаемый у интактных животных. По-видимому, это свидетельствует о некоторой дестабилизации процессов ПОЛ в Мх, которая усиливается в случае холестаза и некробиоза в более поздние сроки эксперимента, а при жировой дистрофии (интоксикация CCl_4 и гидразином) сильнее выражена в начальной стадии патологического процесса.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Арчаков А. И., Карузина И. И. Молекулярные механизмы взаимодействия четыреххлористого углерода с мембранами эндоплазматического ретикулума печени. — В кн.: Успехи гепатологии. Рига, 1973, вып. 4, с. 39—59.
2. Блюгер А. Ф., Майоре А. Я. Молекулярно-биологический этап изучения патологии печени. — В кн.: Успехи гепатологии. Рига, 1973, вып. 4, с. 7—39.
3. Блюгер А. Ф., Майоре А. Я. Проблема перекисного окисления липидов в гепатологии. — В кн.: Успехи гепатологии. Рига, 1978, вып. 7, с. 22—54.
4. Блюгер А. Ф., Майоре А. Я., Горштейн Э. С. и др. Характеристика нарушений целостности мембран клеток печени при некоторых видах поражений органа. — В кн.: Успехи гепатологии. Рига, 1981, вып. 9, с. 5—25.
5. Владимиров Ю. А., Арчаков А. И. Перекисное окисление липидов в биологических мембранах. М., 1972. 252 с.
6. Воскресенский О. Н., Левицкий А. П. Перекиси липидов в живом организме. — Вопр. мед. химии, 1970, т. 16, № 6, с. 563—583.
7. Гаришвили Т. Г., Кривченкова Р. С., Горкин В. З. Дезаминирование азотистых соединений в митохондриальных мембранах при стимуляции перекисного окисления липидов. — Вопр. мед. химии, 1975, т. 21, № 5, с. 511—517.
8. Горштейн Э. С., Майоре А. Я., Макарова Н. А. Активность микросомальной системы гидроксилирования при внутрипеченочном холестазе у крыс, вызванном α -нафтиллизотиоцианатом. — В кн.: Экспериментальная патология печени. Рига, 1983, с. 63—69.
9. Елисеева Е. И., Майоре А. Я. Некоторые аспекты энергетической функции митохондрий в норме и при патологии печени. — Изв. АН ЛатвССР, 1980, № 6, с. 118—126.
10. Елисеева Е. И., Майоре А. Я., Ремберга Л. А. Характер изменений активности некоторых ферментов дыхательной цепи митохондрий печени при отравлении крыс этанолом. — В кн.: Энзимология патологических процессов. Рига, 1980, с. 24—28.
11. Елисеева Е. И., Ремберга Л. А. Оценка энерготрансформирующих процессов в печени крыс при аллиловой интоксикации. — В кн.: Биохимия патологических процессов. Рига, 1978, с. 21—26.
12. Коган М. Е., Ситковский Н. В., Данилов В. С., Козлов Ю. П. Образование перекисей в фосфолипидных мембранных структурах клетки и его роль в патогенезе злокачественного роста. — ДАН СССР, 1973, т. 208, № 3, с. 733—735.

13. Козлов Ю. П. Свободнорадикальное окисление липидов в биомембранах в норме и при патологии. — В кн.: Биоантиокислители. М., 1975, с. 5—15.
14. Копылова Т. Н., Майоре А. Я. Перекисное окисление липидов печени крыс при остром и хроническом отравлении этанолом. — В кн.: Вопросы биохимии патологических процессов. Рига, 1979, с. 24—27.
15. Копылова Т. Н., Майоре А. Я., Элerte Д. Л. и др. Перекисное окисление липидов при поражении печени солянокислым гидразином. — В кн.: Клеточная и субклеточная экспериментальная патология печени. Рига, 1982, с. 35—45.
16. Лузиков В. Н. Регуляция формирования митохондрий. М., 1980. 317 с.
17. Майоре А. Я., Горштейн Э. С., Кузнецова А. В. и др. Некоторые аспекты гепатотропного действия α -нафтилизотиоцианата. — В кн.: Экспериментальная патология печени. Рига, 1983, с. 77—87.
18. Майоре А. Я., Копылова Т. Н., Елисеева Е. И. и др. Роль перекисного окисления мембранных липидов в цитолизе и некрозе печеночных клеток. — В кн.: Вопросы биохимии патологических процессов. Рига, 1979, с. 47—52.
19. Несмеянов А. Н., Несмеянов И. А. Начала органической химии. М., 1974, т. 1. 623 с.
20. Пуралев Ю. Н., Иваева В. А. Влияние острой и хронической алкогольной интоксикации на проницаемость субклеточных структур гепатоцитов. — Патолог. физиология и эксперим. терапия, 1980, № 1, с. 64—65.
21. Стальная И. Д., Гаршвили Т. Г. Метод определения диеновых конъюгатов ненасыщенных высших жирных кислот. — В кн.: Современные методы в биохимии. М., 1977, с. 63—64.
22. Элerte Д. Л., Майоре А. Я. Перекисное окисление липидов в митохондриях печени крыс при отравлении α -нафтилизотиоцианатом. — В кн.: Экспериментальная патология печени. Рига, 1983, с. 106—110.
23. Amenta J., Johnsten E. Hydrazine-induced alteration in rat liver. A correlation of the chemical and histological changes in acute hydrazine intoxication. — Lab. Investig., 1962, vol. 11, N 1, p. 956—962.
24. Amstad P., Winterhalter K. H., Rihler C. Damage of mitochondria induced by microsomal lipids peroxidation. — Experientia, 1979, vol. 35, N 7, p. 930—935.
25. Corazzi L., Arienti G., Porcellati G. The effect of acute ethanol administration on the activity of membrane-bound enzymes of rat liver. — Pharmacol. Research Communications, 1980, vol. 12, N 8, p. 739—749.
26. Di Luzio N. R. A mechanism of acute ethanol-induced fatty liver and the modification of liver injury by antioxidants. — Lab. Investig., 1966, vol. 15, N 1, p. 50—63.
27. Di Luzio N. R., Hartman A. D. Role of lipid peroxidation in the pathogenesis of the ethanol induced fatty liver. — Fed. Proc., 1967, vol. 26, N 5, p. 1436—1440.
28. Di Luzio N. R., Stegge I. J., Hoffman E. O. Protective influence of DPPD on hydrazine induced lipid peroxidation and hepatic injury. — Experimental Molecular Pathol., 1973, vol. 19, N 3, p. 284—292.
29. El-hawari A. M., Plaa G. L. Impairment of hepatic mixed-function oxidase activity by α - and β -naphthylisothiocyanate: relationship to hepatotoxicity. — Toxicol. Appl. Pharmacol., 1979, vol. 48, N 3, p. 455—458.
30. Eliakim M., Eisner M., Ungar H. Experimental intrahepatic obstructive jaundice following ingestion of alpha-naphthylisothiocyanate. — Bull. Research Council Israel, 1959, vol. 83, p. 7.
31. Lowry O. H., Rosenbrough N., Randall R. Protein measurement with the folin phenol reagent. — J. Biol. Chem., 1951, vol. 193, N 1, p. 265—275.

32. *Recknagel R. O.* Carbon tetrachloride hepatotoxicity. — *Pharmacol. Rev.*, 1967, vol. 19, p. 145—209.
33. *Recknagel R. O., Ghoshal A. K.* Lipoperoxidation of liver microsomal lipids induced by carbon tetrachloride. — *Nature*, 1966, vol. 210, N 5041, p. 1162—1163.
34. *Richter G., Michel S., Mühlbach A.* Das Verhalten von Mononucleotiden und von Ribonucleinsäuren in der Überstandsfraktion der Mäuseleber nach CCl₄-Schädigung. — *Acta Biol. Med. Germ.*, 1962, vol. 6, p. 594—605.
35. *Schneider W. C.* Intracellular distribution of enzymes. — *J. Biol. Chem.*, 1948, vol. 176, N 1, p. 259—266.
36. *Scilling R. J., Reitz R. C.* A mechanism for ethanol-induced damage to liver mitochondrial structure and function. — *Biochim. Biophys. Acta*, 1980, vol. 603, N 2, p. 266—277.

II. МЕМБРАНЫ КЛЕТОК МИОКАРДА

УДК 617.127:576.311.34

*В. Р. Бауман, И. А. Киенкас, Б. К. Шелухина,
О. Я. Пупеле*

Рижский медицинский институт

ЛАБИЛИЗАЦИЯ ЛИЗОСОМАЛЬНЫХ МЕМБРАН МИОКАРДА ПРИ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЙ ПАТОЛОГИИ СЕРДЦА

Имеется ряд сообщений о роли лизосом и лабилизации лизосомальных мембран при различных патологиях миокарда. Так, подробно описаны лизосомальные сдвиги в более отдаленные сроки (на 2—5-й день) после воздействия повреждающего агента, частично отражающие воспалительные и репаративные процессы в миокарде [3, 7]. В целом эти сдвиги характеризуются повышением общей и связанной с частицами активности лизосомальных ферментов, снижением их соотношения. В то же время относительно роли лизосом, лабилизации лизосомальных мембран в патогенезе повреждения миокарда в первые часы после аппликации повреждающего фактора имеются противоречивые мнения. Показано, что при экспериментальной ишемии, вызванной путем перевязки левой коронарной артерии у собак, через 2—3 ч снижаются общая и связанная с частицами активность лизосомальных ферментов, происходит высвобождение этих ферментов из ткани миокарда [13]. При введении животным токсических доз адреномиметиков спустя 6—24 ч наблюдается снижение активности и латентности катепсина D, ацетилглюкозаминидазы, кислой фосфатазы. В дальнейшем эта активность повышается [6, 10]. Однако в условиях перфузии изолированного сердца свободная и связанная активность лизосомальных ферментов возрастают под воздействием адреномиметиков [4]. Автолиз (через 15—30 мин) сопровождался неоднократно сдвигами активности лизосомальных ферментов. Так, наблюдалось незначительное (на 5—10%) повышение неседиментируемой активности кислой фосфатазы и ацетилглюкозаминидазы и более заметное (до 50%) повышение активности катепсина D [5]. Более того, для оценки латентности лизосом миокарда авторы используют различные препараты лизосом,

применяют детергенты или для выявления снижения латентности сравнивают результаты, полученные при дезинтеграции лизосомальных мембран различными концентрациями детергентов [9, 14].

Целью нашей работы было изучение влияния некоторых внешних факторов на целостность лизосомальных мембран миокарда и сдвиги активности лизосомальных ферментов в различные сроки после поражения миокарда токсическими дозами адреналина, автолизом, медикаментозным наркозом, гипотермией.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДИКА ИССЛЕДОВАНИЯ

Опыты проводили на крысах-самцах массой 230—280 г, которым вводили адреналин (в дозах 5, 100 и 300 мкг/100 г массы), вызывали тотальную ишемию миокарда (автолиз) [4], медикаментозный наркоз и гипотермию [2]. Наркотизированных эфиром или наркозной смесью (тиопентал, морфин, оксибутират, атропин) крыс декапитировали, брали кровь и миокард для изучения. Миокард гомогенизировали, фракционировали дифференциальным центрифугированием [14], выделяли митохондриально-лизосомальную фракцию. Во всех фракциях определяли количество белка, активность кислой фосфатазы, катепсина D, β -глюкуронидазы [1]. О латентности лизосомальных ферментов судили по возрастанию активности ферментов после обработки лизосом тритоном X-100 и по соотношению активности лизосомальных ферментов во фракции, оседиментируемой при 40 000 g [8, 16].

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Мембраны лизосом миокарда подвергаются дезинтеграции уже при сравнительно мягких условиях гомогенизации, поэтому гомогенизация миокарда проводилась в максимально щадящих условиях, когда в осветленном (при 800 g в течение 10 мин) гомогенате обнаруживалось около 70—80% активности кислой фосфатазы и 60—65% количества белка. Обогащенная же лизосомами фракция осадка после центрифугирования при 40 000 g, по-видимому, содержит более прочную из двух главных в миокарде популяций лизосом [17]. Для полной дезинтеграции мембран этой фракции лизосом требовалось обязательное применение детергентов — дигитонина или тритона X-100 (0,1—0,2% в течение 5—10 мин), энергичная гомогенизация (в течение 1 мин при 2000 об/мин). В то же время на латентность лизосомальных ферментов влияло значение pH, при котором определяли активность ферментов (табл. 1).

Таблица 1

Латентность лизосомальных ферментов
в зависимости от pH инкубационной смеси
в обогащенной митохондриально-лизосомальной фракции

Название фермента	Латентность фермента, %, при pH				
	3,5	4,0	4,5	5,0	5,5
Кислая фосфатаза	—	0	0	15	30
β -Глюкуронидаза	—	0	18	32	52
Катепсин D	8	15	30	36	42

Как видно из табл. 1, при более низких значениях pH, зачастую совпадающих с оптимальным pH для действия изучаемого фермента, наблюдается резкое снижение латентности лизосомальных ферментов. Подобное явление отмечали и другие авторы [12, 15], хотя четкого объяснения снижения латентности не дали. Возможно, в данном случае помимо солюбилизации лизосомальных мембран и элиминации ферментов из них отмечается облегченная диффузия субстратов в лизосомы. На последнюю возможность косвенно указывает относительно меньшая чувствительность к сдвигам pH латентности катепсина D,

Таблица 2

Активность и латентность лизосомальных ферментов миокарда*
при тотальной ишемии сердца

Фермент (pH 5)	Контроль ($M \pm m$)	Тотальная ишемия в течение 30 мин ($M \pm m$)	Тотальная ишемия в течение 60 мин ($M \pm m$)	Повыше- ние актив- ности по сравнению с контро- лем, %
Кислая фосфатаза, ммк моль освобожденного <i>n</i> -нитрофенола/1 мг белка (в течение 30 мин):				
а) без тритона	97,4 \pm 2,7	105,1 \pm 3,5	104,0 \pm 2,8	12,8
б) с тритоном	86,6 \pm 2,1	97,5 \pm 6,9	104,8 \pm 2,6	12,1
β -Глюкуронидаза, ммк моль освобожденного фенолфталеина/1 мг белка (в течение 60 мин):				
а) без тритона	39,5 \pm 11,3	50,0 \pm 18,6	64,4 \pm 22,8	16,3
б) с тритоном	51,8 \pm 8,3	68,2 \pm 14,2	74,5 \pm 23,2	14,4
в) латентность, %	23	26	13	—

* Осветленный гомогенат.

субстратом которого является макромолекула — гемоглобин (см. табл. 1).

Сдвиги активности и латентности лизосомальных ферментов при тотальной ишемии сердца приводятся в табл. 2. Как видно из таблицы, хотя активность β -глюкуронидазы характеризуется большими индивидуальными колебаниями, при тотальной ишемии достоверно повышается активность лизосомальных ферментов, как связанных, так и несвязанных с частицами, поскольку сдвиги активности ферментов в контроле и при ишемии изучались в аликвотах одного и того же миокарда. При гипотермии, медикаментозном наркозе также наблюдалось некоторое повышение активности β -глюкуронидазы, катепсина D. Трудно, однако, однозначно охарактеризовать влияние повреждающих агентов на дезинтеграцию лизосомальных мембран путем определения латентности в опытах с тритоном.

В предварительных опытах нами было показано, что тритон вызывает некоторую инактивацию кислой фосфатазы и глюкуронидазы, поэтому в отдельных случаях активность кислой фосфатазы при использовании тритона меньше, чем в опытах без детергента (см. табл. 2). Тем не менее при тотальной ишемии, адреналиновом миокарде, гипотермии можно говорить о снижении латентности лизосом, повышении хрупкости лизосомальных мембран при патологических состояниях. В то же время степень снижения латентности примерно одинакова при неглубоких метаболических поражениях — гипотермии, медикаментозном наркозе и глубоких необратимых повреждениях миокарда: продолжительной тотальной ишемии, токсическом адреналиновом миокарде. Возникает вопрос: как объяснить отсутствие корреляции между глубиной поражения и сдвигами латентности лизосом? Возможно, что в отличие от широко распространенной точки зрения о пассивной компартиментализации лизосом для перехода последних в активированное состояние требуется активное участие лизосомальных мембран. Имеются публикации, посвященные стимулирующему действию АТФ на лизосомальные протеазы путем активации гипотетического протонного насоса в мембранах лизосом [11]. Наблюдаемое в наших опытах 5—10-кратное снижение уровня АТФ в клетке при тотальной ишемии, по-видимому, является одной из причин нарушения нормальных функций лизосом, направленных обычно на активацию репарационных процессов в клетке. Первыми этапами репарации являются ускоренная дезинтеграция, деградация нефункциональных биомолекул, а для активации лизосом требуется нормализация метаболических процессов в клетке. Однако достаточно конкретное понимание всех данных процессов будет возможно после выяснения структурно-биохимической организации мембран лизосом и характеристики как индивидуальных интегральных белков и липидов, так и их взаимодействия.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Лизосомы. Под ред. Дж. Дингла. Пер. с англ. М., 1980. 342 с.
2. Куенкас И. А., Утно Л. Я., Кокта А. Я. и др. Изменение гидролазной активности в миокарде при глубокой гипотермии. — В кн.: Биохимические исследования патологических процессов. Рига, 1983, с. 60—64.
3. Меерсон Ф. З. Адаптация, деадаптация и недостаточность сердца. М., 1978. 344 с.
4. Armiger L. C., Seelye R. N., Carneli V. M. et al. Morphologic and biochemical changes in autolysing dog heart muscle. — *Lab. Investig.*, 1975, vol. 34, N 4, p. 356—362.
5. Decker R. S., Foole A. R., Dingle J. T., Willdenthal K. Lysosomal alterations in autolysing rabbit heart. — *J. Molecular Cellular Cardiol.*, 1979, vol. 11, N 2, p. 189—196.
6. Decker R. S., Foole A. R., Griffin E. E. et al. Altered distribution of lysosomal cathepsin D in ischaemic myocardium. — *J. Clin. Investig.*, 1977, vol. 59, N 5, p. 911—921.
7. Decker R. S., Wildenthal K. Role of lysosomes and latent hydrolytic enzymes in ischaemic damage and repair of the heart. — In: *Degradative processes in heart and skeletal muscles* / Ed. by K. Wildenthal. Amsterdam etc., 1980, p. 390—418.
8. Fields M., Laujter A. Lysosomal enzyme release in the isolated perfused heart of immunised rats. — *J. Molecular Cellular Cardiol.*, 1977, vol. 9, N 11, p. 933—944.
9. Gotwik M. G., Kirk E. S., Hoffstein S. et al. Effect of collateral flow on epicardial and endocardial lysosomal hydrolases in acute myocardial ischaemia. — *J. Clin. Investig.*, 1975, vol. 56, N 4, p. 914—923.
10. Mueller E. A., Griffin W. S., Wildenthal K. Isopreteronol induced cardiomyopathy: changes in cardiac enzymes and protection by methylprednisolone. — *J. Molecular Cellular Cardiol.*, 1977, vol. 30, N 7, p. 565—578.
11. Okuma S., Moriyama Y., Takano T. Identification of a proton pump on lysosomes by fluorescein-isothiocyanate-dextran fluorescence. — *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, 1982, vol. 79, N 9, p. 2758—2762.
12. Rannels D. E., Kao R., Morgan H. E. Effect of insulin on protein turnover in heart muscle. — *J. Biol. Chem.*, 1976, vol. 250, N 5, p. 1694—1701.
13. Ricciuti M. A. Myocardial lysosome stability in the early stages of acute ischaemic injury. — *Amer. J. Cardiol.*, 1972, vol. 30, N 5, p. 492—502.
14. Romeo D., Stagni N., Lotlocasa G. L., Pugliarello M. C. Lysosomes in heart tissue. — *Biochim. Biophys. Acta*, 1966, vol. 130, N 1, p. 64—80.
15. Wellman D. E., Peters T. J. Properties of lysosomes in guinea pig heart. — *J. Molecular Cellular Cardiol.*, 1976, vol. 8, N 6, p. 443—446.
16. Wellman D. E., Peters T. J. Prevention of lysosomal disruption in anoxic myocardium by chloroquine and methylprednisolone. — *Pharmacol. Research Communications*, 1977, vol. 9, N 11, p. 29—38.
17. Wellman D. E., Peters T. J. Enhanced lysosome fragility in the anoxic perfused guinea pig heart: effect of glucose and mannitol. — *J. Molecular Cellular Cardiol.*, 1977, vol. 9, N 2, p. 101—120.

УДК 616.127:612.173.1:576.311.34

*В. А. Корзан, М. Я. Гиргенсоне, Р. К. Блума,
В. Р. Бауман*

Рижский медицинский институт

СДВИГИ БИОХИМИЧЕСКИХ ФУНКЦИЙ КЛЕТОЧНЫХ МЕМБРАН МИОКАРДА ПРИ ГЛУБОКОЙ ГИПОТЕРМИИ

В современной медицине гипотермия применяется для подавления интенсивности метаболических процессов и снижения потребления кислорода в клетке при различных хирургических вмешательствах — трансплантации, торакальной хирургии [3]. В кардиохирургии применяются общая гипотермия и локальная холодовая кардиоплегия [4]. В то же время при умеренной гипотермии (27—30°C) не всегда удается сбалансировать снижение интенсивности метаболических процессов и потребление кислорода, вследствие чего в миокарде развивается гипоксия [5]. Снижение же температуры тела до 15—20°C, т. е. применение очень глубокой гипотермии, связано и с другими опасными и зачастую непредсказуемыми последствиями [4, 7]. Исследования на ткани печени [17], сердца [13] показали, что при температуре 15—23°C наблюдаются фазовые переходы липидов, содержащихся в цитоплазматической мембране и мембранах клеточных органелл. Изменения структуры липидов мембран и клеточных органелл вызывают дисфункцию последних, что может привести к нарушению клеточной структуры и поражению клетки. Однако непосредственное детальное изучение функций клеточных мембран, в частности сарколеммы, связано с большими техническими трудностями. Поэтому ферментативные сдвиги клеточных органелл или целых клеток и тканей являются главными показателями, свидетельствующими о нарушениях клеточных органелл, их мембран, обеспечивающих компартиментализацию отдельных биохимических процессов клетки.

Ранее было отмечено наличие определенных сдвигов интенсивности перекисления липидов митохондриальных мембран при глубокой гипотермии и протективное действие антиокси-

дантов [8]. Целью наших исследований было изучение различных аспектов функций клеточных мембран миокарда при медикаментозном наркозе и глубокой гипотермии.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДИКА ИССЛЕДОВАНИЯ

Опыты проводили на крысах линии Вистар массой 250—280 г. В течение недели, предшествовавшей опыту, животные получали полноценный рацион, содержащий 18% казеина. В день опыта крыс наркотизировали смесью тиопентала, оксибутирата, атропина и морфина. Затем животных подвергали гипотермии ($23 \pm 1^\circ\text{C}$) в течение 60 мин. Контролем служили наркотизированные животные. После опыта крыс декапитировали, брали кровь и миокард для биохимического исследования. В плазме определяли активность аспартат- и аланинаминотрансферазы, креатинфосфокиназы и ее изоферментов путем их хроматографического разделения на ДЕАЕ-сефадексе А-50 по Мерцеру [16]. Дифференциальным центрифугированием миокард фракционировали для изолирования ядерной, митохондриальной, лизосомальной фракций и гналоплазмы. Для получения очищенных ядерных, митохондриальных и митохондриально-лизосомальных фракций использовали методы скоростного центрифугирования в растворах сахарозы. В изолированных ядрах определяли содержание РНК, ДНК, РНК-синтезирующую активность [1], в митохондриях — активность сукцинатдегидрогеназы, белоксинтезирующую активность. О функциях митохондрий судили также по содержанию АТФ в миокарде, которое определяли люциферин-люциферазным методом [14]. БиOLUMИ-несценцию регистрировали на флюориметре или с помощью жидкостного сцинтилляционного счетчика. В лизосомальной фракции определяли активность кислой фосфатазы, β -глюкуронидазы и катепсина D [9].

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

При функционировании миокарда в экстремальных условиях проявляется действие «аварийных механизмов» компенсации физиологических функций [10], которые включают стимуляцию транскрипции генома клетки. Нам не удалось выявить заметных сдвигов функций ядер миокарда при гипотермии — не изменялись содержание ДНК, РНК, суммарная активность транскрипции. По-видимому, глубокая гипотермия не вызывает существенных изменений функций ядерных мембран и регуляторные механизмы компенсируют вызываемые гипотермией метаболические сдвиги.

Нам не удалось обнаружить изменений активности сукцинат-

Таблица 1

Содержание АТФ в миокарде крыс и активность сукцинатдегидрогеназы при глубокой гипотермии и тотальной ишемии сердца

Условия опыта	АТМ, мкмоль/г сырой ткани	Активность сукцинатдегидрогеназы	
		ед/мг белка в гомогенате	ед/мг белка митохондрий
Контроль	$3,2 \pm 0,3$	$0,21 \pm 0,02$	$0,41 \pm 0,09$
Медикаментозный наркоз	$1,7 \pm 0,2$	$0,21 \pm 0,02$	$0,42 \pm 0,08$
Гипотермия	$2,8 \pm 0,4$	$0,22 \pm 0,03$	$0,40 \pm 0,08$
Тотальная ишемия (автолиз 30 мин)	$0,3 \pm 0,1$	—	—

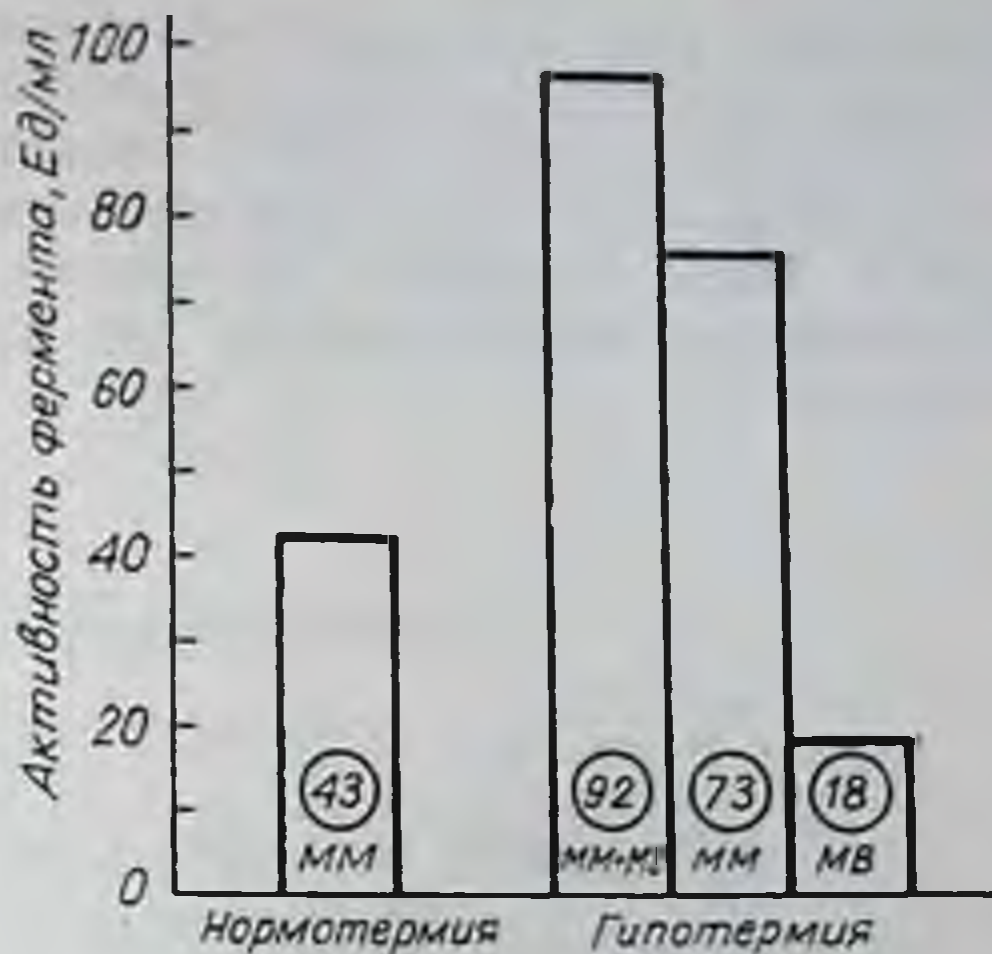
дегидрогеназы (маркера внутренней мембраны митохондрий) вследствие наркоза и гипотермии ни при расчете на белок миокарда, ни при расчете на белок митохондрий (табл. 1), что указывает на сохранение целостности митохондриальной мембраны, поскольку на фоне адреналинового миокардита гипотермия вызывает нарушение структуры митохондрий и снижение активности сукцинатдегидрогеназы в сердце [6].

Подобные сдвиги показателей ряда ферментов энергетического метаболизма обнаружены при энергетическом дефиците в различных опытах с применением глубокой гипотермии [2]. Нами было выявлено также снижение уровня АТФ в миокарде при медикаментозном наркозе (см. табл. 1), однако при гипотермии эти сдвиги были менее заметными. По сравнению с литературными данными [5] уровень АТФ в наших опытах у контрольных животных соответствует нижней границе нормы, что объясняется различиями в методике определения. Тем не менее наблюдаемые сдвиги дают основание предполагать, что при медикаментозном наркозе, гипотермии развивается гипоксия миокарда, вызывающая нарушение фосфорилирующей активности митохондрий. Отсутствие сдвигов активности сукцинатдегидрогеназы при одновременном снижении уровня АТФ в миокарде свидетельствует о том, что нарушения функций митохондрий миокарда носят функциональный характер.

Гипотермия в наших опытах вызывала повышение свободной активности лизосомальных ферментов — катепсина D, β -глюкуронидазы — и некоторое снижение их латентности в миокарде. Последнее указывает на повышение хрупкости лизосомальных мембран, хотя трудно предположить, что сравнительно незначительные (на 5—10%) сдвиги латентности являются главной причиной поражения клеток миокарда, поскольку подобные или даже менее выраженные изменения наблюдались при глубоких

Рис. 1. Влияние гипотермии на изоферментный спектр креатинфосфокиназы в плазме крови.

Условные обозначения: ММ, МВ — мышечные и сердечные изоферментные формы креатинфосфокиназы. Цифры в кружках отражают средние данные 10 независимых опытов.



поражениях миокарда — автолизе, тяжелом адреналиновом миокардите.

Несмотря на сравнительно небольшую глубину описанных сдвигов в миокарде животных при глубокой гипотермии, в их крови повышалась активность креатинфосфокиназы, а у отдельных животных — и аспартатаминотрансферазы. Источником данных ферментов могли бы быть скелетные мышцы, особенно в тех случаях, когда при недостаточно глубоком наркозе наблюдалось их мелкое подергивание во время гипотермии. Однако изучение изоферментного спектра креатинфосфокиназы позволило показать, что значительная элиминация данного фермента происходит также и из миокарда, о чем свидетельствовало появление в значительных количествах сердечной (МВ) изоферментной формы в плазме крови. У нормотермических животных данная форма в крови не была обнаружена (рис. 1). Известно, что 56% креатинфосфокиназы миокарда находится в цитоплазме, 28% — в митохондриях и 17% — в миофибриллах [12]. Однако при гипотермии в плазме появляется саркоплазматическая или сорбированная на миофибриллах фракция креатинфосфокиназы. Данный фермент принято считать надежным показателем поражения миокарда [15]. При глубокой гипотермии, по-видимому, происходят сдвиги в цитоплазматической мембране клеток миокарда, способствующие элиминации креатинфосфокиназы из сердца. Именно на поражение цитоплазматической мембраны клеток в последние годы обращено внимание многих исследователей, изучающих ишемическое поражение миокарда, кальциевый парадокс, токсическое поражение сердца [11]. Для нормального функционирования цитоплазматической мембраны требуется адекватное энергообеспечение, поскольку мембраны

содержат ряд аденозинтрифосфатаз, принимающих участие в осуществлении важнейших функций ионного транспорта клетки.

Снижение уровня АТФ в миокарде, наряду с непосредственным влиянием охлаждения на саркоплазматическую мембрану, могут быть главными причинами, вызывающими поражение миокарда в кардиохирургии при использовании глубокой гипотермии.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Бауман В. Р., Гром Н. П., Утно Л. Я., Корзан В. А. Характеристика ядерной фракции миокарда. — В кн.: Биохимические исследования патологических процессов. Рига, 1983, с. 10—13.
2. Верболович В. П., Теплова Л. Л., Нурахова Т. Г., Малишевская И. А. Особенности энергетического метаболизма миокарда в условиях искусственной гипотермии. — Кардиология, 1976, т. 16, № 6, с. 84—88.
3. Волколаков Я. В., Лацис А. Т. Глубокая гипотермия. Л., 1977. 152 с.
4. Дарбинян Т. М. Оборудование и гипотермия при хирургическом лечении больных врожденными пороками сердца. Автореф. дис. ... д-ра мед. наук. М., 1962. 31 с.
5. Константинов Б. А. Физиологические и клинические основы хирургической кардиологии. Л., 1981. 262 с.
6. Курыгин Г. Б., Фафурина М. Л. Влияние гипотермии на развитие гемодинамического отека легких. — Патолог. физиология и эксперим. терапия, 1974, № 6, с. 66—68.
7. Лехтман А. М. Изучение сердечной деятельности при глубокой гипотермии и наружном охлаждении. Автореф. дис. ... канд. мед. наук. М., 1971. 20 с.
8. Липсберга З. Э., Вевере С. Ж., Скардс И. В. Изменение активности глутатионпероксидазы и перекисного окисления липидов митохондрий миокарда при глубокой гипотермии. — В кн.: VI конференция биохимиков Прибалтийских республик, Белорусской ССР и Ленинграда. Рига, 1981, с. 345—346.
9. Лизосомы. Под ред. Дж. Дингла. Пер. с англ. М., 1980. 342 с.
10. Меерсон Ф. З., Явич М. П. Молекулярные механизмы гипертрофии и изнашивания сердечной мышцы. — Кардиология, 1983, т. 23, № 8, с. 5—11.
11. Пауков В. С., Фролов В. А. Элементы теории патологии сердца. М., 1982. 272 с.
12. Сакс В. А., Черноусова Г. Б., Воронков Ю. И. и др. Распределение изоферментов креатинфосфокиназы в сердечных клетках. — Кардиология, 1976, т. 16, № 6, с. 73—80.
13. Шепелев А. П. Зависимость состава и фазовых переходов липидов митохондрий миокарда белых крыс от глубокой гипотермии. — Биофизика, 1977, т. 22, № 3, с. 465—467.
14. Ellis R. J., Gardner C. Determination of myocardial high-energy phosphates using bioluminescence. — Anal. Biochem., 1980, vol. 105, N 2, p. 354—360.
15. Enzymes in cardiology. Diagnosis and research / Ed. by D. J. Hearse, J. de Leirs. Chichester etc., 1979. 560 p.
16. Mercer D. W. Separation of tissue and serum creatine kinase isoenzymes by ion exchange chromatography. — Clin. Chem., 1974, vol. 20, N 1, p. 36—40.
17. Ruth R. C., Weglicki W. B. The temperature dependence of the loss of latency of lysosomal enzymes. — Biochem. J., 1978, vol. 172, N 1, p. 163—173.

Л. Я. Утно, С. П. Витоль

Рижский медицинский институт

ИЗМЕНЕНИЯ В ЛИПИДАХ МЕМБРАН МИОКАРДА ПРИ ГЛУБОКОЙ ГИПОТЕРМИИ

Многокомпонентность состава, высокая специфичность и способность биологических мембран к быстрой реакции на изменения в организме позволяют предположить, что в мембранах существуют системы, обуславливающие, с одной стороны, определенную структурную организацию и, с другой стороны, некоторую лабильность, обеспечивающую эффективное выполнение ими биологических функций. Роль таких систем могут выполнять факторы, влияющие на уровень окислительных процессов в липидах мембран. Многими авторами показано, что окисление липидов подчиняется тем же закономерностям, что и жидкофазное окисление веществ [7]. Поэтому, рассматривая окисление липидов мембран миокарда, можно допустить, что скорость их окисления существенно зависит от температуры и веществ, способных встраиваться в мембрану и высокоактивных даже в малых концентрациях.

Мы исследовали влияние острого охлаждения и воздействия α -токоферола на изменение фосфолипидного состава, содержание липидов, холестерина и холестеридов миокарда.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДИКА ИССЛЕДОВАНИЯ

Исследования проводили на крысах-самцах линии Вистар массой 200—250 г. Крыс наркотизировали внутрибрюшинным введением 0,05 мл морфина, 0,05 мл сульфата атропина, 0,125 мл тиопентала и 0,2 мл γ -оксибутирата натрия на 100 г массы животного.

Для понижения температуры тела до $20 \pm 2^\circ\text{C}$ наркотизированных животных обкладывали мелкоколотым льдом. Средняя скорость охлаждения составляла $0,67\text{—}0,7^\circ\text{C}$ в 1 мин. Материал

для исследования был получен от декапитированных крыс следующих групп:

- 1) контрольные — интактные крысы;
- 2) наркотизированные, нормотермические крысы;
- 3) глубокая гипотермия + наркоз животных, охлажденных до $20 \pm 2^\circ\text{C}$ и выдержанных при этой температуре в течение 30 мин;
- 4) нормотермия + α -токоферол + наркоз животных, получавших в течение 7 дней по 30 мг/кг α -токоферола;
- 5) глубокая гипотермия + α -токоферол + наркоз животных, получавших в течение 7 дней по 30 мг/кг α -токоферола, охлажденных до $20 \pm 2^\circ\text{C}$ и выдержанных при этой температуре в течение 30 мин.

Митохондрии сердца крыс выделяли методом дифференциального центрифугирования и суспендировали в растворе 0,25 М сахарозы с 10 мМ трис-НСI [9]. Фосфолипидный состав определяли методом двухмерной тонкослойной хроматографии [2], содержание свободных жирных кислот после экстракции [10] — по методу Г. А. Орловой [3].

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Результаты нашего исследования показали (табл. 1), что в миокарде животных при глубокой гипотермии количество общих липидов увеличивается на 18% по сравнению с таковым у нормотермических животных. Вероятно, источником последних является жировая ткань в процессе гидролиза триглицеридов под действием тканевых липаз, активность которых возрастает в связи с усиленным синтезом катехоламинов в ответ на охлаждение организма. Освободившиеся жирные кислоты в комплексе с альбуминами сыворотки поступают в миокард, где они становятся эндогенным субстратом окисления. Таков, по-видимому, механизм перестройки метаболизма миоцитов при гипотермии, который завершается обновлением липидов через α -глицерофосфат путем ресинтеза триглицеридов из НЭЖК [1]. Как показано в табл. 1, концентрация холестерина и холестеридов в миокарде у гипотермических животных ниже, чем у нормотермических. Существует мнение, что холестерин в липидном обмене миокарда имеет определенное значение лишь как структурный компонент [6]. Однако обнаружено, что в ответ на различные типы стресса содержание холестерина снижается за счет повышенного превращения его в аденокортикоидные гормоны [2], что вполне реально и в условиях гипотермии.

Результаты количественных и качественных изменений фосфолипидов сердечной мышцы крыс в условиях гипотермии (табл. 2) показывают, что суммарный прирост количества фосфолипидов сердца сопровождается значительными сдвигами в соотношениях отдельных фракций.

Если повышение общего содержания фосфолипидов при глубокой гипотермии составляло 5,3% ($p < 0,05$), то содержание фракции фосфатидилэтаноламина увеличивалось на 19,1% ($p < 0,001$). Зная удельное содержание фосфатидилэтаноламина в сердечной мышце [4], можно утверждать, что общее повышение концентрации фосфолипидов в основном обусловлено изменениями в этой фракции. Надо отметить, что по данному вопросу существуют противоречивые мнения. А. П. Шепелев с соавт. [8] отмечают, что при снижении температуры тела до 18—20°C в митохондриях миокарда белых крыс значительно возрастает содержание фосфатидилэтаноламина и уменьшается количество фосфатидилхолина, в меньшей степени снижается концентрация фосфатидилсерина, что согласуется с нашими результатами. Однако имеются данные о том, что при гипотермии и стрессе изменяется лишь содержание отдельных фосфолипидов, а их общее содержание остается постоянным [11]. Обнаруженные нами количественные и

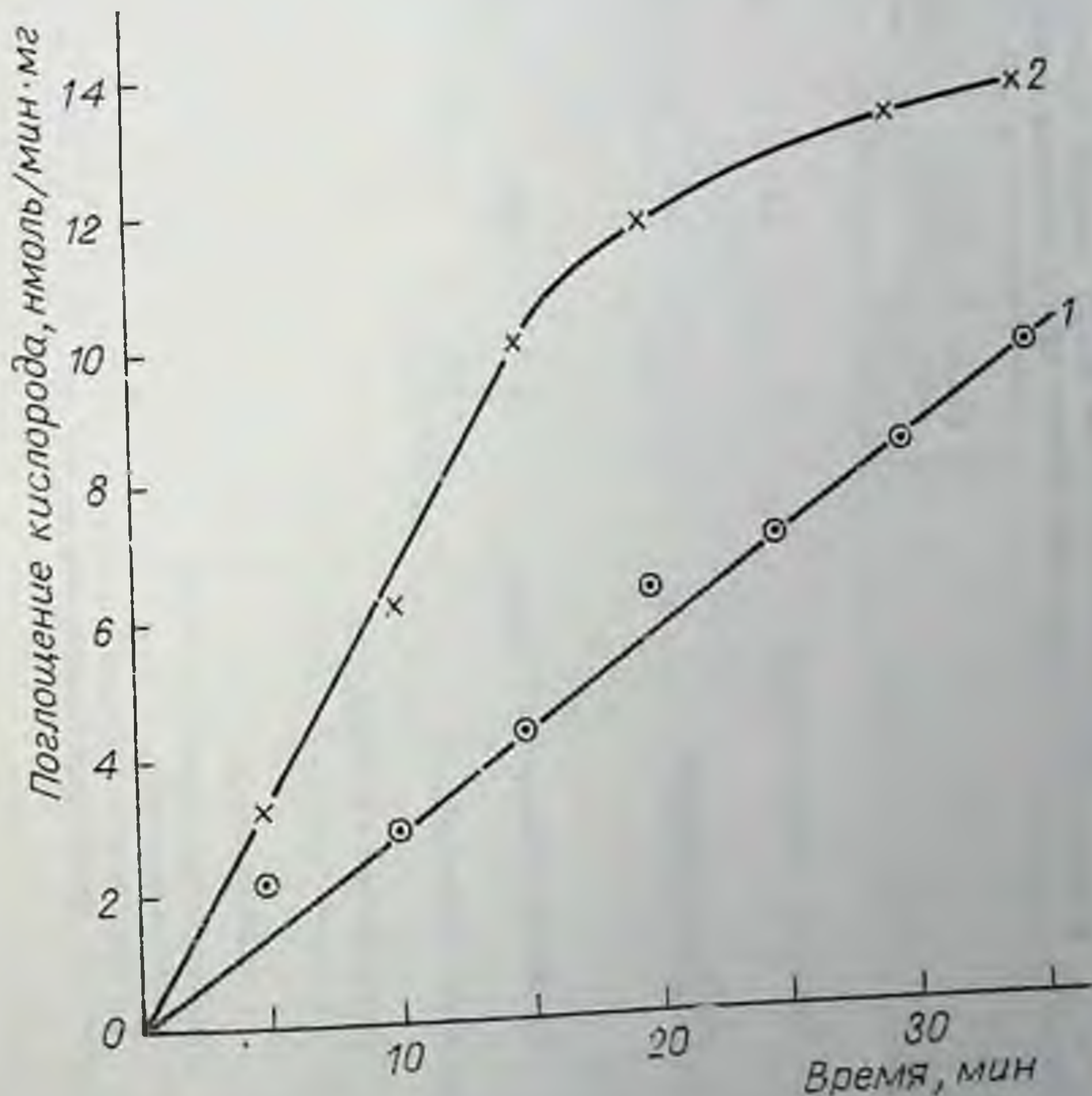


Рис. 1. Изменение окисляемости митохондрий при гипотермии: 1 — нормотермические митохондрии, 2 — гипотермические митохондрии. В качестве инициатора использован гематин.

Изменение концентрации общих липидов, холестерина, свободного холестерина и холестеридов в сердечной мышце крыс в условиях гипотермии и при введении α -токоферола

Группа крыс	Условия опыта	Кол-во крыс	Общие липиды, %	Общий холестерин, мм/кг	Свободный холестерин		Холестериды	
					мм/кг	% к конт-ролю	мм/кг	% к конт-ролю
1	Контроль (нормотермия)	5	2,4	8,4	3,34 ± 0,9	100	5,08 ± 2,41	100
2	Контроль + наркоз	6	2,09	13,1	9,41 ± 1,54 ($p < 0,05$) 2, 5*	281	3,73 ± 0,93	73
3	Глубокая гипотермия + наркоз	6	2,55	7,3	3,70 ± 1,3	111	3,58 ± 1,61 ($p < 0,05$) 1, 3*	70
4	Нормотермия + α -токоферол	7	2,76	7,3	3,24 ± 0,4 ($p > 0,005$) 1, 4*	97	4,00 ± 1,47 ($p > 0,05$) 1, 4*	79
5	Глубокая гипотермия + α -токоферол + наркоз	6	2,64	8,6	3,41 ± 0,5	102	5,14 ± 1,88 ($p < 0,05$) 2, 5*	101

* Цифры показывают, между какими группами крыс определяли p .

Изменение содержания общих фосфолипидов и некоторых фракций фосфолипидов
в гомогенате сердечной мышцы крыс в зависимости от гипотермии и воздействия α -токоферола

Группа крыс	Условия опыта	Фосфор, мг/г свежей ткани	фосфолипиды, мг/г свежей ткани	фосфолипиды, %	фосфатидилхоллин, %	фосфатидилэтаноламин, %
1	Контроль (нормотермия)	0,94 ± 0,00 (4) (n = 21)	23,41 (n = 21)	2,34 (n = 21)	40,9 ± 3,3 (n = 14)	37,0 ± 4,7 (n = 15)
2	Глубокая гипотермия	0,99 ± 0,04 (n = 11; p < 0,05)	24,70 (n = 11)	2,47 (n = 11)	42,4 ± 3,4 (n = 9; p > 0,05)	44,1 ± 3,2 (n = 9; p < 0,001)
3	Нормотермия + α -токоферол	1,01 ± 0,00 (8) (n = 17; p < 0,05)	25,3 (n = 17)	2,53 (n = 17)	38,8 ± 5,7 (n = 13; p > 0,05)	41,8 ± 5,8 (n = 13; p < 0,05)
4	Глубокая гипотермия + α -токоферол	0,95 ± 0,007 (7) (n = 10; p < 0,05)	23,8 (n = 10)	2,38 (n = 10)	39,1 ± 2,6 (n = 10; p > 0,05)	38,0 ± 4,4 (n = 10; p < 0,05)

качественные сдвиги в фосфолипидах при глубокой гипотермии, по-видимому, имеют компенсаторный характер, обеспечивающий функционирование мембранно-связанных ферментов в митохондриях в новых температурных условиях. Ранее нами было найдено, что при таком режиме гипотермии повышается активность МДГ, СДГ и фумаразы в митохондриях миокарда [5]. Полярнографическое исследование показало, что при гипотермии возрастает окисляемость митохондрией миокарда (рис. 1).

Введение α -токоферола увеличивало общее количество фосфолипидов и способствовало накоплению фосфатидилэтаноламина ($p < 0,05$). Механизм этого явления, вероятно, заключается в том, что α -токоферол препятствует разрушающему действию молекулярного кислорода на двойные связи в фосфолипидах.

В результате сочетания действия α -токоферола и глубокой гипотермии количество фосфолипидов в миокарде не изменялось, соотношение отдельных фракций также оставалось на уровне контрольных величин. Мы предполагаем, что характерные для гипотермии изменения фосфолипидов были предотвращены встраиванием боковой цепи молекулы α -токоферола в фосфолипиды мембран миокарда.

Таким образом, нами обнаружено, что в условиях глубокой гипотермии в миокарде повышается общее содержание липидов, фосфолипидов и снижается концентрация общего холестерина и холестеридов, а также изменяется соотношение отдельных фосфолипидов с увеличением доли легкоокисляющихся фракций. Эти изменения способствуют увеличению проницаемости и окисляемости липидной части мембраны и при восстановлении нормотермических условий могут стать причиной патологических явлений в мембранах. При продолжительном воздействии глубокой гипотермии (в течение 30 мин) введение α -токоферола перед охлаждением в силу его антирадикального и мембраностабилизирующего действия предотвращает количественные и качественные изменения фосфолипидов миокарда.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Акерман Л. Г. Липидный обмен в неповрежденном миокарде при остром инфаркте миокарда. — Кардиология, 1971, т. 11, № 11, с. 145—154.
2. Леменовская А. Ф., Коен Я. М., Перевощикова К. А. и др. Фосфолипидный состав ядерных мембран и ядер печени и гепатомы у крыс. — Биохимия, 1976, т. 41, вып. 6, с. 1000—1003.
3. Орлова Г. А., Балаховский И. С. Микрометод определения незтерифицированных жирных кислот в крови. — Лаборатор. дело, 1969, № 9, с. 523—526.
4. Робинсон Д. Б. Выделение и состав мембран. — В кн.: Биологические мембраны. М., 1978, с. 29.

5. Утно Л. Я., Лацис А. Т., Веверис С. Ж. Влияние глубокой гипотермии на перекисное окисление липидов и ферментативную активность митохондрий миокарда. — В кн.: Биохимическая характеристика патологических процессов. Рига, 1980, с. 94—97.
6. Хефтман Э. А. Холестерин. — В кн.: Биохимия стероидов. Пер. с англ. М., 1972, с. 21.
7. Храпова Н. Г. Перекисное окисление липидов и системы, регулирующие его интенсивность. — В кн.: Биохимия липидов и их роль в обмене веществ. М., 1981, с. 141—155.
8. Шенелев А. П. Перекисное окисление липидов в органах теплокровных животных в динамике острой гипотермии. — В кн.: Структура, биосинтез и превращение липидов в организме животного и человека. М., 1975, с. 110—117.
9. Crann F. L., Glenn G. L., Green D. E. Studies of electron transfer-system. The electron transferer particles. — *Biochim. Biophys. Acta*, 1956, vol. 22, N 3, p. 475—476.
10. Lauwerus R. Colorimetric determination of free fatty acids. — *Anal. Biochem.*, 1969, vol. 32, N 2, p. 331—333.
11. Polis B. D., Polis E., Schwarz H. P. et al. The effect of cold on the composition of the blood plasma of healthy athletes. — *Proc. Soc. Experimental Biol. Med.*, 1974, vol. 145, N 1, p. 70—73.

III. МЕМБРАНЫ КЛЕТОК КРОВИ

УДК 612.112.94; 612.017.11; 612.002.17

*Х. М. Векслер, Р. Г. Чарная, Н. А. Осна,
М. К. Бачинская*

Рижский медицинский институт

ОПЫТ ВЫЯВЛЕНИЯ РЕЦЕПТОРОВ МЕМБРАН ЛИМФОЦИТОВ КРОВИ К ЭНДОГЕННЫМ АНТИГЕННЫМ ПРЕПАРАТАМ И ФАРМАКОЛОГИЧЕСКИ АКТИВНЫМ ВЕЩЕСТВАМ У БОЛЬНЫХ ВИРУСНЫМИ ГЕПАТИТАМИ А И В

Клеточными рецепторами иммунокомпетентных клеток (иммуноцитов) принято считать макромолекулярные структуры, представляющие собой распознающие структуры для взаимодействия с агентами и другими иммунологически активными молекулами [2].

Доказано, что данные рецепторы постоянно отделяются с фрагментами мембран от клетки и быстро обновляются, примерно в течение 4—6 ч. Этого требует постоянный и весьма интенсивный синтез указанных рецепторов.

Из наиболее распространенных методических подходов для изучения подобных рецепторных структур является тест розеткообразования, т. е. прилипания лимфоцитов крови к антигенам эритроцитов барана, мыши и аутологической природы [6—12].

Помимо указанного применяют ряд других методов, основанных на аналогичном принципе индикации феномена взаимодействия рецептора с иммунологически активными веществами (тесты торможения миграции лейкоцитов, торможения прилипания лейкоцитов и т. п.).

Таким образом, с помощью, например, феномена розеткообразования удастся изучить не только количественные параметры наличия соответствующих рецепторов на клетках, но и функциональное состояние, их синтетическую активность.

Имеется крайне мало публикаций, посвященных характеристике рецепторного аппарата иммуноцитов при вирусном гепатите и его исходах [1, 3—5].

Целью нашей работы было изучение динамики рецепторного аппарата иммуноцитов крови больных вирусными гепатитами А и В к антигенам ксеногенных и сингенных эритроцитов и ряду иммунологически активных веществ эндогенной и экзогенной природы для выяснения его патогенетического и диагностического значения.

Наличие рецепторов на иммуноцитах периферической крови у больных ВГА

Рецепторы	Разгар болезни			Ранняя реконвалесценция		
	Л	СТ	Т	Л	СТ	Т
Эритроциты барана (Е-РОК)	Общее кол-во	Н	↓	Н	Н	Н
	Термостабильные при 37°С	Н	Н	↑	Н	↑
	Теофиллин	↓	Н	Н	Н	Н
	Гистамин	↓	Н	Н	Н	Н
Эритроциты мышей (МЕ-РОК)	Малодифференцированные	Н	Н	Н	Н	Н
	Обработанные пананном	Н	↓	↓	Н	↓
Аутоэритроциты (РОК)*	IV группа	↑	↓	Н	↑	Н
	С аутоэритроцитами	IV группа	↓	Н	IV группа	Н

* Розеткообразующие клетки с аутоэритроцитами приготовляли в двух вариантах: с аутоэритроцитами и с пулом IV группы крови доноров, чтобы определить тормозящий фактор аутоэритроцита в этой реакции.

Условные обозначения: Л — легкая, СТ — средняя, Т — тяжелая формы; Н — неизмененное кол-во, ↑ — достоверное повышение, ↓ — достоверное понижение.

Наличие рецепторов на иммуноцитах периферической крови у больных ВГВ

Рецепторы	Разгар болезни			Ранняя реконвалесценция		
	Л	СТ	Т	Л	СТ	Т
Эритроциты барана (Е-РОК)	Н	Н	Н	Н	Н	Н
	Н	Н	↑	Н	↑	↑
	↑	↑	↓	↑	↓	Н
	Н	Н	Н	Н	Н	Н
Эритроциты мышей (МЕ-РОК)	Н	↑	↑	Н	Н	Н
	Н	↓	↓	Н	Н	↑
Аутоэритроциты (РОК) [*]	↓	↓	Н	Н	Н	↑
	С аутосывороткой					IV группа

Нами были рассмотрены 272 больных вирусными гепатитами А и В. В результате изучения наличия отдельных рецепторов на лимфоцитах крови в разгаре и в период ранней реконвалесценции вирусного гепатита А (ВГА) (табл. 1) были отмечены следующие особенности.

В разгар легкой формы болезни снижается ($p < 0,01$) содержание Т-лимфоцитов, несущих рецепторы к теофиллину и гистамину, характерные маркеры для клеток с супрессорной активностью. При этом установлена связь между наличием Е-РОК крови с рецепторами для теофиллина в интервале 0—10% с легкой формой ВГА (коэффициент связи 1,97).

В разгар среднетяжелой формы ВГА достоверно снижается содержание Т-клеток крови, несущих рецепторы к антигену эритроцитов барана и собственных эритроцитов больных, а также В-лимфоцитов крови, несущих рецепторы к антигенам эритроцитов мышей, стимулированных папаином.

Разгар тяжелой формы ВГА отличается от аналогичного периода среднетяжелой формы болезни достоверным повышением содержания Т-клеток, несущих термостабильные рецепторы к эритроцитам барана.

В период ранней реконвалесценции наблюдается нормализация лишь отдельных изученных показателей.

В разгар легкой и среднетяжелой форм вирусного гепатита В (ВГВ) (табл. 2) достоверно повышается содержание Е-РОК, несущих теофиллиновые рецепторы (супрессоры), и снижается содержание ауторозеткообразующих Т-клеток, а в период ранней реконвалесценции легкой формы ВГВ остается повышенным относительное содержание теофиллиновых Е-РОК супрессоров, в то время как в аналогичный период среднетяжелой формы болезни достоверно снижается содержание теофиллиновых и термостабильных Е-РОК крови.

Для разгара тяжелой формы ВГВ характерно существенное повышение содержания Е-РОК, несущих рецепторы к эритроцитам барана (стабильные при 37°C) и мышей (см. табл. 2), а также снижение содержания Е-РОК, несущих рецепторы к теофиллину, и МЕ-РОК, несущих рецепторы к эритроцитам мышей, стимулированных папаином. Важно подчеркнуть, что только в период ранней реконвалесценции больных легкой формой ВГВ отмечается персистирование повышенного содержания Т-клеток, несущих теофиллиновую метку супрессоров, а у больных с более тяжелыми формами ВГВ этот показатель понижается. Для указанного периода тяжелой формы болезни характерна повышенная мобилизация термостабильных Е-РОК (интерлейкин-1-чувствительных) и ауто-РОК крови (интерлейкин-2-чувствительных), т. е. ключевых субпопуляций Т-клеток, мобилизующих регулирующие и эффекторные звенья иммунного ответа.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Блюгер А. Ф., Крупникова Э. З., Силюнова Г. И. и др. Хронический лобулярный гепатит в исходе вирусного гепатита. — В кн.: Успехи гепатологии. Рига, 1981, вып. 9, с. 113—125.
2. Петров Р. В. Иммунология. М., 1983. 368 с.
3. Петров Р. В., Ковальчук Л. В., Павлюк Б. В. и др. Клиническая оценка иммунорегуляторных субпопуляций, лимфоцитов (Т-супрессоров и Т-помощников). — Иммунология, 1980, № 5, с. 30—33.
4. Савицкий Г. И., Бугаева Н. П., Кетиладзе Е. С. Субпопуляции Т-лимфоцитов при вирусных гепатитах А и В. — В кн.: VI Всесоюзная конференция по клинической биохимии, морфологии и иммунологии инфекционных болезней. Тез. докл. Рига, 1983, с. 499.
5. Усонис В. А., Цайтнер Б. В., Шестопалова А. М. Клинико-патогенетическая оценка субпопуляций лимфоцитов при хроническом вирусном гепатите у детей. — Педиатрия, 1981, № 6, с. 67—71.
6. Caraux J., Thierry C., Esteve C. et al. Human autologous rosettes. 1. Mechanism of binding of autologous erythrocytes rosettes by T-cell. — Cellular Immunol., 1979, vol. 45, N 1, p. 36—38.
7. Gupta S., Grieco M. Rosette formation with mouse erythrocytes: Probable marker for human B-lymphocytes. — Intern. Arch. Allergy Appl. Immunol., 1975, vol. 49, N 2, p. 734—742.
8. Jondal M., Holm G., Wigzell H. Surface markers on human T- and B-lymphocytes forming nonimmune rosettes with sheep red blood cells. — J. Experimental Med., 1972, vol. 136, N 2, p. 207—215.
9. Limatibul S., Shores A., Dosch H., Geljord E. Theophylline modulation of E-rosette formation: an indicator of T-cell maturation. — Clin. Experimental Immunol., 1978, vol. 33, N 3, p. 503—513.
10. Malokeyszy J., Szeliga W., Kraus-Filarska M., Panaszek B. Effect of histamine on the spontaneous rosette formation. — Arch. Immunol. Therapiae Experimentalis, 1980, vol. 28, N 4, p. 885—889.
11. Wansbrough-Jones M. H., Scullardes H., Nicholson A. et al. Lymphocytes forming stable E-rosettes in acute and chronic hepatitis. — Clin. Experimental Immunol., 1979, vol. 35, N 3, p. 390—396.
12. Zola H. Fractionation of human lymphocytes using rosette formation with papain-treated mouse erythrocytes. — J. Immunol. Methods, 1977, vol. 18, N 3/4, p. 387.

Л. Д. Визбуле, Б. Л. Дундуре

Отделение медико-биологических проблем электротехники ВНИИКП

СПОСОБ ВЫДЕЛЕНИЯ МЕМБРАН ЭРИТРОЦИТОВ КРЫС И ОПРЕДЕЛЕНИЯ АКТИВНОСТИ АТФ-аз

АТФ фосфогидролаза К.Ф.3.6.13 (АТФ-аза) является мембранным ферментом различных клеток. АТФ-азы найдены в клетках мозга, печени, почек, слизистой желудка, слюнных желез, однако и по сей день не имеется окончательного представления о специфичности АТФ-аз отдельных клеток [1, 2, 6].

Главной функцией АТФ-аз является сопряжение энергии гидролиза АТФ с избирательным транспортом ионов через плазматические мембраны, причем действие этого фермента имеет векторный, или направленный, характер. По характеру действия различают Na^{+} -, K^{+} -, Mg^{2+} -, Ca^{2+} - и HCO_3^{-} -АТФ-азы.

Самой удобной моделью для исследования АТФ-аз являются так называемые «тени эритроцитов» (мембраны эритроцитов), так как в эритроцитах отсутствуют митохондрии и АТФ-азы локализованы непосредственно в мембранах.

В настоящее время возрос интерес к изменениям АТФ-аз при различных функциональных и особенно патологических состояниях организма [3—5, 9].

Целью нашего исследования была разработка способа выделения мембран эритроцитов и определения активности АТФ-аз в них с помощью колориметрического метода вместо общепринятого радиометрического [7, 8—10].

1. Выделение мембран эритроцитов крысы. Кровь (0,5 мл) с антикоагулянтом (трилон Б) центрифугировали, плазму снимали. Осадок эритроцитов и лейкоцитов отмывали в 2 мл 10 мМ трис-солянокислого буфера (рН 7,4) с 150 мМ раствором хлористого натрия. Гемолиз эритроцитов производили в 2 мл 20 мМ гистидинового буфера (рН 7,4). Лейкоциты отделяли от мембран эритроцитов фракционированным центрифугированием при

скорости 2300 g, а не просто отмывали, как было предложено ранее [2—4, 9], что позволило полностью избавиться от примесей лейкоцитов.

Затем мембраны эритроцитов отмывали от гема при 12 000 g в течение 10 мин в 5 мМ трис-сернокислом буфере (pH 7,4) (до обесцвечивания надосадочной жидкости).

2. Определение активности АТФ-аз. В основу определения активности АТФ-аз положена способность фермента гидролизовать эфирную связь АТФ с отщеплением неорганического фосфора, наличие которого определяют колориметрическим методом [10].

АТФ-азную активность измеряли при 37°C в 1 мл инкубационной смеси, содержащей 50 мМ трис- H_2SO_4 буфера (pH 7,4), 2 мМ $MgCl_2$ 120 мМ $NaCl$, 30 мМ KCl и 0,25 мМ АТФ; время инкубации составляло 30 мин. По сравнению с общепринятой мы снизили концентрацию АТФ в 8 раз (с 2 мМ, предложенной ранее [10], до 0,25 мМ), что позволило получить оптимальные значения оптической плотности для контрольных и опытных проб. Как видно из рис. 1, при понижении концентрации АТФ до 0,25 мМ активность фермента не изменилась. Регистрацию оптической плотности проводили на спектрофотометре «Спекорд М-40».

Величину активности АТФ-аз высчитывали по калибровочной кривой, используя в качестве стандарта K_2HPO_4 (0,011408 г в 100 мл воды — 500 мкМ $K_2HPO_4 \cdot 3H_2O$), и выражали в мкМ отщепившегося фосфата на 1 мг белка за 1 ч.

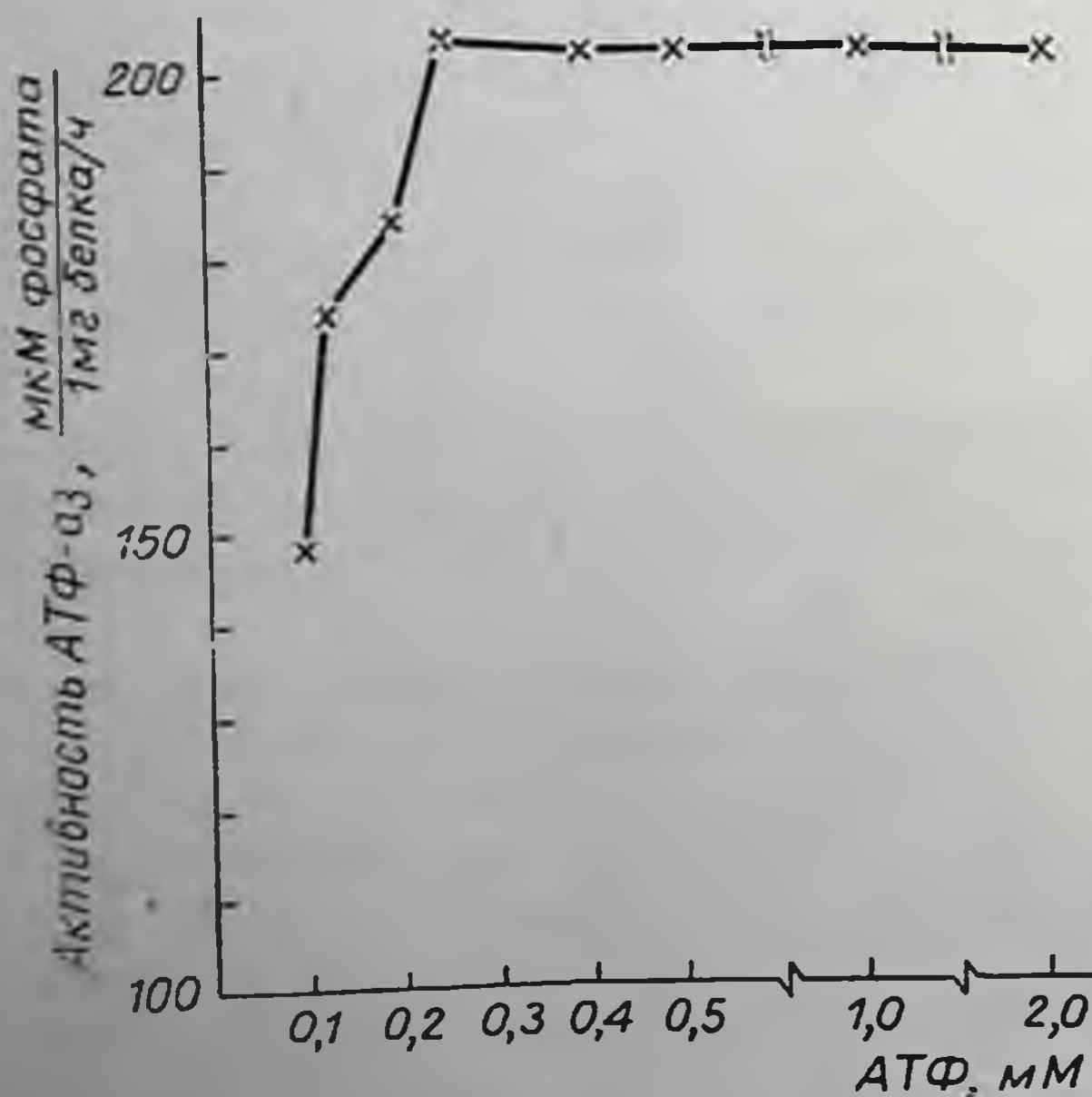


Рис. 1. Зависимость активности АТФ-аз от концентрации субстрата.

Таблица 1

Общая активность АТФ-аз $\left(\frac{\text{мкМ фосфата}}{\text{1 мг белка/ч}} \right)$
в мембранах эритроцитов интактных крыс
и после воздействия электростатического поля

Интактные животные	Подопытные животные	Интактные животные	Подопытные животные
0,378	0,454	0,401	0,467
0,465	0,408	0,424	0,434
0,429	0,447	0,451	0,435
0,328	0,407	0,375	0,427
0,465	0,395		

Вышеописанным методом определяли общую АТФ-азную активность в мембранах эритроцитов у интактных крыс и животных, подвергнутых действию электростатического поля напряженностью 90 кВ/м (экспозиция в поле — 3 дня по 4 ч ежедневно) (табл. 1). Животных ($n=18$) декапитировали сразу же после отключения электричества. Активность АТФ-аз в группе интактных животных составила $0,413 \pm 0,015 \frac{\text{мкМ фосфата}}{\text{1 мг белка/ч}}$, что согласуется с литературными данными, в группе подопытных — $0,437 \pm 0,020 \frac{\text{мкМ фосфата}}{\text{1 мг белка/ч}}$.

Таким образом, электростатическое поле в условиях данного эксперимента не вызвало каких-либо заметных изменений активности АТФ-аз в мембранах эритроцитов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Глебов Р. Н. Исследование активности АТФ-азных систем в различных фракциях микросом коры головного мозга крыс. — Биохимия, 1972, т. 37, вып. 2, с. 360—364.
2. Иващенко А. Т. Аниончувствительная аденозинтрифосфатаза мембран эритроцитов крысы. — Биохимия, 1978, т. 43, вып. 6, с. 1086—1089.
3. Иващенко А. Т. Некоторые свойства аниончувствительной АТФ-азы эритроцитов. — Вопр. мед. химии, 1980, т. 26, № 5, с. 668—671.
4. Ивашенко А. Т., Рыскулова С. Т. Стимулируемая бикарбонатом АТФ-аза мембран эритроцитов крысы. — Вопр. мед. химии, 1979, т. 25, № 6, с. 719—722.
5. Иващенко А. Т., Утеулин К. Р. Кинетические характеристики анионной аденозинтрифосфатазы эритроцитов. — Вопр. мед. химии, 1983, т. 29, № 1, с. 128—130.

6. *Пикулев А. Т., Щербань А. И.* Регуляция активности АТФ-аз мозга крыс нордреналином. — *Вопр. мед. химии*, 1979, т. 25, № 6, с. 719—722.
7. *Lowry O. H.* Protein measurement with the folium phenol reagent. — *J. Biol. Chem.*, 1951, vol. 193, p. 265—275.
8. *Martha L. J., Vincenzi F.* Enhancement of $(Ca^{2+} + Mg^{2+})$ -ATP-ase activity of human erythrocyte membranes by hemolysis in isosmotic imidazole buffer. — *Biochim. Biophys. Acta*, 1977, vol. 471, p. 49—58.
9. *Meltzer H. L., Kassir S.* Enhanced activation of human erythrocyte Ca^{2+} -ATP-ase by calmodulin after storage of brief exposure to disulfite. — *Biochim. Biophys. Acta*, 1981, vol. 643, p. 243—250.
10. *Rathbun W. B., Bettlach M. V.* Estimation of enzymically produced orthophosphate in the presence of cystein and adenosine triphosphate. — *Anal. Biochem.*, 1969, vol. 28, p. 436—445.

Ю. П. Гичев, В. И. Хаснулин

Новокузнецкий НИИ комплексных проблем гигиены
и профзаболеваний СО АМН СССР

ИЗМЕНЕНИЕ ПОКАЗАТЕЛЕЙ ПЕРЕКИСНОГО ОКИСЛЕНИЯ И АНТИОКИСЛИТЕЛЬНОЙ АКТИВНОСТИ ЛИПИДОВ ПРИ ХРОНИЧЕСКИХ ПОРАЖЕНИЯХ ПЕЧЕНИ

Известно [14], что липиды клеточных мембран являются основным субстратом реакций перекисного окисления липидов (ПОЛ). Общепатологическое значение названных реакций весьма велико, поскольку они связаны с поддержанием структурной и функциональной целостности клеточных мембран организма, что, в свою очередь, тесно связано с протеканием основных жизненно важных функций клетки [4].

В то же время следует заметить, что определенный уровень ПОЛ имеет место и в нормально функционирующих тканях, о чем свидетельствует постоянное обнаружение в них перекисей липидов, хотя и в невысоких концентрациях [4, 7]. Регуляция уровня активности процессов ПОЛ в организме осуществляется так называемой антиоксидантной системой [5, 14], которая и определяет способность организма тормозить повышение свободнорадикального окисления липидов [6].

На основании сведений о ведущем значении печени в липидном обмене [10, 12] и в синтезе основных структурных компонентов клеточных мембран [3, 13, 15], о том, что прежде всего с печенью как с барьером соприкасаются различные токсические вещества экзо- и эндогенного происхождения, можно допустить, что в печени должна существовать достаточно мощная антиоксидантная система, предназначенная для защиты липидных мембранных структур как самой печени, так и других органов и тканей организма. В связи с этим справедливо звучит вывод А. Ф. Блюгера и А. Я. Майоре [2] о том, что особое внимание исследователей должно быть обращено на изучение состояния антиокислительных систем клеток.

На основе вышесказанного можно предположить, что изолированное поражение печени будет сопровождаться дефицитом

антиоксидантов в организме, нарушением регуляции интенсивности свободнорадикальных реакций и вследствие этого — увеличением концентрации гидроперекисей и продуктов их распада.

С целью изучения этого предположения нами были выполнены клинические исследования, в ходе которых на фоне изолированного поражения печени параллельно с комплексной оценкой характера и степени повреждения паренхимы печени изучали показатели антиокислительной активности (АОА) и ПОЛ и особенности их соотношений.

Уровень ПОЛ оценивали по изменению содержания конъюгированных диенов [11] в модификациях В. Ю. Куликова и Л. И. Колесниковой [9]. АОА определяли по задержке термического окисления метилолеата в присутствии экстрагированных липидов по методу Е. Б. Бурлаковой [1] в модификации Л. И. Колесниковой [8]. Измерение ПОЛ и АОА проводили в мембранах эритроцитов обследуемых пациентов. Общее количество липидов в эритроцитарных мембранах определяли по методу Фолча [16].

Клинический диагноз с определением степени функциональной недостаточности печени и активности патологического процесса устанавливали на основании клинических данных и комплекса биохимических, рентгенологических и морфологических исследований. Всем пациентам производили диагностическую пункционную биопсию печени.

Были обследованы 91 человек: 20 практически здоровых доноров, 7 больных синдромом Жильбера, 15 — хроническим персистирующим гепатитом, 18 — хроническим активным гепатитом, 31 — макро- и микронодулярными циррозами печени.

Было установлено, что показатели защитной системы АОА прогрессивно снижаются по мере нарастания структурно-функциональных изменений в печени (табл. 1), и, если у здоровых

Таблица 1

Изменение показателей АОА и ПОЛ у больных с различной выраженностью поражения печени

Диагноз	Кол-во обследованных	АОА, ч/г/мл	ПОЛ, усл. ед.
Здоровые	20	235,1 ± 18,1	0,042 ± 0,009
Синдром Жильбера	7	183,0 ± 17,6*	0,110 ± 0,022*
Хронический персистирующий гепатит	15	184,0 ± 11,8*	0,104 ± 0,010*
Хронический активный гепатит	18	99,1 ± 10,2*	0,198 ± 0,023*
Цирроз (макро- и микронодулярный)	31	81,0 ± 9,0*	0,204 ± 0,017*

* Показатели достоверно отличаются от таковых у здоровых людей

они составляют $235,1 \pm 18,1$ ч/г/мл, у больных синдромом Жильбера и хроническим персистирующим гепатитом — $183,0 \pm 17,6$ и $184,0 \pm 11,8$ ч/г/мл, то у больных хроническим активным гепатитом и циррозами печени они резко понижаются до $99,1 \pm 10,2$ и $81,0 \pm 9,01$ ч/г/мл соответственно. По-видимому, это связано с тем, что функциональные и морфологические нарушения при хроническом персистирующем гепатите и синдроме Жильбера выражены незначительно, что, в свою очередь, определяет большую сохранность резервов эндогенных антиоксидантов в печени при этих формах поражений органа. В то же время было установлено, что показатели активности ПОЛ повышаются параллельно со снижением показателей АОА липидов. Так, если у здоровых значения ПОЛ составляли $0,042 \pm 0,009$ усл. ед., у больных синдромом Жильбера и хроническим активным гепатитом — $0,110 \pm 0,022$ и $0,104 \pm 0,018$ усл. ед., то у больных хроническим активным гепатитом и циррозами печени они возрастали до $0,198 \pm 0,023$ и $0,204 \pm 0,017$ усл. ед., превышая показатели здоровых людей в 4—5 раз. Данное обстоятельство следует подчеркнуть в связи с тем, что накопление продуктов цепных свободнорадикальных реакций на фоне сниженного уровня защитных тканевых антиоксидантов может привести к срыву компенсаторно-приспособительных процессов печени, дальнейшему истощению резервов антиоксидантов и формированию «порочного круга» патологических изменений в мембранных структурах клеток.

Таким образом, при поражениях печени возрастает активность процессов ПОЛ и снижаются показатели АОА липидов. Показатели АОА липидов снижаются, а показатели ПОЛ повышаются тем больше, чем больше распространены структурные и функциональные повреждения печени.

По-видимому, активация процессов ПОЛ на фоне снижения АОА липидов может играть определенную патогенетическую роль при развитии хронических поражений печени.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Алексеенко А. В., Бурлакова Е. Б., Дзюба Н. М. и др. Содержание некоторых биохимических и гематологических характеристик при лучевой болезни и при действии алкилирующих агентов на примере ТноТЭФА. — Радиобиология, 1966, т. 6, № 5, с. 718—723.
2. Блогер А. Ф., Майоре А. Я. Исследование основных патогенетических линий поражения клеток печени в условиях клинической и экспериментальной патологии и подходы к регуляции и купированию этих процессов. — В кн.: Успехи гепатологии, Рига, 1982, вып. 10, с. 10—34.
3. Биоантиоксиданты в лучевом поражении и злокачественном росте / Бурлакова Е. Б., Алексеенко А. В., Молочкина Е. М., Пальмина Н. П., Храпова Н. Г. М., 1975. 211 с.
4. Владимирюв Ю. А., Арчаков А. И. Перекисное окисление липидов в биологических мембранах. М., 1972. 252 с.

5. Воскресенский О. Н., Жутаев И. А., Бобырев В. И., Безуглый Ю. В. Антиоксидантная система, онтогенез и старение (обзор). — *Вопр. мед. химии*, 1982, т. 28, № 1, с. 14—27.
6. Журавлев А. И. Биоантиокислители в животном организме. — В кн.: *Биоантиокислители*. М., 1975, с. 15—29.
7. Козлов Ю. П. Структурно-функциональные аспекты перекисного окисления липидов в биологических мембранах. — В кн.: *Липиды. Структура, биосинтез, превращение и функции*. М., 1977, с. 80—93.
8. Колесникова Л. И. Реакции свободнорадикального окисления липидов у человека при различных патологических процессах и при адаптации в ряде регионов Крайнего Севера. Автореф. дис. ... канд. мед. наук. Новосибирск, 1977. 22 с.
9. Куликов Ю. В., Колесникова Л. И. Применение комплекса физико-химических методов регистрации реакций перекисного окисления липидов в эритроцитарных мембранах человека. — В кн.: *Материалы Всесоюзного симпозиума «Физико-химические основы функционирования надмолекулярных структур клетки»*. М., 1974, ч. 2, с. 5—7.
10. Мак-Мюррей У. Обмен веществ у человека. Пер. с англ. М., 1980. 368 с.
11. Плацер З., Видлакова М., Кужела Л. Процессы перекисного окисления липидов при повреждении и ожирении печени. — *Чехословац. мед. обозрение*, 1970, т. 16, № 1, с. 30—41.
12. Романенко В. Д. Печень и регуляция межуточного обмена: млекопитающие и рыбы. Киев, 1978. 183 с.
13. Россельс А. Н. Фосфолипидные модели клеточных мембран. — В кн.: *Структура и функция биологических мембран*. М., 1971, с. 53—74.
14. Спиричев В. Б. Процессы перекисного окисления и роль алиментарных факторов в его регуляции. — *Вопр. питания*, 1974, № 3, с. 9—19.
15. Терехова С. Ф., Алексеенко А. В., Бурлакова Е. Б. О роли холестерина в системе антиоксидантов клетки. — В кн.: *IV Международный биофизический конгресс. Тез. докл. Секции 9—15*. М., 1972, с. 74.
16. Folch J., Less M. A simple method for the isolation and purification of total lipides from animal tissues. — *J. Biol. Chem.*, 1957, vol. 226, p. 40.

УДК 577.125.33:615.836

*Н. И. Гольдштейн, Т. Л. Жемчугова, Л. И. Шинкаренко,
А. А. Сондоре*

Рижский медицинский институт

ИЗМЕНЕНИЯ ПРОЦЕССА ПЕРЕКИСНОГО ОКИСЛЕНИЯ В УСЛОВИЯХ ДЕЙСТВИЯ ГИПЕРБАРИЧЕСКОЙ ОКСИГЕНАЦИИ

В последние годы в различные области клинической медицины с успехом внедряется терапия повышенным давлением кислорода — гипербарическая оксигенация (ГБО) [7]. С клинической точки зрения, можно выделить три основных аспекта влияния кислорода на организм — биологический, фармакологический и токсический [3]. Под биологическим действием ГБО понимается устранение гипоксического состояния и достижение в тканях нормальной физиологической концентрации кислорода. Фармакологический эффект заключается в ингибирующем или стимулирующем влиянии кислорода под повышенным давлением на функционирование органов и систем организма. В то же время кислород обладает универсальной токсичностью в отношении клеток и тканей, обусловленной его высокой окислительной способностью, поэтому существование живых организмов в содержащей кислород атмосфере возможно только благодаря выработанным в ходе эволюции и хорошо отлаженным системам защиты [1, 14].

В целом ряде исследований [5, 10, 12] было показано, что одним из патогенетических звеньев кислородной интоксикации является активация процессов свободнорадикального перекисного окисления липидов (ПОЛ) биологических мембран. На развитие этого процесса оказывают влияние самые разнообразные факторы, такие, как перепад парциального давления кислорода в системе легкие—кровь—ткань, индивидуальные особенности защитных антиокислительных систем, реактивное состояние организма. Оценка этих факторов весьма существенна в клиническом применении ГБО. В этой связи нам представлялось интересным исследовать динамику изменения интенсивности процессов ПОЛ в крови людей при прохождении курса ГБО относительно ее информативности о состоянии защитных систем

организма и возможного риска кислородной интоксикации. Данная задача и сопоставление клинических результатов с модельными исследованиями возможных механизмов активации и нарушения работы защитных систем и явилась целью нашей работы.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДИКА ИССЛЕДОВАНИЯ

Кровь на исследование брали натошак из локтевой вены больных, проходивших курс ГБО в комплексной терапии неврита слухового нерва. Предполагалось, что у этих больных не должно быть выраженных изменений уровня пероксидации в крови при развитии данной патологии. Эритроциты выделяли центрифугированием при 3000 g в течение 15 мин. Концентрацию малонового диальдегида (МДА) определяли в реакции с тиобарбитуровой кислотой по методике, описанной в [9].

Для модельных исследований использовали яичный желток, суспендированный в 1 M фосфатном буфере в разведении 1:5. Содержание гидроперекисей определяли по наличию диеновых конъюгатов [8] и по интенсивности быстрой вспышки хемилюминесценции, индуцированной ионами двухвалентного железа. Хемилюминесцентный тест проводили по обычной методике [2]. Конечная концентрация железа в кювете составляла $2,5 \cdot 10^{-4}$ M.

Концентрацию МДА и диеновых конъюгатов рассчитывали на 1 мг белка. Содержание белка в пробах определяли по Лоури [6]. Результаты обрабатывали методами вариационной статистики.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Изменения интенсивности процессов ПОЛ в мембранах эритроцитов крови людей при прохождении курса ГБО, оцениваемые по изменению концентрации МДА, представлены в табл. 1, откуда видно, что интенсивность процессов ПОЛ в мембранах эритроцитов имеет резкие индивидуальные различия как в исходном состоянии, так и в ходе проведения курса ГБО.

Дополнительную информацию об изменениях устойчивости мембран эритроцитов к ПОЛ дает рис. 1. Как видно из рис. 1, существует пропорциональная зависимость между концентрацией МДА до и после сеанса ГБО, и интенсивность процессов ПОЛ после воздействия ГБО зависит от уровня ПОЛ до воздействия, а также, по-видимому, от способности организма противостоять активации ПОЛ. Тангенс угла наклона прямолинейного участка полученной кривой можно использовать как условный показатель антиокислительной способности организма. Резкая активация интенсивности ПОЛ после 1 сеанса ГБО и, соответственно, большой тангенс угла наклона могут свидетель-

Таблица 1

Содержание МДА (мкМ/мг белка) в эритроцитах периферической крови больных в процессе ГБО-терапии

Больные	I сеанс		V сеанс		X сеанс	
	до	после	до	после	до	после
П-я	0,029	0,031	0,014	0,019	—	—
С.	0,019	0,024	0,048	0,034	0,049	0,059
Г.	0,060	0,170	0,054	0,038	0,012	0,016
Р.	0,068	0,250	0,066	0,068	0,036	0,072
О.	0,017	0,038	0,032	0,040	—	—
П.	0,032	0,057	0,192	0,275	0,036	0,064
Среднее содержание МДА до сеанса	0,038 ± 0,019		0,068 ± 0,063		0,033 ± 0,015	

ствовать о неадаптированности организма к гипероксической среде и повреждающему действию гипербарического кислорода.

Можно предположить, что в ходе курса ГБО происходит активация антиокислительных систем организма, что в наших наблюдениях выражается в уменьшении к V сеансу ГБО тангенса угла. Дальнейшие события могут быть объяснены истощением защитных антиокислительных систем организма и раз-

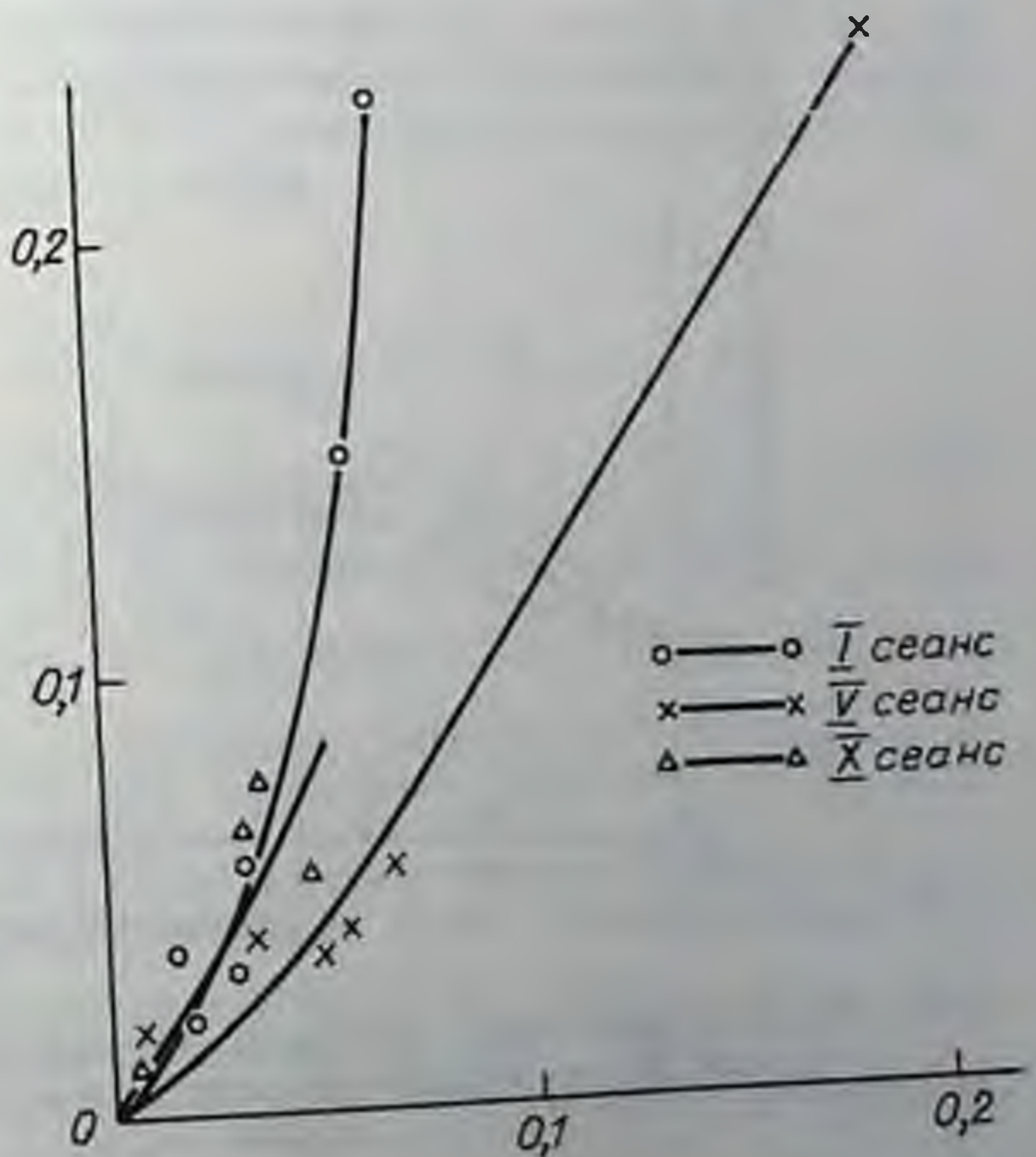


Рис. 1. Перекисное окисление липидов в эритроцитах периферической крови больных, проходивших ГБО-терапию.

Концентрация МДА, мкМ/мг белка, до сеанса ГБО — на оси ординат, после сеанса ГБО — на оси абсцисс.

витием реакций ПОЛ. Это проявляется в последующем увеличении тангенса угла наклона. Интересно отметить, что динамика изменений интенсивности процессов ПОЛ в ходе курса ГБО носит несколько иной характер. Так, средняя концентрация МДА, определяемая до сеансов ГБО, растет к V сеансу и практически возвращается к исходной к X сеансу.

Таким образом, наши исследования показали, что выражение концентрации МДА после проведения сеанса как функции исходного (до сеанса) состояния мембран эритроцитов позволяет оценить возможную активацию ПОЛ в ходе ГБО-терапии. Выявленную динамику изменений ПОЛ можно объяснить следующим образом. Организм человека в норме, по-видимому, не адаптирован к действию гипероксии, что приводит к выраженной интенсификации перекисного процесса после I сеанса ГБО. Повторное действие терапевтических доз ГБО снижает уровень ПОЛ, очевидно, в результате активации антиокислительных систем организма. В то же время многократное воздействие даже терапевтических доз ГБО ослабляет защитные системы, способствуя развитию окислительных процессов и нарастающей кислородной интоксикации организма. Для изучения процессов активации ПОЛ при действии ГБО *in vitro* мы использовали раствор куриного желтка в фосфатном буфере. По липидному

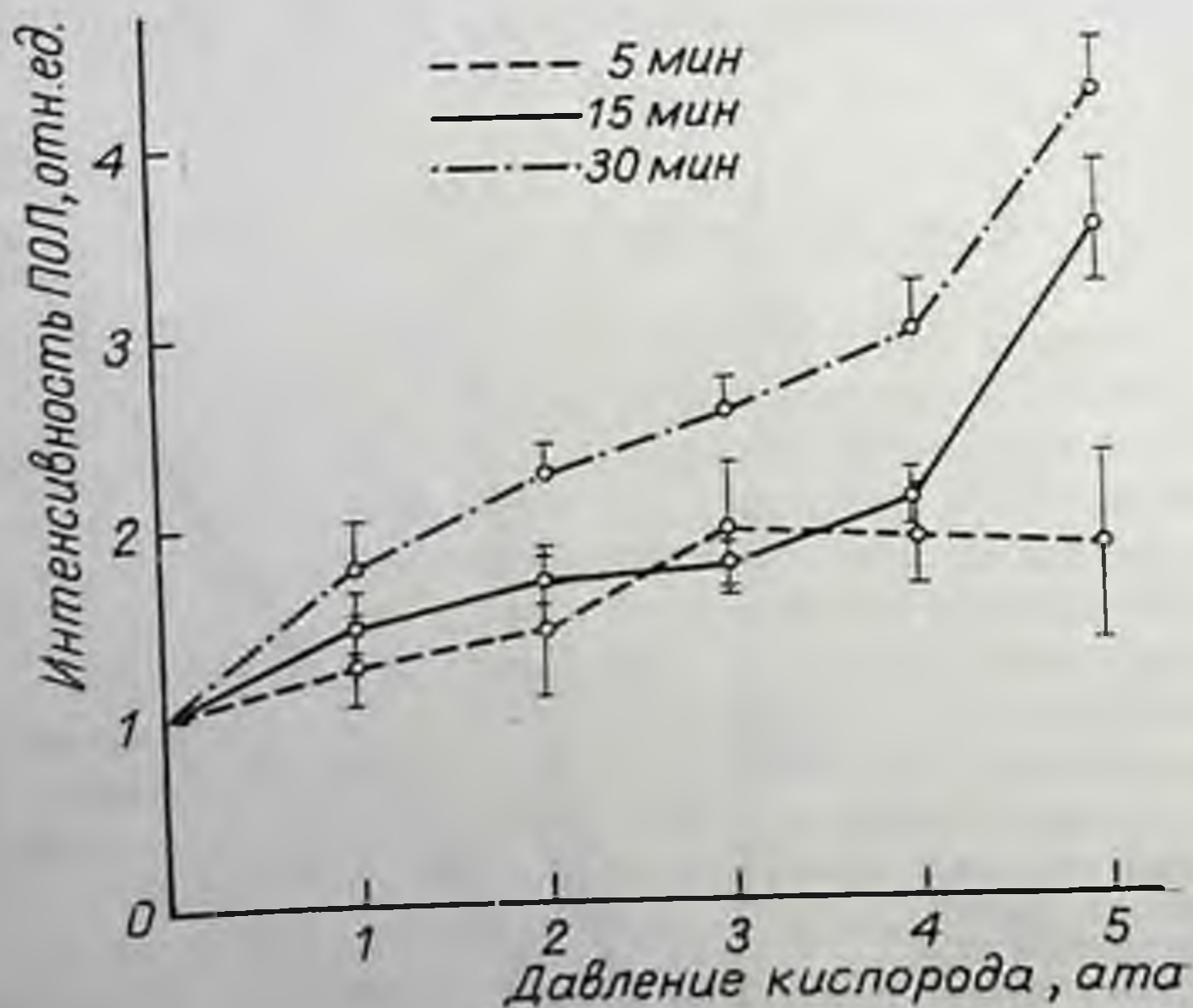


Рис. 2. Перекисное окисление липидов (ПОЛ) яичного желтка после экспозиции повышенным давлением кислорода.

составу и по содержанию основных природных антиоксидантов эта система качественно близка к гомогенату ткани.

Изменения интенсивности процессов ПОЛ при различных режимах ГБО представлены на рис. 2. Как видно из рис. 2, наблюдается дозовая зависимость интенсивности ПОЛ от давления и длительности сатурации ткани гипербарическим кислородом, что соответствует известным литературным данным [11, 15]. Следует подчеркнуть, что отсутствие характерных для целостного организма фаз в подавлении и активации интенсивности перекисного процесса свидетельствует о сложности механизмов регуляции этих реакций на организменном уровне. Тем не менее характер активации ПОЛ в модельной системе показывает, что именно истощение антиокислительных систем может оказаться ответственным за увеличение уровня пероксидации при токсическом действии гипербарического кислорода. Поэтому представления о механизмах регуляции антиокислительных систем в условиях ГБО, по нашему мнению, могут быть положены в основу понимания токсического действия кислорода на организм человека. Вероятными механизмами этого процесса можно считать изменение фосфолипидного состава мембран, направленное в сторону повышения содержания более насыщенных соединений [1], изменение количества и качества компонентов защитных систем (каталазы [4], супероксиддисмутазы [13], глутатионредуктазы), а также повышение содержания эндогенных неферментативных антиокислителей.

Глубокое экспериментальное и теоретическое изучение этих процессов позволит разработать конкретные рекомендации по отбору больных для ГБО-терапии, выбору параметров воздействия и, в конечном счете, будет способствовать повышению эффективности данного метода лечения.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Бурлакова Е. Б., Алесенко А. В., Молочкина Е. Л. Биоантиокислители в лучевом поражении и злокачественном росте. М., 1975. 213 с.
2. Владимиров Ю. А., Арчаков А. И. Перекисное окисление липидов в биологических мембранах. М., 1972. 252 с.
3. Гипербарическая оксигенация. Под ред. проф. Г. Л. Ратнера. Куйбышев, 1979. 159 с.
4. Ефунн С. Н., Михайлов Ю. Е. Активность пероксидазы и каталазы в условиях применения кислорода под повышенным давлением. — Эксперим. хирургия и анестезиология, 1970, вып. 3, с. 63—65.
5. Кричевская А. А., Лукаш А. И. Биохимические аспекты токсического действия кислорода на организм животного. — В кн.: Гипербарическая оксигенация. М., 1977, с. 86—87.
6. Покровский А. А. Определение общего белка по Лоурн. — В кн.: Биохимические методы исследования в клинике. М., 1969. с. 62.
7. Петровский Б. В., Ефунн С. Н. Основы гипербарической оксигенации. М., 1976. 344 с.

8. *Стальная И. Д.* Методы определения диеновой конъюгации ненасыщенных жирных кислот. — В кн.: Современные методы в биохимии. М., 1977, с. 63—64.
9. *Asakava T.* Coloring condition of tiobarbituric acid test for detecting lipid hydroperoxides. — *Lipids*, 1980, vol. 15, N 3, p. 137—140.
10. *Becker N. H., Galvin G. F.* Effect of oxygen-rich atmosphere on lipid peroxidation. — *Aerospace Med.*, 1962, vol. 33, p. 985—987.
11. *Dirks R. C., Faiman M. D.* Free radicals formation and lipid peroxidation in rat and mouse cerebral cortex exposed to high oxygen pressure. — *Brain Research*, 1982, vol. 248, p. 355—360.
12. *Gershman R., Gilbert D. L., Ney S. W.* Oxygen poisoning and x-irradiation: a mechanism in common. — *Science*, 1954, vol. 119, p. 623—626.
13. *Gregory E. M., Fridovich I.* Induction of superoxid-dismutase by molecular oxygen. — *J. Bacteriol.*, 1973, vol. 114, p. 543—548.
14. *Haugard N.* Mechanism of oxygen toxicity. — *Physiol. Rev.*, 1968, vol. 48, N 2, p. 312—362.
15. *Jerret S. A., Jefferson D.* Seizures, H₂O₂ formation and lipid peroxidation in brain during exposure to oxygen at high pressure. — *Aerospace Med.*, 1973, vol. 44, p. 40—44.

И. В. Скардс, Е. П. Райпулис

Институт микробиологии им. А. Кирхенштейна АН ЛатвССР

ОТНОСИТЕЛЬНАЯ КОНЦЕНТРАЦИЯ МИЕЛОПЕРОКСИДАЗЫ В ЛЕЙКОЦИТАХ И ИХ ОСМОТИЧЕСКАЯ УСТОЙЧИВОСТЬ

Миелопероксидаза (МПО) является характерным ферментом полиморфонуклеарных лейкоцитов и играет важную роль в защитных функциях организма. МПО, H_2O_2 и халид (МПО— H_2O_2 —С) образуют антимикробную систему, которая эффективно убивает бактерии, грибы, вирусы и клетки млекопитающих [1, 6]. Так как МПО в общем белковом пуле лейкоцитов составляет значительную величину (5% от сухой массы клетки) [9], ее можно получить в анализируемых количествах из небольшого объема крови. Изучение МПО представляет интерес и с той точки зрения, что снижение активности МПО в лейкоцитах является причиной некоторых заболеваний, а также может свидетельствовать о патологических изменениях в организме. Сниженная активность МПО в полиморфонуклеарных лейкоцитах является причиной повышения чувствительности организма к бактериальным заболеваниям [5, 7]. При хроническом миелолейкозе в нейтрофилах людей найдена МПО с измененной структурой молекулы [2].

МПО локализована в азурофильных гранулах полиморфонуклеарных лейкоцитах и попадает в фаголизосомы при фагоцитозе [4].

МПО играет важную роль в активации лейкоцитов [3], что выражается в изменении мембранных свойств клеток. Известно [4], что в неактивных лейкоцитах многие ингредиенты, в том числе и МПО, не удается восстановить обычным способом (дитионитом), что, очевидно, зависит от свойств мембраны.

Для изучения МПО применяется ряд методов, каждый из которых имеет определенные недостатки.

Нами разработан метод приготовления лейкоцитарного материала и определения МПО как показателя активности лейкоцитов.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДИКА ИССЛЕДОВАНИЯ

Приготовление лейкоцитарного материала. При разработке метода определения количества МПО в качестве материала использовали цельную кровь крупного рогатого скота и доноров, к которой добавляли антикоагулянт — гепарин в количестве 10—15 ед./мл. Кровь центрифугировали при 1200 об./мин (диаметр центрифуги 30 см) в течение 20 мин, после чего отсасывали плазму, которую в дальнейших исследованиях не использовали. Для опыта брали слой над эритроцитами, содержащий лейкоцитарные клетки и примесь эритроцитов. Слой лейкоцитов переносили в кювету, которую удлиняли резиновой трубкой. Такое увеличение объема было необходимо для лизирования оставшихся эритроцитов. Чтобы разрушить эритроциты, объем воды приблизительно в 5 раз должен превышать объем клеток. При наличии длинных кювет (например, кювет, входящих в комплект СФ-14) нет необходимости увеличивать объем кюветы, потому что для просвечивания в современных оптических приборах достаточно тонкого слоя (около 5—7 мл) в нижней части кюветы, который остается после лизирования эритроцитов и стасывания супернатанта. Полный лизис эритроцитов происходит в течение нескольких секунд, но в целях предотвращения потери лейкоцитов кювета декантируется только по истечении срока, необходимого для слипания лейкоцитов. Этот срок варьирует от нескольких десятков секунд до нескольких минут, в зависимости от степени активации лейкоцитов. В течение данного срока лейкоциты образуют слегка мутный сгусток, который прилипает к стенкам кюветы. При образовании такого сгустка объем лейкоцитарной массы увеличивается за счет набухания клеток.

Спектрофотометрирование лейкоцитарного материала. Во избежание потери света из-за рассеивания при просмотре мутного материала кювету помещали в оптический аппарат, по возможности ближе к фоточувствительному элементу. В нашем опыте кювету помещали в спектрофотометр «Спекорд UVVIS» в дополнительные гнезда около фотоумножителя. При использовании такого чувствительного прибора нет необходимости пользоваться материалом, занимающим всю толщину кюветы (1 см). Это пространство можно сокращать, помещая в кювету кварцевые пластинки. Мы пользовались пластинками от стенок старых кювет. Пластинки отшлифовывали так, чтобы они соответствовали внутренней ширине кюветы. Помещение одной пластинки в нашем случае сокращало толщину кюветы до 8 мм, 2 пластинок — до 6 мм, 3 — до 4 мм, 4 — до 2 мм. Толщина материала, равная 2 мм, достаточна для записи спектра в развернутом диапазоне 80—100% трансмиссии. Таким образом, данный метод

позволяет уменьшить количество лейкоцитов в исследуемой пробе. Для компенсации мутности сгустка в другом пучке света исмецали кварцевые кюветы с матовой стороной к пучку света. Правильный подбор матовой кюветы дал возможность получить прямую базисную линию, которая облегчает сравнение отдельных пиков в спектре. Концентрацию МПО подсчитывали по величине пика при 430 нм с коэффициентом экстинкции $91 \text{ мМ}^{-1} \text{ см}$ [8]. Величина отношения $E_{430 \text{ нм}}/E_{280 \text{ нм}}$ составляет 0,7. Осмотическая устойчивость лейкоцитов установлена по соотношению E_{260} в седименте и E_{260} в супернатанте.

Обработка материала KCN. На следующем этапе исследования материал разделяли на две части. К одной части материала добавляли 0,1 мл KCN. В спектрофотометре регистрировался спектр обработанного материала и дифференциальный спектр между материалом, обработанным и не обработанным KCN.

Определение количества белка. Количество белка в изучаемом материале оценивали по разнице экстинкции 235—280 нм [11]. Разница $E_{235} - E_{280}$, равная 0,854, соответствует в среднем 1 мг/мл белка в материале. Необходимо отметить, что в некоторых случаях для определения количества белка нужно уменьшить толщину просвечиваемого слоя лейкоцитов.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

В спектрофотометрической записи лейкоцитарного материала выявляется несколько пиков поглощения. Пики при 430 и 573 нм свидетельствуют о присутствии в препарате окисленной формы МПО. Пик при 415 нм отражает концентрацию гемпротеинов в клетках. О чистоте препаратов от остатка эритроцитов свидетельствует отсутствие пика при 514 нм.

В качестве показателя количества МПО в данном эксперименте можно было использовать соотношение E_{430}/E_{415} , свидетельствующее об отношении МПО к ингредиентам, обладающим абсорбцией в диапазоне соре. Таким же показателем служило отношение экстинкции 573 нм к 415 нм. Описанным в литературе способом [11] была определена концентрация белков в препарате. Вычисляя количество МПО по величине экстинкции, можно определить количество МПО по отношению к белкам в препарате. Таким образом, в лейкоцитарном препарате можно спектрофотометрическим методом определить уровень МПО. В супернатанте лейкоцитов МПО не была выявлена (рис. 1).

При сопоставлении количества МПО с осмотической устойчивостью лейкоцитов видно, что с увеличением количества МПО лейкоцитов снижается их осмотическая устойчивость, и на-

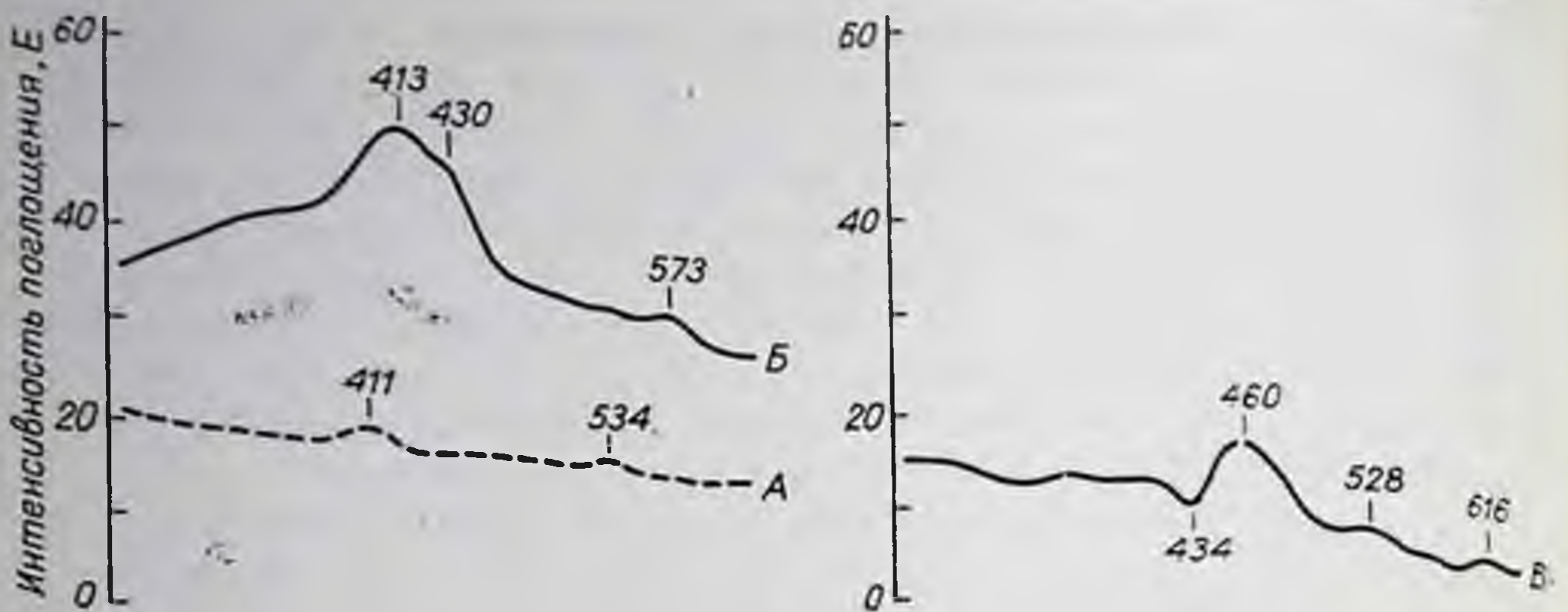


Рис. 1. Спектрофотограмма лейкоцитарного материала $\times 10^{-3}$.

А — супернатант, 1 мл лейкоцитов в 4 мл воды, толщина кюветы 1 см; Б — осадок лейкоцитов, полученный после отсасывания супернатанта с добавлением 2 мл воды и гомогенизированный механическим способом; абсорбция в диапазоне 408—470 нм, отражающая абсорбцию цитохромов и МПО; В — материал (как для Б) разделен на 2 части, к одной из которых добавлено 0,05 мг/мл KCN. Максимум поглощения при 454 и 616 нм соответствует комплексу шанида с МПО, минимум поглощения при 430 и 572 нм — окисленной МПО.

оборот — с уменьшением количества МПО повышается осмотическая устойчивость (рис. 2, 3). Таким образом, по относительному количеству МПО можно судить о лабильности мембран лейкоцитов. Так как лабилизация мембран лейкоцитов связана с активацией лейкоцитов, то можно заключить, что активация лейкоцитов связана с увеличением количества МПО.

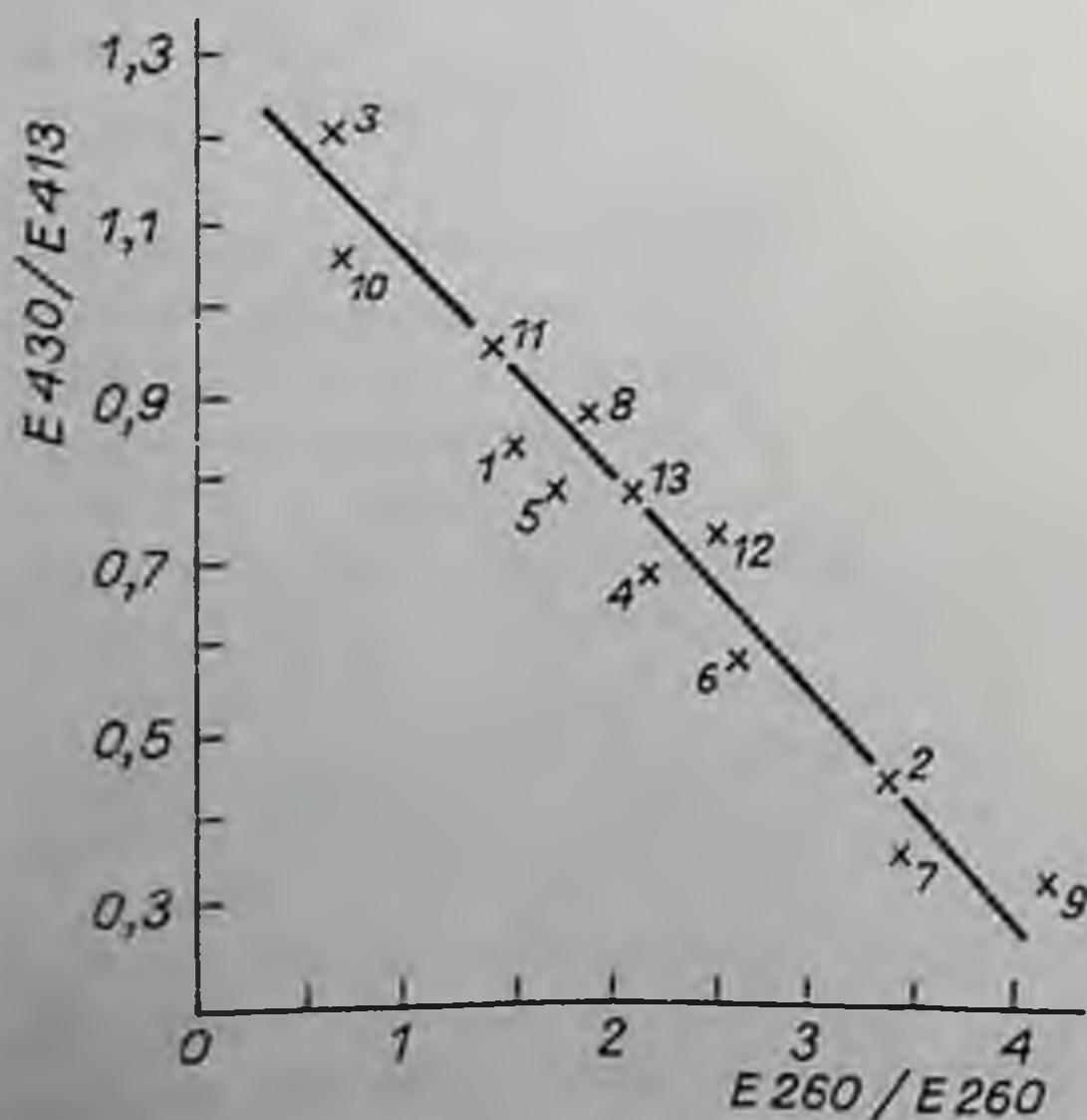
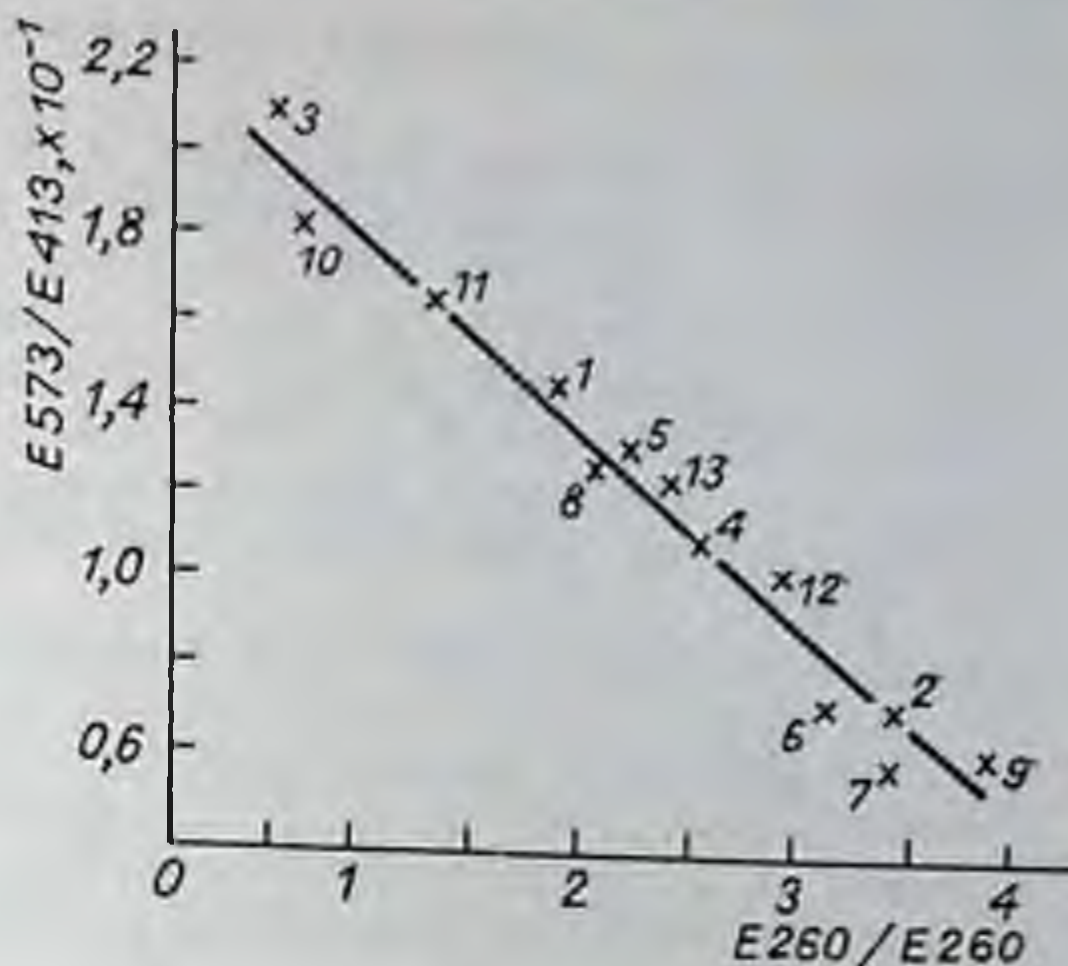


Рис. 2. Соотношение E_{260} в осадке лейкоцитов и E_{260} в супернатанте, свидетельствующее об осмотической резистентности (на оси абсцисс), и E_{430}/E_{413} , свидетельствующее об относительной концентрации Е МПО по отношению к Е цитохромов (на оси ординат).

1—13 — номера проб.

Рис. 3. Соотношение E_{260} в седименте лейкоцитов и E_{260} в супернатанте, свидетельствующее об осмотической резистентности лейкоцитов (на оси абсцисс), и E_{573}/E_{415} , свидетельствующее об относительной концентрации МПО по отношению к Е цитохромов (на оси ординат).

1—13 — номера проб.



Пероксидазы участвуют в пероксидации липидов, что вызывает разрушение клеточных мембран [10].

Возможно, что повышение активности МПО является одной из причин лабильности мембран лейкоцитов.

Влияние КСН на спектрограмму МПО. КСН, добавленный к препарату лейкоцитов, связывается с МПО, и максимум абсорбции перемещается на 450 нм. Дифференциальный спектр между материалом с КСН и необработанным материалом изображается в виде зубцеобразной кривой. Первый острый изгиб образуется при 470 нм, второй — при 454 нм. Меньший по размеру зубец находится в диапазоне 570—600 нм. Добавленный к лейкоцитарному материалу КСН вызывает характерные изменения в спектре поглощения МПО, что также может быть использовано для определения МПО.

Предложенный нами метод приготовления лейкоцитарного материала и определения количества МПО отличается от упомянутых другими исследователями [2, 8, 9] тем, что отпадает сложная процедура выделения неповрежденных лейкоцитов, гарантируется чистота препарата от примесей эритроцитов, нет необходимости активации лейкоцитов цитохалазином В и отпадает необходимость использования в качестве субстрата канцерогенного вещества 3,3'-диметоксибензидина.

Таким образом, относительную концентрацию МПО можно наблюдать в окисленном состоянии при определении соотношения E_{573} (максимум абсорбции в α -диапазоне) и E_{415} (абсорбция цитохрома С). Установлено, что лейкоциты с большей относительной концентрацией МПО обладают меньшей осмотической устойчивостью.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Albrich J. M., McCarthy C. A., Hurst J. K.* Biological reactivity of hypochlorous acid. Implications for microbicidal mechanisms of leukocyte myeloperoxidase. — *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, 1981, vol. 78, N 1, p. 210—214.
2. *Atkin C. L., Andersen M. R., Eyre H. J.* Abnormal neutrophil myeloperoxidase for a patient with chronic myelocytic leukemia. — *Arch. Biochem. Biophys.*, 1982, vol. 214, N 1, p. 284—292.
3. *Dahlgren C., Stendahl O.* Role of myeloperoxidase in luminal-dependent chemiluminescence of polymorphonuclear leukocytes. — *Infection a. Immunol.*, 1983, vol. 39, N 2, p. 736—741.
4. *Kinkade J. M., jun., Pember S. O., Bornes K. C. et al.* Differential distribution of distinct forms of myeloperoxidase in different azurophylic granulas subpopulations from human neutrophils. — *Biochem. Biophys. Research Communications*, 1983, vol. 114, N 1, p. 29—33.
5. *Klebanoff S. J.* Myeloperoxidase: contribution to the microbicidal activity of intact leukocytes. — *Science*, 1970, vol. 169, N 3950, p. 1095—1097.
6. *Klebanoff S. J., Rosen H.* The role of myeloperoxidase in the microbicidal activity of polymorphonuclear leukocytes. — In: *Oxygenfree radicals and tissue damage. Symp.*, London, 1978. Amsterdam, 1979, p. 263—277.
7. *Lahrer R. I., Hanifin J., Cline M. J.* Defective bactericidal activity in myeloperoxidase-deficient human neutrophils. — *Nature*, 1969, vol. 223, N 5201, p. 78—79.
8. *Odajima T.* Myeloperoxidase of the leukocyte of normal blood. 2. The oxidation reduction mechanism of the myeloperoxidase system. — *Biochim. Biophys. Acta*, 1971, vol. 235, N 1, p. 52—60.
9. *Suzuki K., Ota H., Sasagawa S. et al.* Assay method for myeloperoxidase in human polymorphonuclear leukocytes. — *Anal. Biochem.*, 1983, vol. 132, N 2, p. 345—352.
10. *Tappel A. L.* Lipid peroxidation damage to cell components. — *Fed. Proc.*, 1973, vol. 32, N 8, p. 1890—1894.
11. *Whitaker J. R., Granum P. E.* An absolute method for protein determination based on difference in absorbance at 234 and 280 nm. — *Anal. Biochem.*, 1980, vol. 109, N 1, p. 156—159.

И. В. Скардс, Е. П. Райпулис

Институт микробиологии им. А. Кирхенштейна АН ЛатвССР

СНИЖЕНИЕ СУПЕРОКСИДДИСМУТАЗНОЙ АКТИВНОСТИ ЛЕЙКОЦИТОВ В РЕЗУЛЬТАТЕ ЛАБИЛИЗАЦИИ МЕМБРАН ПРИ ИХ КУЛЬТИВИРОВАНИИ

Получение долгосрочной культуры лейкоцитов связано с большими трудностями, так как лейкоциты быстро разрушаются. Разрушение начинается с лабильности клеточных мембран и выхода в окружающую среду ингредиентов клеток и кончается полным распадом клеток. Многие клеточные функции в большой степени зависят от состояния клеточных мембран [1]. К клеточным функциям можно отнести также и продуцирование интеграционных вирусов. Лейкоциты крупного рогатого скота (КРС), больного хроническим лимфолейкозом (ХЛЛ), слабо продуцируют вирус бычьего лейкоза (БЛВ) [2]. При культивировании лейкоцитарного материала интенсивность выхода вируса увеличивается и своего максимума достигает перед распадом клеток. Существует определенная связь между лабильностью клеточных мембран и интенсивностью выделения вируса клетками. Обычно о лабильности клеточных мембран судят по выходу лактатдегидрогеназы (ЛДГ) из клеток [9]. Известно [8], что пропорционально снижению активности супероксиддисмутазы (СОД) снижается чувствительность клеток к интерферону. Очевидно, такую закономерность определяет тесное сцепление гена СОД и гена чувствительности к интерферону [6]. Нас интересовала закономерность снижения внутриклеточной активности СОД и каталазы посредством выхода этих ингредиентов из клеток в результате лабильности клеточных мембран.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДИКА ИССЛЕДОВАНИЯ

Лейкоциты были получены из крови КРС (3 животных) с помощью лизации эритроцитов осмотическим шоком. В полученном от коров, больных ХЛЛ, лейкоцитарном материале основ-

ную массу клеток (до 80%) составили лимфоциты, но мы смесь клеток белой крови будем называть лейкоцитами. Выделенные лейкоциты помещали в среду, состоящую из 50% среды Игла, 30—40% 0,5%-ного лактальбумина и 20% бычьей сыворотки [2]. После выделения лейкоцитов из крови и после их 24-часового культивирования была исследована проницаемость клеточной мембраны лейкоцитов, для чего изучали активность ЛДГ, СОД и каталазы. В этих целях был использован гомогенизированный ультразвуком материал. В гомогенате клеток спектрофотометрически определяли активность ЛДГ набором реагентов фирмы «Фермогност» (ГДР). Каталазную активность оценивали по убыли экстинкции H_2O_2 в ультрафиолетовой зоне спектра в 0,1 М фосфатном буфере при рН 7,2. Активность СОД определяли электрофоретическим разделением и окрашиванием. Электрофорез проводили на 7,5%-ном геле полиакриламида в установке диск-электрофореза при рН 8,3. В качестве индикатора добавляли бромфенол синий. Скорость миграции определенных фракций сравнивали со скоростью миграции этого красителя и обозначали R_f . Окрашивание производили нитротетразолием синим при рН 8,1 [4] или дианизидином при рН 7,5 [7]. В последнем случае гель промывали фосфатным буфером, который содержал 0,5 мг/100 мл рибофлавина и 0,1 мг/мл дианизида. Затем материал подвергали ультрафиолетовому облучению [7]. Разделенный электрофорезом материал также окрашивали для определения каталазной активности, применяя $K_3Fe(CN)_6$ и $FeCl_3$ [12]. Окрашенные гели фотометрировали на аппарате, автоматически регистрирующем экстинкцию в зависимости от длины геля денситометра «Chromoscan-200».

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

При сравнении активности СОД и ЛДГ в лейкоцитах до и после 24-часового культивирования (табл. 1) было установлено, что активность СОД (рис. 1) в лейкоцитах после 24-часового культивирования значительно снижается по сравнению с активностью до культивирования. Снижается также и активность ЛДГ. Снижение активности СОД и ЛДГ связано с выходом этих ферментов из клеток. Характерно, что выход СОД из клеток происходит быстрее и начинается раньше, чем выход ЛДГ. Сильно снижается также и активность каталазы после 24-часового культивирования. В другом исследовании нами было установлено, что одновременно со снижением СОД и каталазной активности (рис. 2) усиливается продуцирование супероксидрадикала [3]. В опытах, проведенных в Институте микробиологии им. Августа Кирхенштейна, при культивировании лейкоцитов в сходных условиях было установлено, что в свежее-

Таблица 1
Активность ЛДГ, каталазы и СОД лейкоцитов до и после культивирования

Энзим	Активность энзимов		
	до инкубации	после инкубации	$\frac{\text{до инкубации}}{\text{после инкубации}}$
ЛДГ. $\frac{E_{340} \text{ НАД.Н}}{E_{230} \text{ протеннов/мин}}$	0,238	0,194	1,23
Каталаза. $\frac{E_{227} \text{H}_2\text{O}_2^*}{E_{230} \text{ протеннов /мин}}$	0,14	0,096	1,56
СОД. $\frac{\text{ед. активности}}{\text{ед. стандарта}}$	$3 \cdot 10^{-4}$	$7 \cdot 10^{-5}$	4,3

* $E_{227} = 0,46$.

выделенных лейкоцитах КРС, больного ХЛЛ, при электронно-микроскопическом исследовании не было обнаружено вирусных частиц. К 12-му часу культивирования появились единичные вирусные частицы. Наибольшее количество вирусных частиц содержалось в 48—72-часовых культурах лейкоцитов. В этот период нейтрофильные элементы в культуре практически разрушались [2].

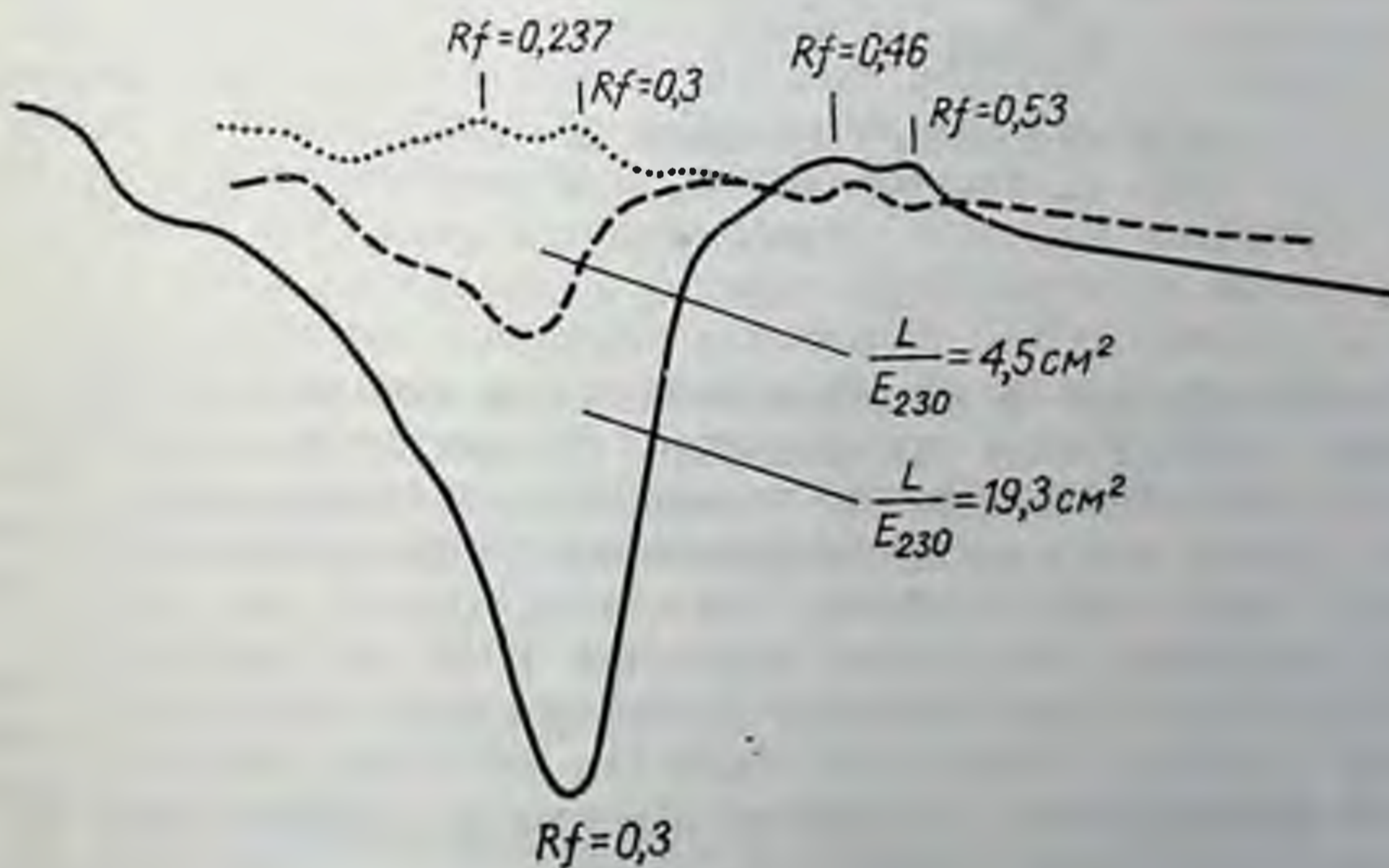


Рис. 1. Денситограмма электрофоретически определенного СОД в лейкоцитах до (—) и после (— — —) инкубирования.

Активность СОД определяли с помощью нитротетразолия синего (—) и дианизида (.....).
 $Rf = 0,3$. $E_{230} = 0,169$.



Рис. 2. Каталазная активность в лейкоцитах до (————) и после (— — —) инкубирования.
Rf=0,156.

Таким образом, в культуре лейкоцитов повышение продуцирования вируса идет параллельно со снижением активности СОД и каталазы в сходных условиях культивирования лейкоцитов. О том, что в процессе культивирования происходит лабильзация клеточных мембран, свидетельствует и то, что в процессе выделения созревших вирионов БЛВ из цитоплазмы в культуральную среду попадает также некоторое количество клеточных структур, физические свойства которых, например константа седиментации и плавучая плотность частиц, мало отличаются от физических свойств БЛВ [5].

На основе данных о снижении активности СОД у вируспродуцирующих культур выдвигается гипотеза, что внутриклеточный интерферон, чувствительность к которому высока в клетках с высокой активностью СОД, в какой-то мере останавливает раз-

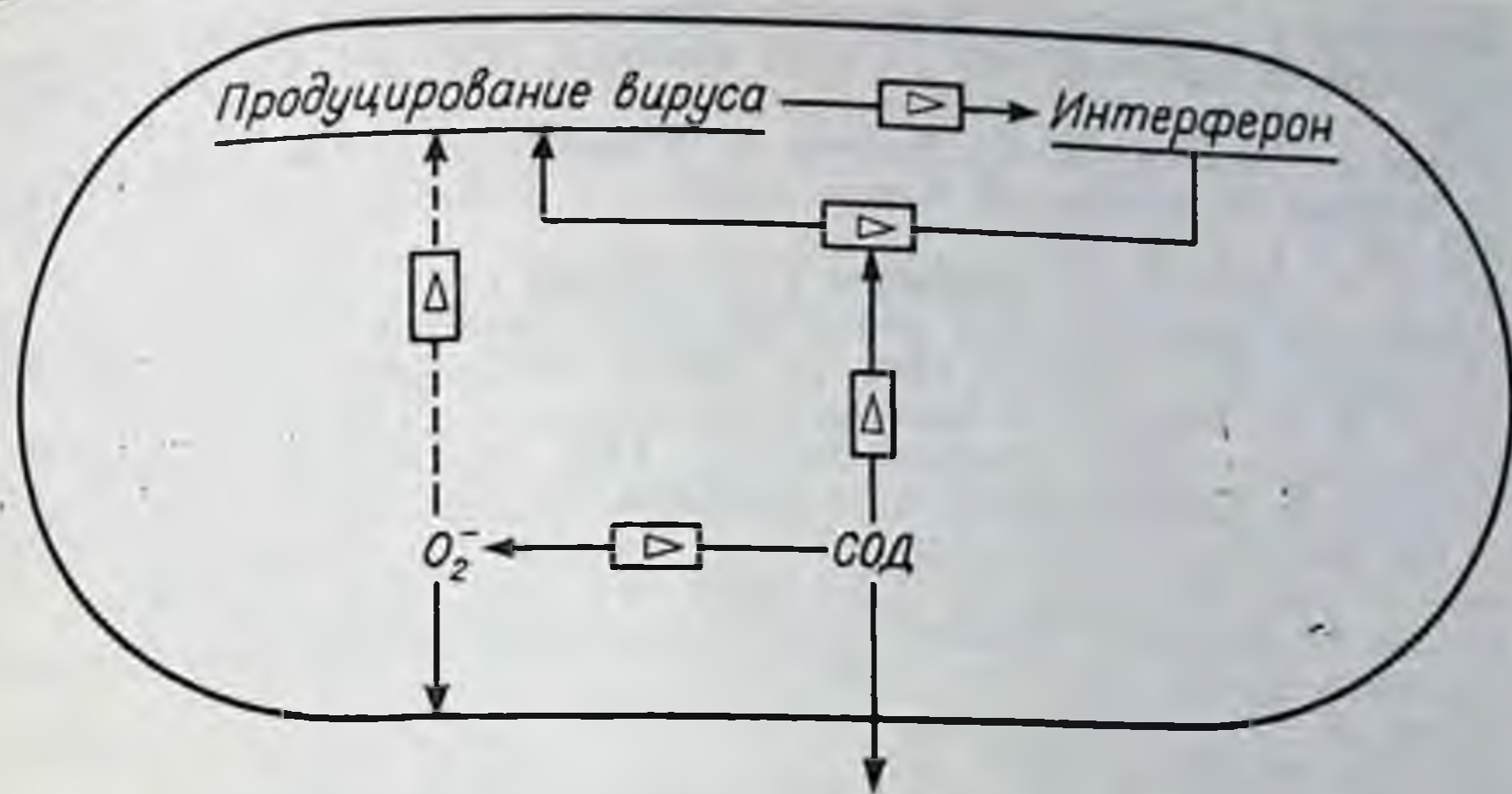


Рис. 3. Схема влияния активности СОД и интерферона на активность продуцирования вируса БЛВ лейкоцитами КРС.

витие клеток в G_0 фазе и, следовательно, снижает образование вируса, и этот механизм обратной связи ограничивает продуцирование БЛВ (рис. 3). В культуре клеток, где уровень активности СОД низкий, исчезает тормоз продуцирования вируса. Низкая активность СОД не снижает повреждающего действия O_2^- , синтез которого усиливается в культуре лейкоцитов. Кроме того, низкая активность каталазы недостаточно интенсивно разрушает пероксид водорода (H_2O_2) · O_2^- , H_2O_2 и продукты их взаимодействия являются активными факторами, которые разрушают митохондрии, что выявляется как снижение дыхательной активности клеток и переокисляет липиды [10, 11]. В результате этих повреждений клетки перед их распадом находятся в таком состоянии, в котором продуцируется вирус.

Таким образом, снижение активности СОД и каталазы и повышение активности продуцирования O_2^- являются теми условиями, которые приводят к разрушению мембранных структур клеток и в определенный момент инкубирования клеток — к интенсивному продуцированию вирусов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Болис Л., Хоффман Д. Ф., Лиф А. Мембраны и болезни. Пер. с англ. М., 1980. 408 с.
2. Вирус лейкоза крупного рогатого скота. Под ред. Р. А. Кукайн, Л. И. Нагаевой. Рига, 1982. 175 с.
3. Скардс И. В., Трусле Э. А., Стурис И. Ю. Сверхслабая хемилюминесценция лейкоцитов коров, больных хроническим лимфолейкозом, под влиянием фитогемагглютина. — В кн.: Онкорнавирусы и неспецифическая резистентность организма. Рига, 1978, с. 34—40.

4. *Bauchamp C., Fridovich I.* Superoxide dismutase. Improved assay and assay applicable to acrilamide gels. — *Anal. Biochem.*, 1972, vol. 44, N 1, p. 276—286.
5. *Calajt J., Hageman P. C., Ressang A.* Structure of C-type virus particles in lymphocyte cultures of bovine origin. — *J. Nat. Cancer Inst.*, 1974, vol. 80, N 1, p. 42—53.
6. *Lin P. F., Slate D. L., Lawryer F. C., Rudlle F. M.* Assignment of the murine interferon sensitivity and cytoplasmic superoxide dismutase gene to chromosome 16. — *Science*, 1980, vol. 209, N 4453, p. 285—287.
7. *Misra H. P., Fridovich I.* Superoxide dismutase: A photochemical augmentation assay. — *Arch. Biochem. Biophys.*, 1977, vol. 181, N 1, p. 308—313.
8. *Pottathil R., Chandrolose K. A., Cuatrecasas P., Lang D. J.* Establishment of the interferon-mediated antiviral state. Possible role of superoxide dismutase. — *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, 1981, vol. 78, N 6, p. 3343—3347.
9. *Rehfeld N., Reichelt D.* Analytische und präparative Methoden der klinischen Biochemie. Berlin, Akad.-Verl., 1977. 496 S.
10. *Tapple A. L.* Lipid peroxidation damage to cell components. — *Fed. Proc.*, 1973, vol. 32, N 8, p. 1870—1874.
11. *Tien M., Svinger B. A., Aust S. D.* Superoxide dependent lipid peroxidation. — *Fed. Proc.*, 1981, vol. 40, N 2, p. 179—182.
12. *Woodbury W., Spencer A. K., Stahmann M. A.* An important procedure using ferrocyanide for detecting catalase isozymes. — *Anal. Biochem.*, 1971, vol. 44, N 1, p. 301—305.

Т. Н. Сниедзе, В. А. Васариня

Рижский медицинский институт

ВЛИЯНИЕ НЕКОТОРЫХ ГЕПАТОТОКСИЧЕСКИХ АГЕНТОВ НА ОСМОТИЧЕСКУЮ РЕЗИСТЕНТНОСТЬ ЭРИТРОЦИТОВ КРЫС

Известно, что любые соединения, как эндогенного, так и экзогенного происхождения, могут влиять на мембрану эритроцитов, изменяя ее физико-химическую структуру [4, 6, 10, 12, 16]. Такие «дефектные» эритроциты, по-видимому, не могут полноценно снабжать органы, ткани и клетки кислородом. Возникающий при этом дефицит кислорода может привести к явлению гипоксии в организме, в частности в печени, как в органе, наиболее чувствительном (позле мозга) к недостатку кислорода.

Целью данного исследования было выявление влияния α -нафтилизотиоцианата (АНИТ) и четыреххлористого углерода (CCl_4) на гемолиз эритроцитов.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДИКА ИССЛЕДОВАНИЯ

Исследование проводили на следующих группах крыс-самцов линии Вистар массой 180—200 г: 1) интактные животные; 2) крысы, которые внутримышечно получали CCl_4 (0,16 мл на 100 г массы); 3) крысы, которым перорально через зонд вводили 4%-ный масляный раствор АНИТ (100 мг/100 г массы).

Крыс умерщвляли путем обескровливания под легким эфирным наркозом через 1, 2, 3, 4, 5 и 6 сут после однократного введения токсина.

Интенсивность гемолиза эритроцитов исследовали в гипосмотической среде хлористого натрия [17]. Для этого выделенные эритроциты трижды промывали в 0,2 М фосфатном буфере (рН 7,4). Затем отмытые эритроциты в соотношении 1:10 к фосфатному буферу инкубировали в термостате при 37°C в течение 30 мин. После термостатирования эритроцитарную суспензию помещали в изотонический и гипотонический (0,35%) растворы

хлористого натрия. Через 30 мин пробы калориметрировали. Результаты выражали в процентах, принимая за 100% оптическую плотность негемолизированных эритроцитов.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Результаты исследования влияния гепатотоксических препаратов на осмотическую резистентность эритроцитов представлены в табл. 1.

Модель поражения печени CCl_4 относится к гепатозогепатиту [5]. Известны и интимные механизмы действия этого токсического агента. Местом действия CCl_4 является эндоплазматический ретикулум печени, в котором он метаболизируется до свободных радикалов, инициирующих процессы перекисного окисления липидов. В отличие от CCl_4 интоксикация АНИТ вызывает внутрипеченочный холестаз [13, 15], причем повреждающее действие яда проявляется в поражении как гепатоцитов, так и клеток стенок желчных протоков. Следует отметить, что и в этом случае имеет место повышение содержания продуктов липопероксидации в печени крыс [9].

При исследовании в динамике влияния CCl_4 на гемолиз эритроцитов было выявлено, что данный гепатотоксин повышает резистентность их в гипоосмотической среде в течение всего опыта, за исключением периодов 24 ч и 6 сут после введения яда.

Аналогично ведет себя и АНИТ: в период развития и становления холестаза (на 1—4-е сутки) повышается резистентность эритроцитов, а в период, когда морфологические и биохимиче-

Таблица 1

Исследование влияния интоксикации АНИТ с CCl_4 на гемолиз эритроцитов у крыс ($M \pm m$)*

Длительность опыта	Гемолиз (%) при введении		Длительность опыта	Гемолиз (%) при введении	
	CCl_4	АНИТ		CCl_4	АНИТ
24 ч	$11,7 \pm 1,5$ (n=8)	$28,8 \pm 4,7^{**}$ (n=9)	4 сут	$26,0 \pm 4,6^{**}$ (n=6)	$23,2 \pm 3,6^{**}$ (n=7)
48 ч	$22,7 \pm 3,7^{**}$ (n=8)	$45,4 \pm 5,6^{**}$ (n=9)	5 сут	$30,0 \pm 7,0^{**}$ (n=6)	$16,7 \pm 1,8$ (n=7)
72 ч	$27,6 \pm 5,8^{**}$ (n=8)	$62,1 \pm 4,3^{**}$ (n=9)	6 сут	$13,7 \pm 0,5$ (n=6)	$19,1 \pm 3,3$ (n=7)

* В норме гемолиз эритроцитов у 14 крыс составлял $13,9 \pm 0,9\%$.

** Отличия достоверны по отношению к норме.

ские признаки холестаза исчезают (на 5—6-е сутки) [8], показатели возвращаются к норме.

Таким образом, два совершенно различных по механизму действия гепатотоксических агента однотипно действуют на мембраны эритроцитов, т. е. повышают резистентность мембран.

Аналогичные изменения резистентности эритроцитов установлены в разгар острого вирусного гепатита [4]. При внутрипеченочном холестазе, вызванном АНИТ, и острым вирусном гепатите, по-видимому, сказывается как влияние билирубина на мембраны эритроцитов, так и повышение содержания холестерина в них [11, 12, 14]; в то же время можно предположить, что при отравлении крыс CCl_4 происходит уплотнение мембран за счет холестерина [11, 12].

Структурно-функциональное состояние эритроцитов может определять степень насыщения кислородом крови, транспорт и передачу кислорода гепатоцитам. При нарушении насыщения эритроцитов кислородом или при нарушении диссоциации кислорода от гемоглобина и транспорта его через мембраны эритроцитов в гепатоцитах может возникнуть гипоксия [4], которая, как известно, приводит к активации процессов перекисления. Причем при кратковременном воздействии гипоксии изменения в органах и тканях носят компенсаторно-приспособительный характер, а при длительной экспозиции — патологический [1—3, 7].

В то же время прослежена взаимосвязь между патологическим состоянием печени (разной этиологии) и снижением резистентности эритроцитов [2—4, 6, 14]. Однако в обоих случаях (при повышенной и пониженной резистентности эритроцитов) важно подобрать соответствующие гепатопротекторы, которые в первую очередь должны быть направлены на восстановление нормальной структуры и функции мембран эритроцитов и тем самым — на нормализацию снабжения ткани печени кислородом.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Андреева Л. Б., Алесенко А. В., Биленко М. Б. Связь интенсификации липидов с изменением состава фосфолипидов клеточных органелл при ишемии печени. — В кн.: Острая ишемия органов и ранние постишемические расстройства. М., 1978, с. 35—36.
2. Безуглый В. П. Гипоксия и ее роль в патологии печени. — В кн.: Успехи гепатологии. Рига, 1971, вып. 3, с. 94—110.
3. Блюгер А. Ф., Сондоре В. Ю., Залцмане В. К., Карташова О. Я. Изменение мембран гепатоцитов при острой гипоксии в эксперименте. — В кн.: Острая ишемия органов и ранние постишемические расстройства. М., 1978, с. 52—53.
4. Блюгер А. Ф., Крупникова Э. З., Сондоре В. Ю. и др. Функциональная характеристика эритроцитов при острых и хронических поражениях печени. — В кн.: Успехи гепатологии. Рига, 1984, вып. 11, с. 53—66.

5. Блюгер А. Ф., Майоре А. Я. Проблема перекисного окисления липидов в гепатологии. — В кн.: Успехи гепатологии, Рига, 1978, вып. 7, с. 22—54.
6. Бойтлер Э. Нарушение метаболизма эритроцитов и гемолитическая анемия. Пер. с англ. М., 1981. 256 с.
7. Верболович В. П., Теплова Л. Л., Нурахова Т. Г. и др. Роль перекисного окисления липидов в механизме повреждающего действия гипоксии на выключенную из кровообращения печень. — В кн.: Острая ишемия органов и ранние постишемические расстройства. М., 1978, с. 71—72.
8. Горштейн Э. С., Майоре А. Я., Макарова Н. А. Активность микросомальной системы гидроксилирования при внутрипеченочном холестазах у крыс, вызванном α -нафтилизотиоцианатом. — В кн.: Экспериментальная патология печени. Рига, 1983, с. 63—69.
9. Элрте Д. Л., Майоре А. Я. Перекисное окисление липидов в митохондриях печени крыс при отравлении α -нафтилизотиоцианатом. — В кн.: Экспериментальная патология печени. Рига, 1983, с. 106—110.
10. Araki K., Rifkind J. M. Erythrocyte membrane cholesterol: an explanation of the rate of hemolysis. — *Life Sci.*, 1980, vol. 26, p. 2223—2230.
11. Benbassat J., Keynnan A., Adler R., Eliakim M. Sodium transport in red cells of patients with acute viral hepatitis. — *Gastroenterology*, 1980, vol. 79, N 4, p. 655—658.
12. Compagnucci P., Cartechini M. G., Bolli G. et al. Hyperglycemia alters the physicochemical properties of proteins in erythrocyte membranes of diabetic patients. — *Hormone a. Metabolic Research*, 1983, vol. 15, N 6, p. 263—268.
13. Plaa G. L., Priestly B. G. Intrahepatic cholestasis induced by drugs and chemicals. — *Pharmacol. Rev.*, 1976, vol. 28, N 3, p. 207—273.
14. Powel L. W., Halliday J. W., Cooksley W. G. E. Hemolysis in liver disease: relationship to erythrocyte membrane function, serum bilirubin concentration and plasma electrolytes disturbances. — *Austral. a. N. Z. J. Med.*, 1976, vol. 6, N 1, p. 3—6.
15. Schaffner J., Scharnbeck H., Hutterer J. et al. Mechanism of cholestasis. 7. α -Naphthylisothiocyanate induced jaundice. — *Lab. Investig.*, 1973, vol. 28, N 3, p. 321—331.
16. Subhiyah B. W., Al-Hindawi A. Y. Red cell survival and splenic accumulation of radiochromium in liver cirrhosis with splenomegaly. — *Brit. J. Hematol.*, 1967, vol. 13, N 5, p. 773—778.
17. Taniguchi M., Aikawa M., Sakagami T. A simple and effective method for hemolysis with a hypoxanthine-xanthine oxydase system and alteration of erythrocyte. Phospholipid compositions during the hemolysis. — *J. Biochem.*, 1981, vol. 89, N 3, p. 795—800.

В. Ю. Сондоре, В. А. Васариня, И. Э. Миезе,
А. А. Андруссе, Э. Я. Лиелбриеде, Э. З. Крупникова

Рижский медицинский институт

ОСМОТИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА МЕМБРАН ЭРИТРОЦИТОВ ПРИ ОСТРЫХ И ХРОНИЧЕСКИХ ЗАБОЛЕВАНИЯХ ПЕЧЕНИ

Роль гипоксии в развитии патологического процесса в печени при остром вирусном гепатите не подлежит сомнению [1—3], однако ее роль при хронических заболеваниях печени мало изучена.

Можно полагать, что возникновение гипоксии в ткани печени может быть обусловлено, с одной стороны, нарушением снабжения ткани печени кислородом (нарушением функции эритроцитов, микроциркуляции), с другой — повышенной утилизацией кислорода в ткани печени в условиях интенсификации процессов окисления в ней.

Если рассматривать проблему гипоксии с указанных позиций, то следует отметить, что в настоящее время гипоксия при патологии печени изучена в основном с точки зрения нарушения газового состава крови [1—3] и выявления некоторых индикаторных метаболитов в крови, например молочной и пировиноградной кислот, характеризующих состояние энергетического обмена в ткани печени в условиях гипоксии [1, 3]. Неосновательно мало работ, посвященных роли изменения структуры и функции мембран эритроцитов в нарушении транспорта кислорода при острых и хронических поражениях печени [5, 6]. Изучение физико-химических свойств мембран эритроцитов важно и в некоторых других аспектах, а именно: имеются данные об участии эритроцитов в транспорте эндогенных и экзогенных соединений [10], об их участии в иммунологических реакциях *in vitro* [11].

Целью нашего исследования явилось изучение осмотических свойств мембран эритроцитов больных острым вирусным гепатитом и некоторыми хроническими поражениями печени.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДИКА ИССЛЕДОВАНИЯ

У 19 больных острыми вирусными гепатитами (А и В, тяжелого и среднетяжелого течения) в разгар заболевания и на спаде желтухи, у 12 больных хроническим персистирующим гепатитом, у 7 — жировым гепатозом, у 9 — с синдромом Жильбера, у 7 — суб- и у 8 — декомпенсированным циррозом печени, а также у 25 здоровых лиц была изучена осмотическая резистентность эритроцитов в гипотонической среде хлористого натрия и глюкозы по методу Танигучи [12].

Предварительно с помощью исследования степени гемолиза эритроцитов в гипотонических растворах различной концентрации хлористого натрия (в диапазоне от 0,6 до 0,3%) и глюкозы (в диапазоне от 3 до 1%) была определена одна оптимальная концентрация гипоосмотических растворов (0,43%-ный раствор хлористого натрия и 1,5%-ный раствор глюкозы), наиболее наглядно свидетельствующая о тех или иных изменениях осмотической стойкости эритроцитов.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Результаты изучения осмотической резистентности эритроцитов в гипоосмотической среде хлористого натрия и глюкозы приведены в табл. 1.

Таблица 1

Осмотическая стойкость эритроцитов больных острыми и хроническими заболеваниями печени в гипотоническом растворе хлористого натрия и глюкозы

Группа обследованных	Кол-во обследованных	Негемоллизированные эритроциты, % в 0,43%-ном р-ре NaCl ($\bar{x} \pm m$)	Негемоллизированные эритроциты, % в 1,5%-ном р-ре глюкозы ($\bar{x} \pm m$)
Здоровые	25	32,1 ± 2,2	54,1 ± 1,9
Острый вирусный гепатит	19	71,2 ± 2,6*	39,4 ± 1,9
разгар	19	27,8 ± 1,9	39,4 ± 1,9
спад	12	31,8 ± 2,6	48,5 ± 3,4
Хронический персистирующий гепатит	7	22,3 ± 1,8*	33,6 ± 2,6
Жировой гепатоз	9	24,1 ± 2,0*	29,2 ± 2,9
Синдром Жильбера			
Цирроз печени	7	46,8 ± 1,7*	59,1 ± 4,1
субкомпенсированный	8	51,3 ± 2,3*	63,4 ± 2,7*
декомпенсированный			

* Отличия достоверны по отношению к группе здоровых.

Обращает на себя внимание высокая осмотическая стойкость эритроцитов больных острым вирусным гепатитом в разгар заболевания и декомпенсированным циррозом печени в гипотоническом растворе хлористого натрия и глюкозы по отношению к норме (в обоих случаях $p < 0,01$). Напротив, резистентность эритроцитов больных жировым гепатозом и с синдромом Жильбера в этих же растворах ниже, чем у здоровых лиц ($p < 0,05$). У больных хроническим персистирующим гепатитом осмотическая стойкость эритроцитов не изменена.

Интересно отметить, что количество негемолизированных эритроцитов в гипотоническом (1,5%-ном) растворе глюкозы у больных всех обследованных групп, а также у здоровых лиц выше, чем в гипотоническом растворе (0,43%-ном) хлористого натрия, хотя концентрация последнего составляет 1/2 таковой изотонического раствора, а раствора глюкозы — около 1/3 изотонического. Очевидно, эти различия обусловлены особенностями структурной перестройки мембран эритроцитов и, следовательно, различиями проницаемости воды через мембраны эритроцитов.

Имеется несколько сообщений о повышении осмотической стойкости эритроцитов при остром вирусном гепатите [7, 8]. Этот факт объясняют понижением скорости транспорта воды через мембраны эритроцитов в связи с повышением содержания холестерина (и, как мы считаем, его производных) в их мембранах. Исследования терморезистентности эритроцитов и выявление повышения их термостойкости у больных острым вирусным гепатитом [6] также свидетельствуют о повышении отношения холестерин/фосфолипиды в мембранах эритроцитов этих больных.

Повышение осмотической резистентности эритроцитов больных циррозом печени, очевидно, также можно объяснить накоплением холестерина в мембранах этих клеток [9]. Напротив, понижение осмотической резистентности эритроцитов больных с синдромом Жильбера и жировым гепатозом, на наш взгляд, связано с понижением отношения холестерин/фосфолипиды в мембранах эритроцитов этих больных, накоплением триглицеридов или продуктов превращения холестерина, способствующих гемолизу эритроцитов *in vitro* в гипоосмотической среде.

Заслуживает внимания выявление повышения осмотической стойкости эритроцитов в эксперименте у крыс, получавших два различных гепатотоксина — четыреххлористый углерод и α -нафтилизотиоцианат [4].

Однотипные изменения, т. е. повышение осмотической резистентности эритроцитов, полученные у больных острым вирусным гепатитом в разгар заболевания и у больных циррозом печени, а также при экспериментальном поражении печени химическими агентами, очевидно, говорят об универсальности

механизма, лежащего в основе этого явления, — о структурной реорганизации мембран эритроцитов и модификации их функции в результате изменения белково-липидных взаимодействий в их мембранах, в результате индукции монооксигеназной системы гепатоцитов. Следует также отметить, что показатели теста гипотонического гемолиза эритроцитов тесно коррелируют с тяжестью патологического процесса в печени.

Таким образом, изменениями физико-химических (осмотических) свойств мембран эритроцитов можно в определенной степени объяснить возникновение гипоксии как универсального, неспецифического синдрома при различных типах поражения печени.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Баран В. М. Гипоксические процессы в патогенезе и лечении вирусного гепатита В. Автореф. дис. ... д-ра мед. наук. М., 1983. 34 с.
2. Безуглый В. П. Гипоксия и ее роль в патологии печени. — В кн.: Успехи гепатологии, Рига, 1971, вып. 3, с. 94—110.
3. Виксис Л. М. Определение насыщения капиллярной крови кислородом в целях прогнозирования печеночно-клеточной прекомы и комы при вирусном гепатите В. — В кн.: Вирусные гепатиты. Рига, 1981, с. 9—11.
4. Снiedzе Т. Н., Васариня В. А. Влияние некоторых гепатотоксических агентов на осмотическую резистентность эритроцитов крыс. — В наст. кн., с. 119—122.
5. Сондоре В. Ю., Васариня В. А., Бароян Н. В. и др. Изменения мембран эритроцитов и их значение в патогенезе заболеваний печени. — В кн.: VI Всесоюзная конференция по клинической биохимии, морфологии и иммунологии инфекционных болезней. Тез. докл. Рига, 1983. с. 512—513.
6. Шавлов Н. М., Слобожанина Е. И., Черницкий Е. А. и др. Исследование терморезистентности эритроцитов больных вирусными гепатитами. — В кн.: VI Всесоюзная конференция по клинической биохимии, морфологии и иммунологии инфекционных болезней. Тез. докл. Рига, 1983. с. 569—570.
7. Araki K., Rifkind J. M. Erythrocyte membrane cholesterol: an explanation of the rate of hemolysis. — *Life Sci.*, 1980, vol. 26, p. 2223—2230.
8. Benbassat J., Keynan A., Adler R. et al. Sodium transport in red cells of patients with acute viral hepatitis. — *Gastroenterology*, 1980, vol. 79, N 4, p. 655—658.
9. Cooper R. A., Shattil S. J. Membrane cholesterol — is enough too much? — *New Engl. J. Med.*, 1980, vol. 302, N 1, p. 49—51.
10. Goresky C. A., Bach G. G., Nadeau B. E. Red cell carriage of label. Its limiting effect on the exchange on materials in the liver. — *Circulation Research*, 1975, vol. 36, N 2, p. 328—351.
11. Siegel I., Liu T. L., Gleicher N. Developmental changes of components of the red cell immune system in the rabbit. — *J. Clin. Lab. Immunol.*, 1983, vol. 10, N 1, p. 41—46.
12. Taniguchi M., Aikawa M., Sakagami T. A simple and effective method for hemolysis with a hypoxanthine-xanthine oxydase system and alteration of erythrocyte. Phospholipid compositions during the hemolysis. — *J. Biochem.*, 1981, vol. 89, N 3, p. 795—800.

IV. ЛЕЧЕБНЫЕ СРЕДСТВА И МЕМБРАНЫ КЛЕТОК

УДК 577.1:615.2/3(615.27)

*А. Г. Одынец, Д. А. Берзиня, А. Х. Велена, И. А. Вуцина,
А. А. Краузе, Г. Я. Дубур, А. А. Кименис*

Институт органического синтеза АН ЛатвССР

АНТИОКСИДАНТНАЯ И ГЕПАТОПРОТЕКТОРНАЯ АКТИВНОСТЬ РЯДА 3,4-ДИГИДРОПИРИДИН-2-ТИОНОВ И ИХ СТРУКТУРНЫХ АНАЛОГОВ

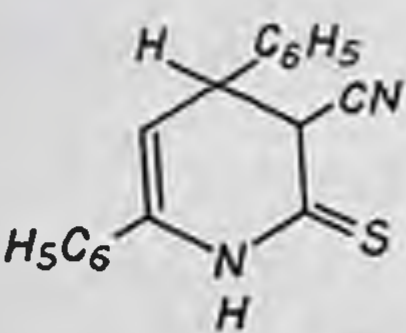
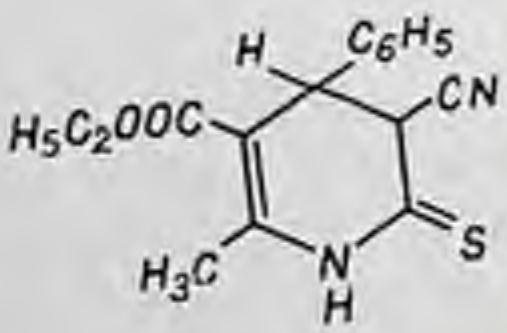
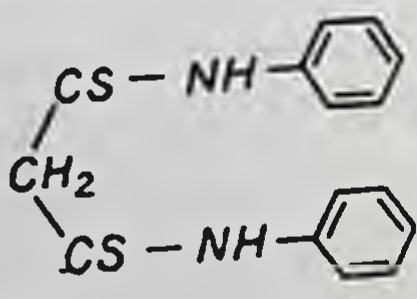
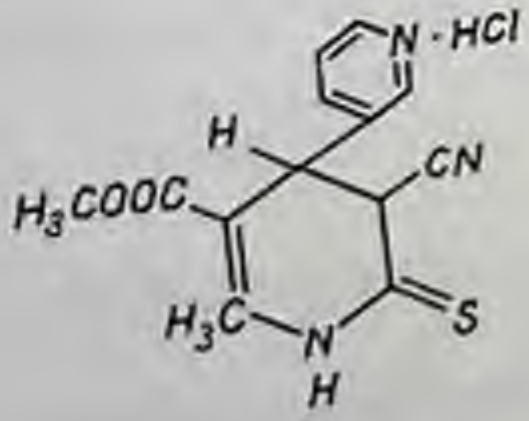
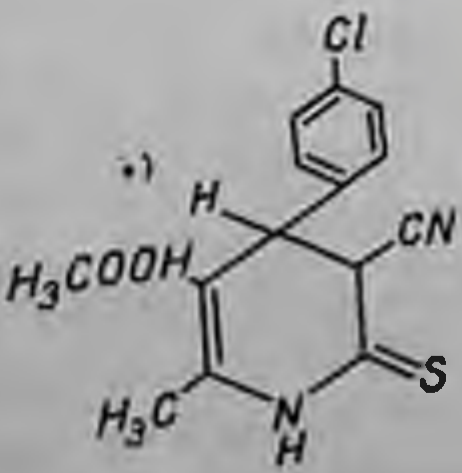
Производные 3,4-дигидропирин-2-тиона являются группой серосодержащих частично гидрированных гетероциклических соединений, среди которых найдены вещества антиоксидантного действия [2, 3]. Структурная близость этих соединений к производным 1,4-дигидропиридина, у которых выявлена как антиоксидантная, так и гепатопротекторная активность [1, 4, 5], а также наличие гепатопротекторных свойств у ряда сероорганических соединений — метионина, цистина, цистеаминна [8, 9], побудили исследовать взаимосвязь антиоксидного эффекта ряда 3,4-дигидропирин-2-тионов и их аналогов с возможными их гепатопротекторными свойствами. Исследуемые соединения (табл. 1) — производные тиоамидов, среди которых имеются как гепатопротекторы [1, 14], так и гепатотоксические соединения — тиоацетамид [1] и тиобензамид [11].

МАТЕРИАЛ И МЕТОДИКА ИССЛЕДОВАНИЯ

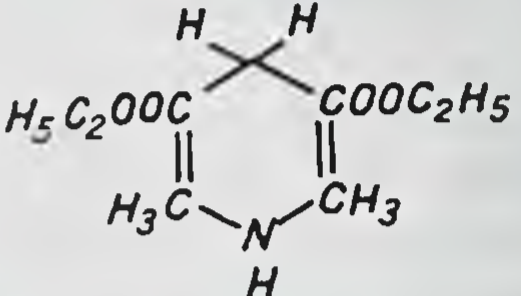
Антиоксидантную активность (АОА) соединений I—VII определяли в модельной системе перекисного окисления липидов (ПОЛ) — липосомах фосфатидилхолина (4 мг/мл буфера) в присутствии катализатора метгемоглобина (2,5 мкМ в среде) при 40°C. Липосомы используемого в качестве стандарта лецитина (Харьковский з-д) готовили инъекционным методом [7] в 0,15 М NaCl с 0,01 М трис-HCl; pH 7,4. Об АОА в этой системе судили по относительному снижению (V_0/V_i) начальной скорости (V_0) реакции потребления кислорода в присутствии ингибитора (V_i), регистрируемого оксиграфически на приборе

Таблица 1

Антиоксидантный эффект производных 3,4-дигидропиридин-2-тиона
и их аналогов в липосомах фосфатидилхолина

Соединение		С, мкМ	ЛОА	
№ п/п	Формула		V_d/V_i	τ, мин
1	2	3	4	5
I		2,5	1,3	—
		5,0	2,5	—
		10,0	10,9	—
II		5,0	1,2	4,5
		10,0	2,4	11,0
III		2,5	1,8	1,3
		5,0	14,3	14,5
		10,0	215,0	155,5
IV		2,5	0,9	—
		5,0	1,1	—
		10,0	1,2	—
		100,0	6,1	—
V		5,0	1,4	1,5
		10,0	4,5	5,2
		50,0	6,2	387,0

Окончание таблицы 1

	2	3	4	5
VI Цистеамин Х ХНСI		5,0 10,0	2,9 1,8	4,2 2,0
VII Этидин		2,5 5,0 10,0	1,3 3,6 6,0	— 17,2 29,0

«YSI Biological Oxygen Monitor-52» фирмы «Yellow Springs Instruments» (США).

В качестве контрольных препаратов использовали метионин и глутатион восстановленный фирмы «Реанал» (ВНР) и цистеамин гидрохлорид фирмы «Ферак» (ГДР).

Гепатопротекторную активность исследовали на белых крысах-самцах массой 180—220 г. В опытах *in vitro* изучали способность соединений I—VII и глутатиона предотвращать усиленное образование вторичного продукта ПОЛ малонового диальдегида (МДА) при добавлении в инкубационную среду CCl_4 по ранее описанной методике [5].

В опытах *in vivo* CCl_4 инъецировали внутривенно в дозе 0,5 мл/кг в виде 10%-ного раствора в оливковом масле. Исследуемые соединения вводили перорально в дозе 100 мг/кг в виде водной суспензии с добавлением твина-80 за 24 ч до инъекции CCl_4 . Контрольным животным вводили 4,5 мл/кг оливкового масла и водный раствор твина-80. Животных декапитировали под легким эфирным наркозом через 24 ч после введения CCl_4 . Активность аланинаминотрансферазы (АлАТ) и аспартатамино-трансферазы (АсАТ) в сыворотке крови определяли по методу [13], концентрацию билирубина — по методу Ендрасика [6]. Содержание белка в гомогенате печени определяли по биуретовой реакции с использованием бычьего альбумина в качестве стандарта [10], содержание цитохрома Р-450 — в гомогенате печени на спектрофотометре «Hitachi-577» по методу [12]. Оценку достоверных различий между экспериментальными сериями проводили с использованием критерия Вилкоксона—Манна—Уитни.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Исследование АОА производных 3,4-дигидропиридин-2-тионов показало, что присущие им всем антиоксидантные свойства проявляются по-разному (см. табл. 1) и зависят как от

структуры, так и от концентрации. Сравнительно большее снижение начальной скорости реакции (и появление индукционного периода τ) отмечено уже при концентрации этих антиоксидантов, равной 5—10 мкМ. Антиоксидантные свойства в этой системе сравнительно слабо проявляются у цистеаминна. Довольно высокая АОА обнаружена у диамида п,п-дифенилдитномалоновой кислоты (соединение III).

При исследовании влияния этих веществ на прооксидантный эффект CCl_4 в опытах *in vitro* (табл. 2) не наблюдается той однонаправленности действия производных 3,4-дигидропиридин-2-тионов, какая имеет место в липосомальной системе с метгемоглобином в качестве прооксиданта (см. табл. 1). Очевидно, при образовании вторичного продукта ПОЛ — МДА — антипрооксидантный эффект испытуемых соедин. II и V менее выражен, чем при образовании первичных продуктов на стадии инициации, прослеживаемой оксиграфически. Высокий антиоксидантный эффект и в этой системе сохраняется у соединений III, что свидетельствует о способности данного соединения предотвращать образование как первичных, так и вторичных продуктов ПОЛ.

При дальнейшем исследовании влияния производных 3,4-дигидропиридин-2-тиона на биохимические показатели крови и печени в опытах *in vivo* (табл. 3 и 4) оказалось, что гепатопротекторный эффект этих соединений слабо выражен — не от-

Таблица 2

Действие исследуемых соединений и контрольных веществ на прооксидантный эффект CCl_4 в опытах

Схема эксперимента	Число экспериментов	МДА	
		нМ/мг белка·мин ($M \pm m$)	%
Контроль	30	6,0 ± 0,6	100
CCl_4	30	18,9 ± 1,0*	314
CCl_4 + глутатион	8	4,4 ± 0,5**	73
CCl_4 + цистеамин	5	4,7 ± 0,3	81
CCl_4 + метионин	5	7,3 ± 1,3**	122
CCl_4 + соедин. I	5	4,0 ± 0,9**	67
CCl_4 + соедин. II	5	6,5 ± 1,6**	108
CCl_4 + соедин. III	5	2,9 ± 0,3**	48
CCl_4 + соедин. IV	5	3,5 ± 0,9**	58
CCl_4 + соедин. V	5	6,4 ± 0,5**	106
CCl_4 + этидин	20	4,4 ± 0,4**	74

* Различия статистически достоверны по сравнению с контрольной группой при $p \leq 0,05$.

** Различия статистически достоверны по сравнению с группой, получавшей CCl_4 , при $p \leq 0,05$.

Таблица 3

Биохимические показатели печени через 24 ч после введения CCl_4 и предварительного введения изученных соединений

Схема эксперимента	Число животных	Белок		Цитохром Р-450	
		мг/г печени ($M \pm m$)	%	нМ/мг белка ($M \pm m$)	%
Контроль	9	158,4 ± 9,2	100	0,39 ± 0,04	100
CCl_4	9	123,2 ± 6,8*	78	0,17 ± 0,04*	44
CCl_4 + цистеамин	5	140,6 ± 6,2**	89	—	—
CCl_4 + метионин	4	130,0 ± 8,9	82	—	—
CCl_4 + соед. I	4	123,2 ± 1,3	78	—	—
CCl_4 + соед. II	3	121,8 ± 1,9	77	—	—
CCl_4 + соед. III	4	133,1 ± 5,7	84	0,17 ± 0,01	44
CCl_4 + соед. IV	4	131,8 ± 2,6	83	0,15 ± 0,04	38
CCl_4 + соед. V	4	140,3 ± 9,6**	88	—	—
CCl_4 + этидин	7	119,4 ± 6,9	75	0,17 ± 0,05	44

См. пояснения к табл. 2.

мечено существенного улучшения большей части изученных показателей поражения печени CCl_4 , однако отмечается тенденция к нормализации количества общего белка в печени, сравнивая с действием цистеамин и метионин, наблюдаемая на фоне отсутствия положительного действия на этот показатель этидина.

По всей вероятности, для проявления гепатопротекторной активности у производных 3,4-дигидропиридин-2-тиона необходимым условием является не только антиоксидантный эффект, отмеченный у данных соединений, но и сочетание этого эффекта со способностью предотвращать превращение CCl_4 в $\cdot\text{CCl}_3$ радикал, что проявляется в действии цистеамин, с нормализацией уровня эндогенных протекторов (глутатиона, липидных антиоксидантов). Кроме того, ряд авторов считают, что для проявления гепатопротекторных свойств тиоамидов необходимо наличие радикала $-\text{CSSH}$ у атома С или О [14]. Среди исследованных нами производных 3,4-дигидропиридин-2-тиона не выявлено одного ответственного за активность структурного фрагмента; для этого требуется расширение группы испытуемых соединений. Однако отмечено, что замена неполярного заместителя (фенильного радикала) в положении 4 — 3,4-дигидропиридин-2-тиона (соединения I и II) — на более полярные радикалы — р-пиридил (соединение IV) и п-хлорфенил (соединение V) приводит к некоторому усилению гепатопротекторной активности соединений этого ряда. Отмеченная тенденция зависимости активности от структуры 3,4-дигидропиридин-2-тионов имеет

Биохимические показатели сыворотки крови через 24 ч после введения CCl_4 и предварительного введения исследуемых соединений

Схема эксперимента	Число животных	АлАТ		АсАТ		АсАТ/АлАТ		Общий билирубин	
		мкМ/ч/мл ($M \pm m$)	%	мкМ/ч/мл ($M \pm m$)	%	($M \pm m$)	%	мг% ($M \pm m$)	%
Контроль	14	$1,64 \pm 0,11$	100	$2,25 \pm 0,07$	100	$1,453 \pm 0,099$	100	$0,184 \pm 0,031$	100
CCl_4	14	$4,67 \pm 0,07^*$	285	$3,96 \pm 0,10^*$	176	$0,851 \pm 0,023^*$	58	$0,358 \pm 0,040^*$	194
CCl_4 + цистеамин	5	$1,91 \pm 0,16^{**}$	116	$2,35 \pm 0,16^{**}$	104	$1,267 \pm 0,153^{**}$	87	—	—
CCl_4 + метионин	4	$4,66 \pm 0,32$	284	$4,12 \pm 0,63$	183	$0,884 \pm 0,152$	61	$0,287 \pm 0,018^{**}$	156
CCl_4 + соедин. I	4	$4,51 \pm 0,38$	275	$3,90 \pm 0,30$	173	$0,860 \pm 0,005$	59	$0,332 \pm 0,018$	180
CCl_4 + соедин. II	3	$5,06 \pm 0,42$	308	$3,98 \pm 0,38$	177	$0,788 \pm 0,098$	54	$0,352 \pm 0,053$	191
CCl_4 + соедин. III	4	$4,57 \pm 0,04$	279	$3,59 \pm 0,25$	159	$0,784 \pm 0,051$	54	—	—
CCl_4 + соедин. IV	4	$4,30 \pm 0,12^{**}$	262	$3,80 \pm 0,20$	169	$0,883 \pm 0,022$	61	—	—
CCl_4 + соедин. V	4	$4,54 \pm 0,81$	277	$3,89 \pm 0,61$	173	$0,858 \pm 0,093$	59	—	—
CCl_4 + этидин	12	$4,44 \pm 0,14$	271	$3,87 \pm 0,10$	172	$0,877 \pm 0,023$	60	$0,265 \pm 0,031^{**}$	144

См. пояснения к табл. 2.

определенное значение для дальнейшего поиска соединений, обладающих гепатопротекторной активностью, среди соединений этого ряда.

Таким образом, производные 3,4-дигидропиридин-2-тиона проявляют АОА как в липосомах при инициации ПОЛ метгемоглобином, так и в микросомах печени крыс в присутствии CCl_4 . Гепатопротекторный эффект этих соединений слабо выражен, отмечена тенденция к нормализации уровня белка в печени.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Блогер А. Ф., Майоре А. Я. Итоги и перспективы применения антиоксидантов в гепатологии. — Изв. АН ЛатвССР, 1979, № 12, с. 101—112.
2. Велена А. Х., Вуцина И. А., Краузе А. А. и др. Новая группа серосодержащих синтетических антиоксидантов — производные 3,4-дигидропиридин-2-тионов-2. — В кн.: Всесоюзное совещание «Биоантиоксидант». Тез. докл. Черноголовка, 1983, с. 32—33.
3. Краузе А. А., Болика З. А., Пелчер Ю. Э. и др. Производные тиоамидов, обладающие антиоксидантной активностью. — В кн.: Перспективы биоорганической химии в создании новых лекарственных препаратов. Рига, 1982, с. 205.
4. Майоре А. Я., Зариня Л. А., Дубур Г. Я., Берман Э. С. Действие антиоксиданта этидина на пораженную серноокислым гидразином печень. — Изв. АН ЛатвССР, 1972, № 7, с. 107—112.
5. Одынец А. Г., Григалинович Г. А., Паринов В. Я. и др. Изучение сравнительного действия этидина и 2,6-диметил-3,5-диэтоксикарбонилпиридина на прооксидантный эффект четыреххлористого углерода. — В кн.: Экспериментальная патология печени. Рига, 1983, с. 135—140.
6. Покровский А. А. Биохимические методы исследования в клинике. М., 1969, с. 383—384.
7. Balzari S., Korn D. Single bilayer liposomes prepared without sonification. — Biochem. Biophys. Acta, 1973, vol. 298, N 6, p. 1015—1019.
8. Castro J. A., Cignoli E. V., Castro C. R. de, et al. Prevention by cystamine of liver necrosis and early biochemical alterations induced by carbon tetrachloride. — Biochem. Pharmacol., 1972, vol. 21, N 1, p. 49—57.
9. Hajeman D. G., Hoekstra W. G. Protection against carbon tetrachloride-induced lipid peroxidation in the rat by dietary vitamin E, selenium and methionine as measured by ethane evolution. — J. Nutrition, 1977, vol. 107, N 4, p. 656—665.
10. Leyne E. Spectrophotometric and turbidimetric methods for measuring proteins. — In: Methods in enzymology. New York, 1957, vol. 3, p. 450—451.
11. Malvaldi G., Chieli E., Saviozzi M. Promotive effects of thiobenzamide on liver carcinogenesis. — Gann, 1983, vol. 74, N 4, p. 469—471.
12. Matsubara T., Koike M., Touchi A. et al. Quantitative determination of cytochrome P-450 in rat liver homogenate. — Anal. Biochem., 1976, vol. 15, N 3, p. 596—603.
13. Reitman S., Frankel S. A. colorimetric method for the determination of serum glutamic oxalacetic and glutamic piruvic transaminases. — Amer. J. Clin. Pathol., 1957, vol. 28, N 1, p. 56—63.
14. Sakaguchi T., Nishimura H., Masuda K. et al. The relationship between chemical structure and protective effect of dithiocarbamate derivatives against experimental hepatic injury induced by carbon tetrachloride administration in rats. — Biochem. Pharmacol., 1966, vol. 15, N 3, p. 756—758.

УДК 615.275:615.454:616—001.4

*Л. Р. Пфафрод, Л. И. Слуцкий, Л. Э. Домбровска,
А. З. Амелин, В. Е. Капуцкий*

Латвийский НИИ травматологии и ортопедии

ВЛИЯНИЕ ЛОКАЛЬНОЙ АППЛИКАЦИИ ОСТЕОЛАТИРОГЕНА НА ПОЛИМЕРНОЙ ОСНОВЕ НА ЦИТОЛОГИЧЕСКИЕ И БИОХИМИЧЕСКИЕ ПОКАЗАТЕЛИ ГРАНУЛЯЦИОННО-ФИБРОЗНОЙ ТКАНИ

Остеолатиризм — системное генерализованное поражение соединительной ткани, вызываемое группой токсических веществ, так называемых остеолатиригенов, центральным патогенетическим звеном которого является угнетение лизилоксидазы с нарушением поперечного связывания фибриллярных белков [5]. Этот эффект остеолатиригенов может получить применение в клинической практике в тех случаях, когда необходимо предотвратить избыточное фиброзирование [5, 6, 8, 9]. Однако на пути к такому применению необходимо преодолеть два препятствия. Во-первых, остеолатиригены — низкомолекулярные вещества, их действие в организме трудно локализовать, даже при локальной аппликации [10]. Во-вторых, действие остеолатиригенов на функциональное состояние клеток мало изучено; этому вопросу посвящены лишь единичные сообщения [7, 12, 13], в которых не рассматривается реакция на остеолатиригены клеток соединительной ткани, находящейся в состоянии активной пролиферации.

Мы исследовали влияние локальной аппликации одного из остеолатиригенов — семикарбазида, присоединенного для замедления всасывания к полимеру-носителю, на цитологические и биохимические показатели грануляционно-фиброзной ткани раневых дефектов и подкожных гранулем.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДИКА ИССЛЕДОВАНИЯ

В качестве полимера-носителя служила химически модифицированная рассасывающая целлюлоза с присоединенным семикарбазидом в виде марли (марля-СК), тампоны из которой имплантировались под кожу, и в виде седиментационно устойчивой

вого гидрогеля (суспензия-СК), предназначенного для нанесения на поверхность ран. Количество присоединенного к полимеру семикарбазида было рассчитано так, чтобы разовая доза не превышала 7,5 мг, т. е. была бы втрое меньше средней остеолатиногенной дозы вводимого парентерально хлористо-водородного семикарбазида. В сравнительных экспериментах применялись те же целлюлозные материалы, не содержащие остеолатиногена. Эксперименты проводили на лабораторных крысах с массой тела около 200 г. Цитологические отпечатки с раневой поверхности исследованы по методу А. В. Николаева [3]. Методы биохимического анализа грануляционно-фиброзной ткани были изложены ранее [4].

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Цитологическая картина раневых отпечатков, взятых на 7-й день после нанесения плоскостного раневого дефекта кожи (для этого был осторожно удален струп) (табл. 1), выглядит в количественном аспекте более благоприятной при воздействии суспензии-СК: заметно снижается нейтрофилез; увеличивается число гистиоцитов; появляются фибробласты, свидетельствующие о более раннем переходе процесса заживления в завершающую стадию. Следует особо отметить накопление макрофагов, которые, по современным представлениям [2, 11], играют центральную роль в системе ауторегулирования воспаления, связывая его некротически-катаболическую стадию с пролиферативно-анаболической. Отмечены также существенные качественные особенности макрофагов. В их числе были обнаружены клетки, вся цитоплазма которых была плотно заполнена базофильной мозаичной субстанцией. При малом увеличении они выделялись крупными размерами и интенсивным темно-фиолетовым цветом;

Таблица 1

Влияние суспензии-СК на цитологическую картину раневых отпечатков (% к общему числу подсчитанных клеток, $M \pm m$)

Клетки	Суспензия-СК	Суспензия без СК	Контроль
Нейтрофилы	$83,0 \pm 4,0$	$91,5 \pm 2,0$	$98,0 \pm 1,5$
Лимфоциты	$1,2 \pm 0,2$	—	—
Макрофаги	$7,0 \pm 2,0^*$	$3,0 \pm 1,5$	$1,8 \pm 0,8$
Гигантские	0,2	—	0,2
Гистиоциты	$6,0 \pm 2,0$	$5,0 \pm 0,3$	$1,0 \pm 0,2$
Фибробласты	$2,0 \pm 0,3$	—	—

* В этой группе в число макрофагов включены «темные» клетки (подробнее см. в тексте) в количестве $3,0 \pm 1,2\%$.

они были названы «темными». При просмотре с иммерсией (рис. I, II) «темные» клетки отличаются по степени зрелости и по количеству базофильного вещества. Некоторые, очевидно более молодые, имели хорошо выраженную наружную цитоплазматическую мембрану. У других, вероятно старых, целостность мембраны была нарушена и часть фиолетовых глыбок располагалась вокруг клеток.

В сравнительной серии (при использовании суспензии без СК) макрофаги содержали только включения нерегулярной расплывчатой формы, бледно-голубоватой окраски. Эти включения, скорее всего, являются фагоцитированными фрагментами частично расщепленной модифицированной целлюлозы. Что же касается интенсивно базофильных включений «темных» клеток, то можно предполагать, что присоединенный к полимеру семикарбазид содержит аминогруппу, способствующую включению инородных веществ в лизосомы [1]. Можно думать также об угнетении остеолатирогеном внутриклеточных (лизосомальных) ферментов, вследствие чего резко задерживается гидролиз перевариваемых частиц.

Однако анализ гистологической картины гранулем, развивающихся при подкожной имплантации тампонов из марли-СК, позволяет высказать и другое предположение. В ткани этих гранулем, в отличие от гранулем в сравнительном опыте, на фоне усиленного отложения коллагеновых волокон в межклеточных пространствах, были найдены крупные (диаметром до 30 мк) клетки, в цитоплазме которых содержались фибриллярные структуры, окрашивающиеся по Ван-Гизону, как коллаген, в красный цвет (рис. III), и выявляющиеся с помощью импрегнации по Футу (рис. IV). Это заставляет думать, что базофильные включения «темных» клеток также представляют собой фагоцитированные фрагменты коллагеновых волокон в том числе не вполне зрелых (аргиروفильных).

Таблица 2

Биохимические показатели раневого дефекта на 7-й день заживления
(г/100 г высушенной обезжиренной ткани)

Показатели	Суспензия-СК	Суспензия без СК	Контроль
ДНК	2,54	2,35	2,68
РНК	1,06	1,25	1,05
Оксипролин	3,15	2,88	2,18
Оксилизин	0,29	0,38	0,34
Тирозин	2,99	2,88	2,82
Гексозамины	0,80	0,84	0,84
Сialовые кислоты	0,76	0,71	0,70
Гексуроновые кислоты	0,65	0,64	0,72

Подобная точка зрения согласуется с результатами биохимического исследования грануляционно-фиброзной ткани кожных ран на 7-й день после их нанесения (табл. 2). В этом исследовании установлено повышение концентрации оксипролина, отражающее ускоренное накопление коллагена в ткани. Однако под действием суспензии-СК снижается концентрация другой специфической для коллагена аминокислоты — оксипролина, которая необходима для образования межмолекулярных поперечных связей в коллагене. В результате возникает характерное для остеолатиризма нарушение надмолекулярной структурной стабильности синтезируемого коллагена [5]: он подвергается быстрой деградации и фагоцитозу. В этой связи уместно вспомнить, что внутриклеточная локализация фрагментов коллагеновых фибрилл была описана при электронно-микроскопическом изучении хондроцитов реберных хрящей крыс, получавших другой остеолатиноген — β -аминопропионитрил [7].

Таким образом, проведенные эксперименты позволяют заключить, что остеолатиноген на полимерной основе, не вызывая генерализованных проявлений остеолатиризма (которые полностью отсутствовали у всех подопытных животных), оказывает влияние на клеточные механизмы формирования грануляционно-фиброзной ткани. Этот эффект был достигнут с помощью значительно меньших доз препарата, чем те, которые применялись при изучении сополимера β -аминопропионитрила, ангидрида малеиновой кислоты и метилвинилового эфира [14] и сопровождалась некоторыми общими симптомами остеолатиризма, не оказывая существенного действия на фиброзирование. Причина такого различия результатов кроется, вероятно, в различии экспериментальных моделей. Для конкретизации возможных путей использования этого эффекта необходимы дальнейшие экспериментальные исследования.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Кирьянова Е. А., Зеленин А. В. Некоторые закономерности накопления инородных для клетки веществ в лизосомах. — ДАН СССР, 1970, т. 190, № 2, с. 451—454.
2. Маянский Д. Н. Уровни регуляции фибропластических процессов. — Патол. физиология и эксперим. терапия, 1982, № 4, с. 27—39.
3. Николаев А. В., Шапиро А. Н., Гаврильчак А. В., Мамедов Л. А. Цитология инфицированных и неинфицированных ран при лечении их коллагеновыми препаратами. — В кн.: Экспериментально-клинические аспекты репаративных процессов и методы их стимулирования. М., 1977, с. 36—41.
4. Слуцкий Л. И. Биохимия нормальной и патологически измененной соединительной ткани. Л., 1969. 370 с.
5. Слуцкий Л. И., Домбровская Л. Э. Остеолатиризм. Рига, 1972. 182 с.
6. Слуцкий Л. И., Домбровская Л. Э., Нейман Л. Б. и др. О возможности регулирования биохимических свойств костной мозоли с помощью био-

- химического воздействия. — В кн.: НИИ травматологии и ортопедии МЗ БССР. Материалы итоговой научной сессии. Минск, 1975, с. 150—152.
7. *Altmann H.-D.* Intrazelluläre Kollagenspindelbildungen in den Knorpelzellen der Rippen von Ratten beim experimentellen Lathyrismus. Diss. Kiel, 1973. 31 S.
 8. *Amiel D., Akeson W. H., Harwood F. L. et al.* Effect of low-dosage schedule of d-penicillamine on collagen cross-linking in a nine week immobilized rabbit knee. — *Conn. Tissue Research*, 1977, vol. 5, N 3, p. 179—183.
 9. *Dombrowska L., Janson H., Slutski L. et al.* On the possible influence of rheological parameters on joint contracture. — *Biorheology*, 1974, vol. 11, N 6, p. 465—471.
 10. *Fleisher J. H., Misorowski R., Owen J. A., Chvapil M.* Topical application of β -aminopropionitrile. — *Life Sci.*, 1981, vol. 29, N 24, p. 2553—2560.
 11. *Kapp J.-E.* Phagocytosis — a central mechanism in inflammation. — *Klin. Woch.-Schr.*, 1978, Bd 56, H. 21, S. 1039—1048.
 12. *Levene C. I.* The effect of lathyrogenic compounds on morphology and growth of cultured cells. — *Lab. Investig.*, 1968, vol. 19, N 1, p. 25—28.
 13. *Schuster G. S., McKinney R. V., Dirksen T. R., Butos S. E.* Effect of β -aminopropionitrile on lipid metabolism by bone cell cultures: biochemistry and morphology. — *Experimental Molecular Pathol.*, 1978, vol. 28, N 3, p. 267—278.
 14. *Speer D. P., Peacock E. E., jun., Chvapil M.* The use of large molecular weight compounds to produce local lathyrism in healing wounds. — *J. Surg. Research.*, 1975, vol. 19, N 3, p. 169—173.

*Л. И. Сушко, В. М. Шейбак, Г. З. Абакумов,
П. И. Лукиенко, А. Г. Мойсеенок*

Отдел регуляции обмена веществ АН БССР

СООТНОШЕНИЕ ФРАКЦИЙ КоА
И АКТИВНОСТЬ МОНООКСИГЕНАЗ
ЭНДОПЛАЗМАТИЧЕСКОГО РЕТИКУЛУМА
ПЕЧЕНИ ЖИВОТНЫХ
С ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫМ ГЕПАТИТОМ
ПРИ ВВЕДЕНИИ ПРОИЗВОДНЫХ
ПАНТОТЕНОВОЙ КИСЛОТЫ

В механизмах поражения клеточных структур печени CCl_4 существенное место занимает дезинтеграция мембранных образований, наблюдающаяся на ранних этапах поступления токсического вещества и проявляющаяся прежде всего в поражении мембран эндоплазматического ретикулума (ЭПР). Взаимодействие CCl_4 с терминальным акцептором микросомальных монооксигеназ — цитохромом P-450 — приводит как к образованию свободных радикалов, обуславливающих последующие гепатотоксические эффекты, так и к подавлению цитохром P-450-зависимой системы дезинтоксикации [1]. В числе патохимических нарушений, обусловленных CCl_4 , обнаруживают снижение внутриклеточного фонда короткоцепочечных ацилов (КоА) [8], образования и транспорта ацилированных производных КоА (т. е. реакций, связанных с образованием мембранных структур и энергии), в связи с чем подходы, направленные на увеличение фонда КоА при отравлении CCl_4 , получили известное распространение. В ряде работ показано защитное действие производных пантотеновой кислоты (ПК) при токсическом поражении печени [7, 13].

Представлялось целесообразным изучить характер изменений активности монооксигеназной системы метаболизма ксенобиотиков в микросомах печени животных с экспериментальным гепатитом, которым вводили предшественники биосинтеза КоА — 4'-фосфопантотенат кальция (ФПК) и пантетин (П), различным образом изменяющие соотношение ацилированных производных КоА в гепатоцитах [6].

МАТЕРИАЛ И МЕТОДИКА ИССЛЕДОВАНИЯ

Опыты проводили на беспородных белых крысах-самцах массой 180—200 г, содержащихся на стандартной диете. Экспериментальный гепатит вызывали путем пятикратного подкожного введения 1 мл/кг CCl_4 через день в виде 50%-ного раствора. Подопытным животным одновременно с CCl_4 в течение 10 дней под кожу инъецировали ФПК или П в дозе, эквивалентной 30 мг/кг пантотената кальция. Контрольным крысам вводили соответствующие количества физиологического раствора. Животных гильотинировали через 12 ч после заключительной дозы препаратов. В ткани печени определяли уровень общих КоА, КоА-SH и длинноцепочечных ацилов (ДЦА-КоА) после дифференциальной экстракции и последующего определения ферментативным методом в присутствии 2-оксоглутаратдегидрогеназы [17]. Микросомальную фракцию печени выделяли дифференциальным центрифугированием [3]. В ней спектрофотометрически определяли содержание цитохромов b_5 , P-450 и редуктаз [15]. О способности цитохрома P-450 связываться с субстратами судили по величине спектральных изменений фермент-субстратного комплекса ($\Delta O P_{\max}$) [10]. Скорость гидроксилирования субстратов I типа определяли по активности этилморфин-N-деметилазы (ЭМ-N-деметилаза) [14], II типа — анилин-p-гидроксилазы (Ан-p-гидроксилазы) [9]. Скорость перекисного окисления оценивали по образованию малонового диальдегида [1]. Экстракцию липидов микросомальной фракции проводили по модифицированной методике [2]. Количественное определение общих фосфолипидов и их фракций осуществляли по содержанию фосфора. Фракции фосфолипидов разделяли методом тонкослойной хроматографии [4]. Полученные величины выражали в мг на 100 г плотного осадка микросомальной фракции. Содержание белка в исследуемой системе определяли по методу Лоури с соавт. [11].

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

В подопытной группе животных, получавших CCl_4 , обнаружено достоверное снижение в печени содержания общего КоА. Поскольку уровень свободных КоА и ДЦА-КоА оставался в пределах нормы, вышеуказанное снижение обусловлено фракцией КоА. Соотношение ДЦА-КоА/общие КоА увеличилось с 0,31 у контрольных животных до 0,45 в группе животных, получавших CCl_4 . Введение ФПК, и в большей степени П, восстанавливало содержание общих КоА. При этом соотношение фракций кофермента нормализовалось (табл. 1).

Таблица 1

Структура фонда КоА в печени животных, получавших CCl_4 и производные ПК, мкмоль/кг ткани

Группа животных	Общие КоА	КоА-SH	ДЦА-КоА	$\frac{\text{ДЦА-КоА}}{\text{общие КоА}}$
Контроль	$376 \pm 26,6$	$113 \pm 6,6$	$118 \pm 5,5$	0,31
CCl_4	$256 \pm 13,7^*$	$101 \pm 5,2$	$115 \pm 5,4$	0,45
$\text{CCl}_4 + \text{ФПК}$	$328 \pm 26,5^{**}$	$95 \pm 8,1$	$102 \pm 10,9$	0,31
$\text{CCl}_4 + \text{П}$	$417 \pm 26,0^{**}$	$118 \pm 5,1$	$134 \pm 10,6$	0,32

* $p < 0,05$ относительно контрольной группы животных.** $p < 0,05$ относительно группы животных, получавших CCl_4 .

Из табл. 2 видно, что у животных с экспериментальным гепатитом содержание цитохрома Р-450 снизилось на 20,7%. Этот эффект хорошо коррелирует с падением активности ЭМ-N-деметилазы и Ан-п-гидроксилазы, а также способности данного гемопротенда связываться с анализируемыми субстратами. Компоненты НАДФ-N-цепи окисления практически не инактивируются CCl_4 . Показанное увеличение НАД-N-специфических редуктаз, полагают, связано с улучшением доступа субстратов к флавопротеиду в поврежденных мембранах [1]. У этих животных также отмечается снижение уровня общих липидов, фосфолипидов и холестерина, соответственно, на 21,0; 38,0 и 17,6%. Значительно снижается величина соотношения фосфатидилхолин/фосфатидилэтаноламин (рис. 1). В данном варианте постановки эксперимента оба типа перекисного окисления липидов существенно не изменялись. У животных, отравленных CCl_4 , курсовое введение ФПК еще более снижает содержание цитохрома Р-450 и его способность связываться с субстратами, хотя скорость гидроксилирования последних остается на прежнем уровне. У животных, получавших ФПК, нормализуется активность НАД-N-специфического флавопротеида. При введении в указанной дозе П содержание и активность ферментов монооксигеназной системы ЭПР остаются такими же, как у животных с поражением печени. Оба препарата нормализуют у подопытных животных уровень холестерина и соотношение фосфатидилхолин/фосфатидилэтаноламин за счет снижения уровня последнего. Оба использованных препарата ПК являются эффективными предшественниками биосинтеза КоА в гепатоцитах и в целом хорошо утилизируются ПК-метаболизирующими системами организма [5]. Очевидно, с действием этих соединений на структуру фонда КоА (см. табл. 1) во многом могут быть связаны их гепатопротекторные свойства при поражении печени CCl_4 . Это находит свое отражение прежде всего в нормализации

Функциональная активность монооксигеназной системы ЭПР печени крыс, получавших CCl_4 и производные ПК

Показатель	Контрольные животные	Животные, получавшие		
		CCl_4	CCl_4 +ФПК	CCl_4 +П
Цитохром P-450, $\mu\text{моль} \cdot \text{кг}^{-1}$	$0,87 \pm 0,10$	$0,69 \pm 0,06^*$	$0,49 \pm 0,05^{**}$	$0,67 \pm 0,07$
Цитохром b_5 , $\mu\text{моль} \cdot \text{кг}^{-1}$	$0,52 \pm 0,04$	$0,51 \pm 0,04$	$0,43 \pm 0,04$	$0,45 \pm 0,04$
ЭМ-N-деметилаза, $\mu\text{моль} \cdot \text{НСНО} \cdot \text{с}^{-1} / \text{кг}^{-1}$ белка	$68,5 \pm 6$	$38,8 \pm 4,8^*$	$34,3 \pm 6,1$	$40,3 \pm 4,5$
Ан-п-гидроксилаза, $\mu\text{моль}$ п-аминофенола $\cdot \text{с}^{-1} \cdot \text{кг}^{-1}$ белка	$13,16 \pm 2,6$	$9,00 \pm 1,6$	$11,5 \pm 3,0$	$10,3 \pm 1,5$
ЭМ-P-450, $\Delta\text{ОП}_{\text{манс}} \cdot \text{кг}^{-1}$ белка $\cdot 10^3$	$13,76 \pm 1,52$	$9,67 \pm 0,27^*$	$7,22 \pm 0,30^{**}$	$10,32 \pm 1,65$
АН-P-450, $\Delta\text{ОП}_{\text{манс}} \cdot \text{кг}^{-1}$ белка $\cdot 10^3$	$7,64 \pm 0,64$	$3,57 \pm 0,45^*$	$1,90 \pm 0,67^{**}$	—
НАДФ-N-цитохром с-редуктаза, $\mu\text{моль} \cdot \text{с}^{-1} \cdot \text{кг}^{-1}$ белка	$1,30 \pm 0,14$	$1,46 \pm 0,24$	$1,09 \pm 0,19$	$1,24 \pm 0,27$
НАДФ-N-нитротетразолий редуктаза, $\mu\text{моль} \cdot \text{с}^{-1} \cdot \text{кг}^{-1}$ белка	$0,37 \pm 0,05$	$0,39 \pm 0,09$	$0,36 \pm 0,05$	$0,32 \pm 0,04$
НАД-N-цитохром с-редуктаза, $\mu\text{моль} \cdot \text{с}^{-1} \cdot \text{кг}^{-1}$ белка	$7,08 \pm 1,39$	$17,45 \pm 1,43$	$16,77 \pm 3,19$	$13,76 \pm 2,85^{**}$
НАД-N-феррицианид-редуктаза, $\mu\text{моль} \cdot \text{с}^{-1} \cdot \text{кг}^{-1}$ белка	$43,12 \pm 9,22$	$54,46 \pm 4,67^*$	$36,24 \pm 7,50^{**}$	$45,23 \pm 7,55$

См. пояснение к табл. 1.

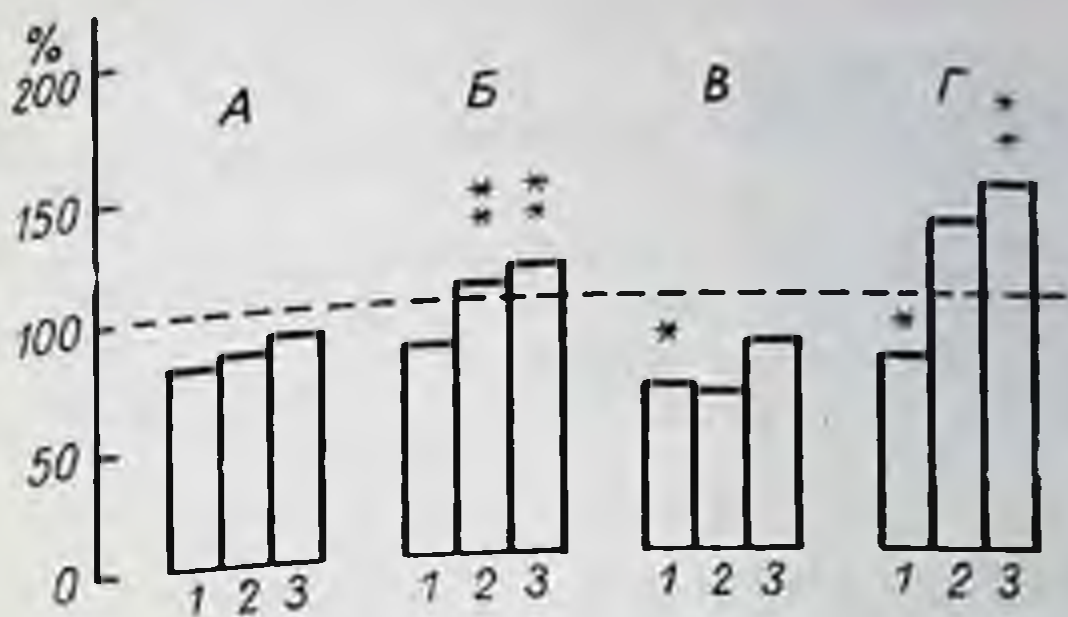


Рис. 1. Влияние ФПК и ПТ на содержание общих липидов, фосфолипидов, холестерина и соотношение фракций фосфатидилхолин/фосфатидилэтанол-амин в микросомах печени крыс, получавших CCl_4 .

Условные обозначения группы животных, получавших CCl_4 (1), CCl_4 и ФПК (2), CCl_4 и ПТ (3); А — общие липиды; Б — общие фосфолипиды; В — холестерин; Г — фосфатидилхолин/фосфатидилэтанол-амин.

* $p < 0,05$ относительно контрольной группы животных.
 ** $p < 0,005$ относительно группы животных, получавших CCl_4 .
 Интактный контроль принят за 100%.

липидного состава мембран ЭПР (см. рис. 1), в образовании компонентов которых столь велико значение реакций биосинтеза и транспорта ацилированных производных КоА [16].

Данные, представленные в табл. 2, свидетельствуют о том, что механизмы гепатопротекторной активности производных ПК не связаны с воздействием на монооксигеназную систему ЭПР со смешанной функцией. В известной мере это подтверждается отсутствием эффекта воздействия большей дозы (500 мг/кг) на уровень цитохрома Р-450 [12]. Полученное ухудшение показателей, связанных с гидроксилазной активностью микросом при введении животным ФПК, может быть связано с увеличением внутриклеточного содержания Ca^{++} , что, в свою очередь, приводит к повышению степени повреждения мембран гепатоцитов [18].

Таким образом, пятикратное введение CCl_4 в суммарной дозе 5 мл/кг приводит к снижению уровня общих КоА в печени преимущественно за счет фракций КоА. Одновременно наблюдается снижение величин показателей, характеризующих цитохром Р-450 и сопряженные с ним реакции гидроксилирования, а также уровня общих липидов, фосфолипидов, холестерина и соотношения фосфатидилхолин/фосфатидилэтанол-амин микросомальной фракции печени. Сочетанное введение CCl_4 и препаратов ПК в суммарной дозе, эквивалентной 300 мг/кг пантотената, предупреждает уменьшение количества общего КоА и нарушение соотношения фракций кофермента, а также нормализует содержание общих липидов и липидных фракций мембран ЭПР.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Владимиров Ю. А., Арчаков А. И. Перекисное окисление липидов в биологических мембранах. М., 1972. 252 с.
2. Виркели Дж., Броукхьюз Р. Методы анализа липидов мембран. — В кн.: Биохимическое исследование мембран. Пер. с англ. М., 1979, с. 242—243.
3. Карузина Н. И., Арчаков А. И. Выделение микросомальной фракции печени и характеристика ее окислительных систем. — В кн.: Современные методы в биохимии. М., 1977, с. 49—59.
4. Кейтс М. Техника липидологии. Пер. с англ. М., 1975. 215 с.
5. Мойсеенок А. Г. Основные пути обмена пантотеновой кислоты и ее производных в организме животных. — В кн.: Химия, биохимические фракции и применение пантотеновой кислоты. Тез. докл. Минск, 1977, с. 94.
6. Шейбак В. М. Сравнительная оценка влияния различных доз пантотената кальция, фосфопантотената кальция и пантетина на профиль КОА в печени крыс. — В кн.: Биохимия, фармакология и медицинское применение производных витаминов и других предшественников коферментов. Тез. докл. Иркутск, 1983, с. 148.
7. Aiyar A. S., Fallerpaker P., Sreemivasan A. Lipid metabolism in liver injury caused by carbon tetrachloride in the rat. — *Biochem. J.*, 1964, vol. 90, p. 558.
8. Kanematsu Y. Experimental studies on liver CoA. 2. Coenzyme A and pantothenic acid level in the liver of the rats treated with carbon tetrachloride, DL-ethionine or partially hepatoctomized. — *Jap. Arch. Intern. Med.*, 1966, vol. 13, p. 133—137.
9. Kato R., Gillette G. Effect of starvation on NADPH-dependent enzymes in liver microsomes of male and female rats. — *J. Pharmacol. Experimental Therapy*, 1965, vol. 150, p. 279—284.
10. Kato R., Takanaka A., Takahashi A. Effect of thyroid hormone on the substrate interaction with P-450 in the oxidation of drugs by liver microsomes. — *J. Biochem.*, 1970, vol. 68, p. 613—623.
11. Lowry O. H., Rosebrough N. J., Farr A. L., Randall R. J. Protein measurement with folin phenol reagent. — *J. Biol. Chem.*, 1951, vol. 193, p. 265—275.
12. Marisawa S., Kobajashi Y., Yamamoto S. Effects of pantethine on liver injures. — In: *Pantethine Symp. rep. (in Japanese)*. Tokio, 1978, p. 116—124.
13. Miyagawa F., Noguchi T. Effect of pantethine and chlorophylla to the fatty liver induced with carbon tetrachloride. — *St. Marianne Med. J.*, 1978, vol. 6, p. 379—388.
14. Nash T. The colorimetric estimation of formaldehyde by means of the hantzsch reaction. — *Biochem. J.*, 1953, vol. 55, p. 416—421.
15. Omura T., Sato R. The carbon monoxide-binding pigment of liver microsomes. — *J. Biol. Chem.*, 1964, vol. 23, p. 2378—2385.
16. Tubbs P. K., Garland P. B. Variations in tissue contents of coenzyme A thioesters and possible metabolic implications. — *Biochem. J.*, 1964, vol. 93, p. 550—556.
17. Williamson J. R., Corkey B. E. Assays of intermediates of the citric cycle and related compounds by fluometric enzyme methods. — In: *Methods in enzymology* / Ed. by J. M. Lowenstein. New York; London, 1967, vol. 13, p. 434—512.
18. Willis R. Y. Possible role of endogenous toxigenic lipids in the carbon tetrachloride poisoned hepatocyte. — *Fed. Proc.*, 1980, vol. 39, p. 31—34.



Рис. 1. Митохондрии гепатоцитов через 24 ч после введения АНТГ.

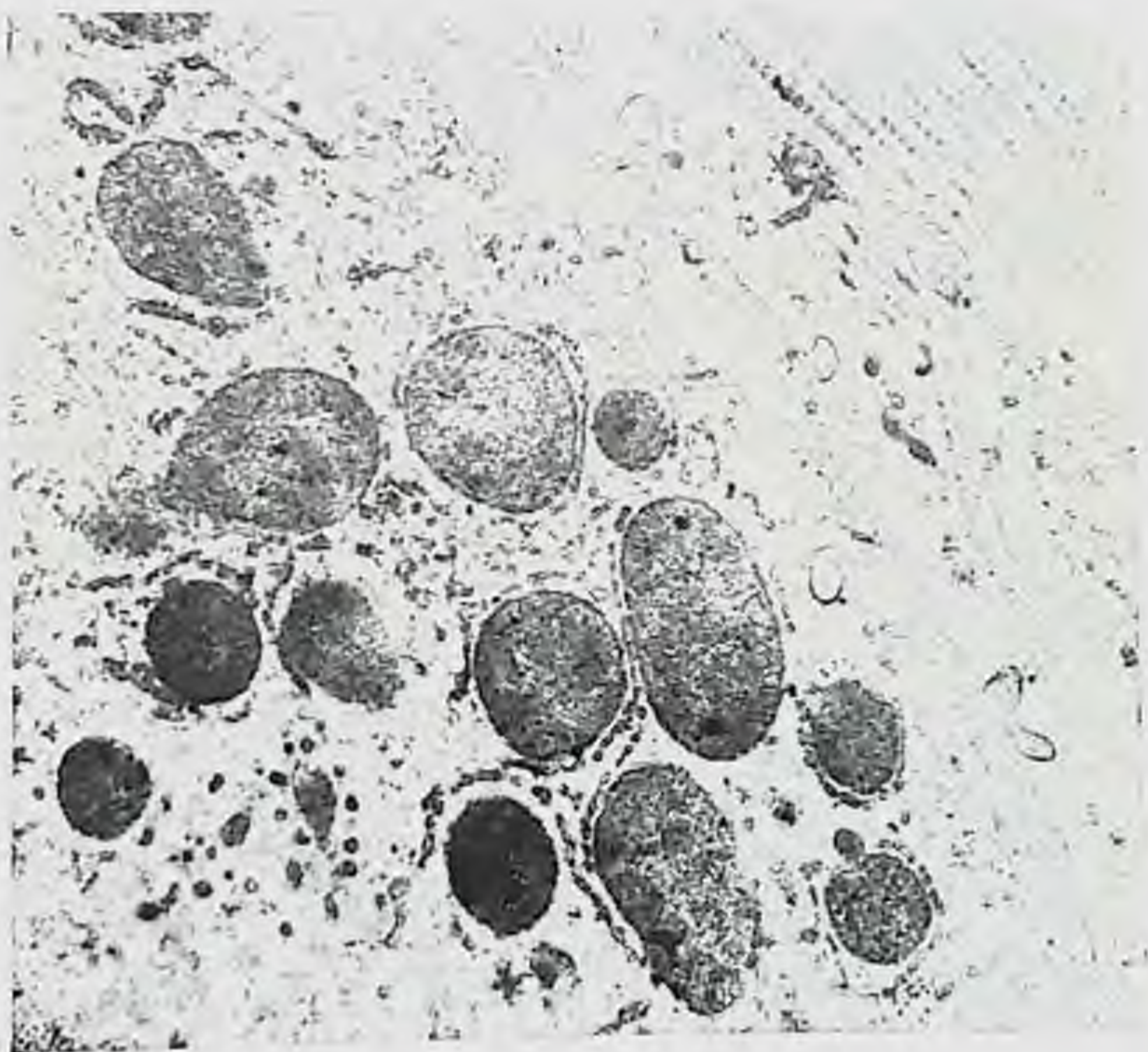
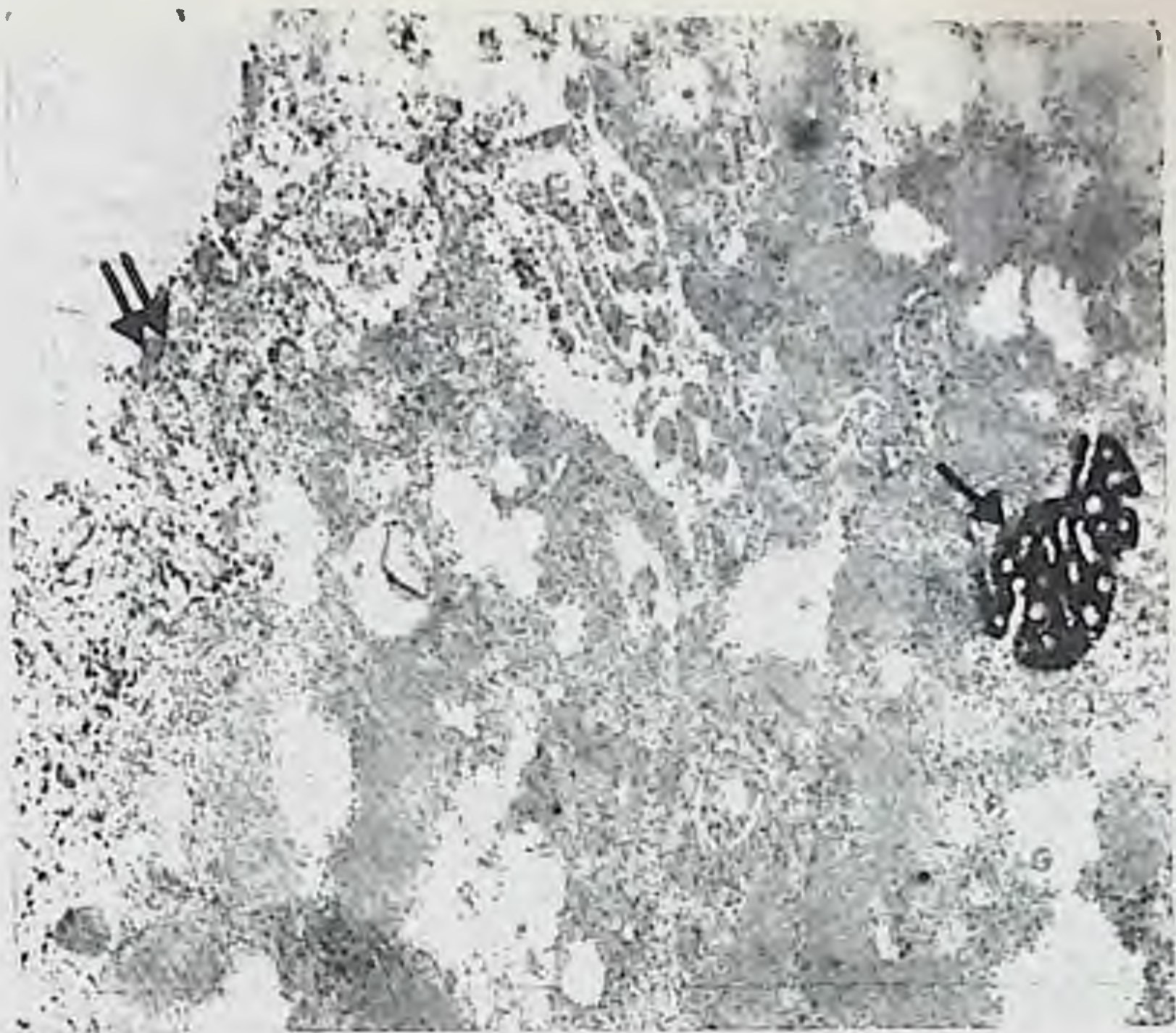
Электронно-плотный матрикс, извилистый контур наружной мембраны и ее выпячивание в виде пузырей (обозначены стрелками):
а — $\times 30\ 000$, *б* — $\times 63\ 000$.



Рис. I. Желчный капилляр с микроворсинками ЦПМ, широкой зоной эктоплазмы и многочисленными микрофиламентами. Видны контакты между гепатоцитами.

Рис. II. Электроно-гистохимическая реакция на АТФ цитоплазматической мембраны. Высокая активность Mg^{2+} -АТФ в микроворсинках ЦПМ желчного капилляра (↗) и более слабая активность в микроворсинках ЦПМ синусоидального полюса (↗↗).
×40 000.

Рис. III. Хронический гепатит. Уменьшение количества и длины микроворсинок ЦПМ на васкулярном полюсе гепатоцита. Фибриллы коллагеновых волокон в пространстве Дюссе.
×20 000.



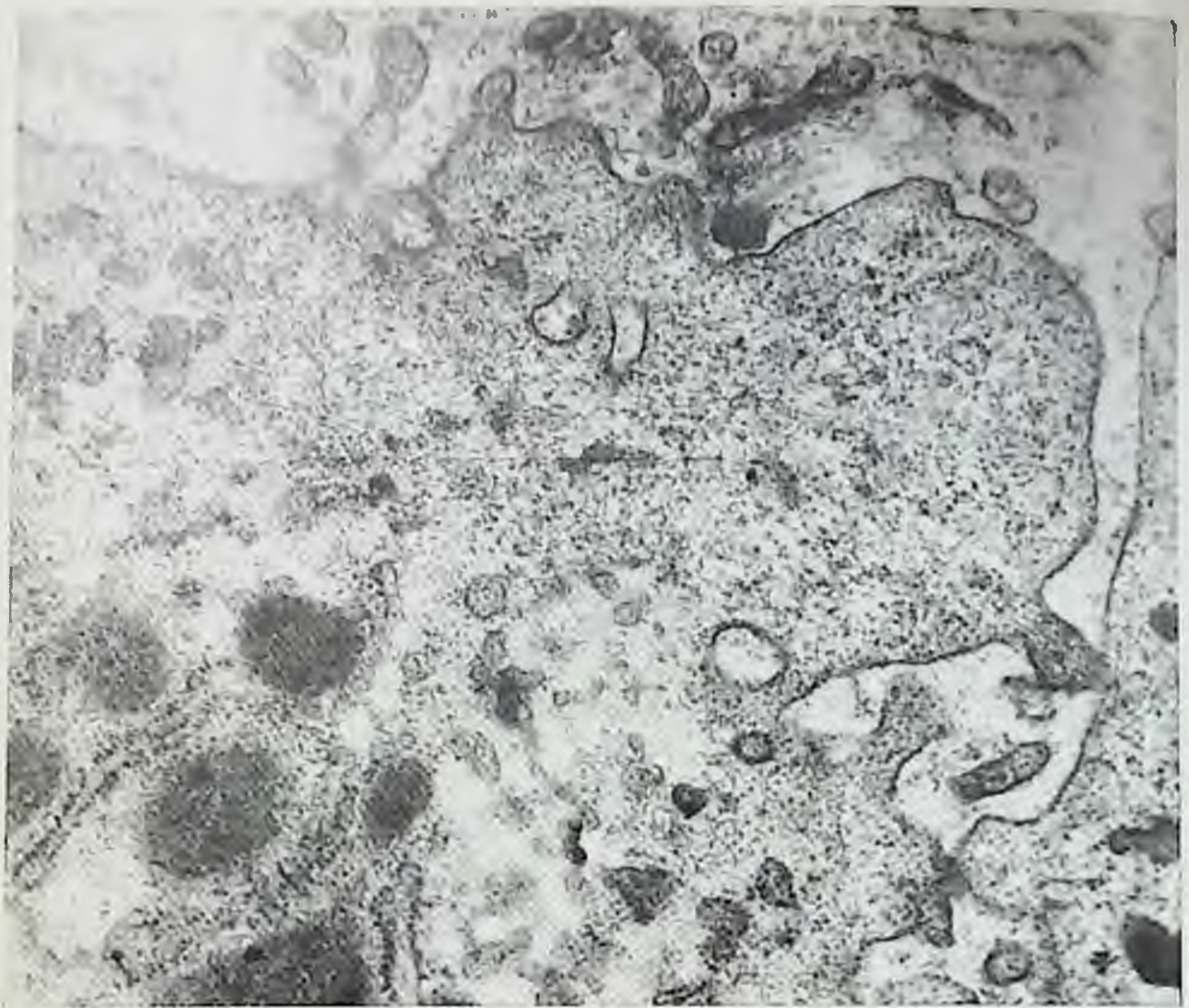


Рис. IV. Хронический гепатит. Синусоидальный полюс гепатоцита с сильно набухшей микроворсинкой ЦПМ. Видны инцитозные пузырьки.

×30 000.

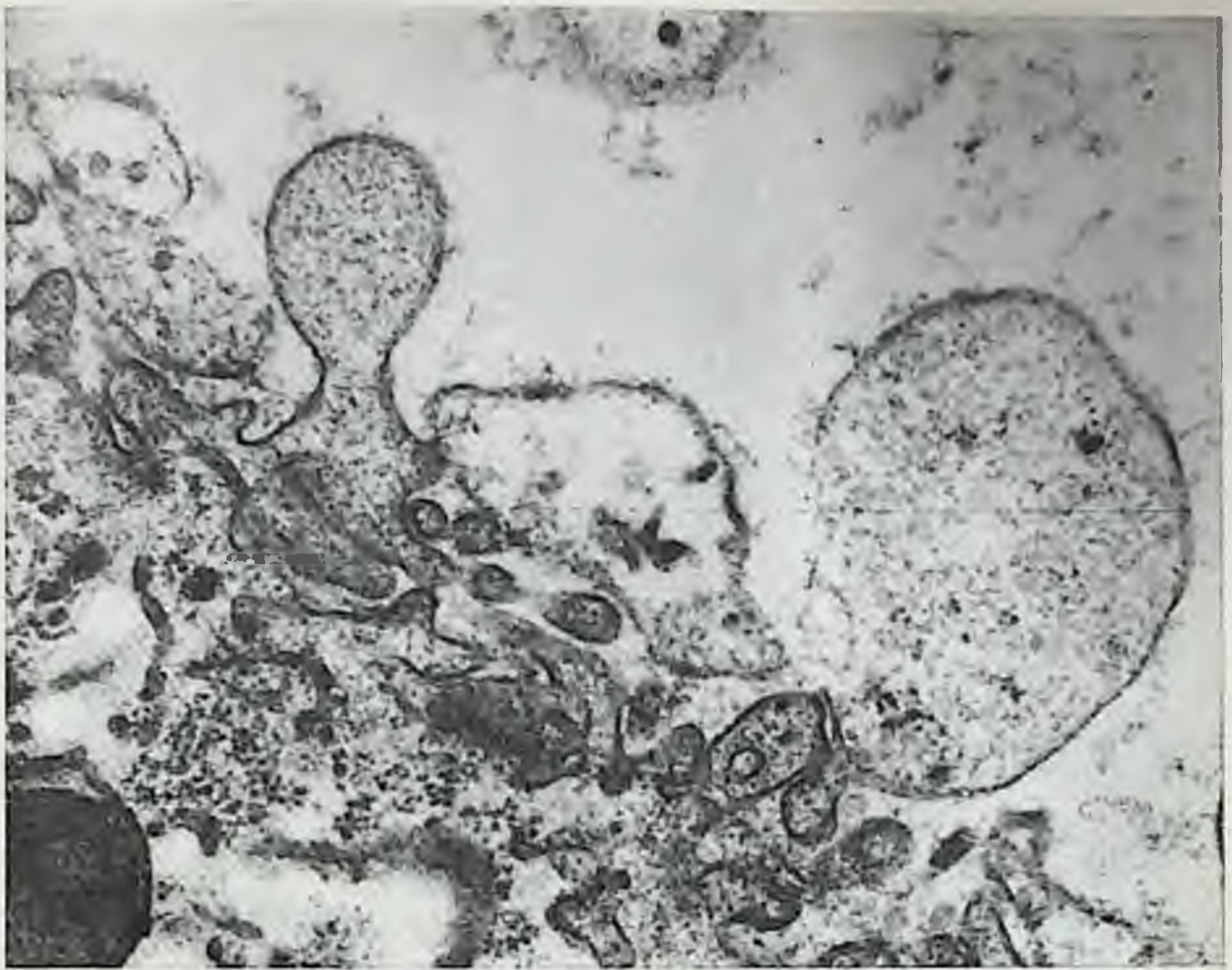


Рис. V. Хронический гепатит. Набухание и отрыв отдельных микроворсинок ЦПМ
васкулярного полюса гепатоцита.

Х30 000.

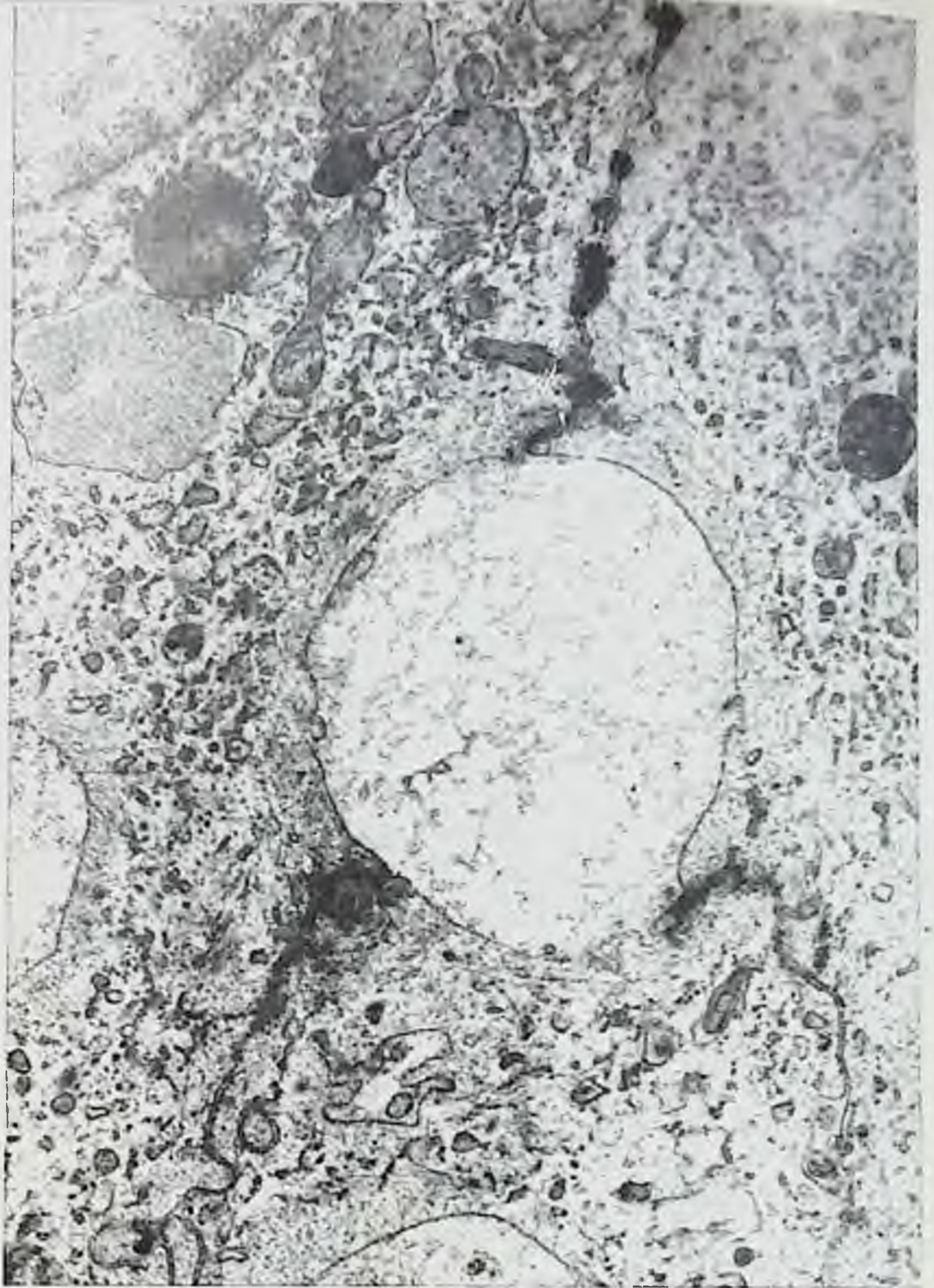


Рис. VI. Холестаз, индуцированный LX. Резко расширенный желчный капилляр с редуцированными микроворсинками через 2 сут после введения LX.

×20 000.



Рис. I. Макрофаги, содержащие темные глыбки. Оболочка цитоплазмы выражена пестрко.

Окраска азуром и эозином. Ув. 100×12.



Рис. II. Молодая клетка макрофага (слева вверху), имеющая гладкую оболочку, полностью наполнена темной субстанцией.

Окраска азуром и эозином. Ув. 100×12.



Рис. III. Фибриллярные структуры в цитоплазме крупных светлых клеток.
Окраска по Ван-Гизону. Ув. 10X15.



Рис. IV. Аргирофильные внутриклеточные фибриллярные структуры.
Импregnация по Фуку. Ув. 10X15.

СОДЕРЖАНИЕ

<i>Блюгер А. Ф., Майоре А. Я.</i> Биологическая мембрана — основная структура организации жизнедеятельности клетки (вместо предисловия)	5
I. Мембраны клеток печени	
<i>Варганова Е. И., Макарова Н. А., Майоре А. Я.</i> Структурно-функциональное состояние митохондрий гепатоцитов при внутрипеченочном холестазае у крыс	11
<i>Гедулина Б. Р.</i> Влияние ацетальдегидной интоксикации на содержание желчных кислот в ткани печени крыс	19
<i>Горштейн Э. С.</i> Соотношение содержания цитохрома Р-450 в микросомах печени с некоторыми биохимическими показателями сыворотки крови при экспериментальном гепатозогепатите и холестазае	26
<i>Дудник Л. Б., Майоре А. Я.</i> Гипербилирубинемия как фактор защиты липидов биологических мембран от перекисного окисления при остром вирусном гепатите и некоторых других патологических и физиологических состояниях	32
<i>Залцмане В. К.</i> Электроно-микроскопическое исследование цитоплазматической мембраны гепатоцита при патологии печени	39
<i>Котловский Ю. В., Бекерев В. Е., Иванов В. В.</i> Роль микросомальной системы печени в окислении и тиолопрививном эффекте акриламида	45
<i>Майоре А. Я., Копылова Т. Н., Кузнецова А. В.</i> Характеристика хемилюминесценции ткани печени крыс при интоксикации гепатотропными ядами	51
<i>Маргулис М. С., Квицинская Е. А., Сорокин Ю. А., Ткаченко Б. О., Инерман Т. Г.</i> Интенсивность перекисного окисления липидов и накопления молекул средней массы в ткани печени при ее консервации	58
<i>Элерте Д. Л., Майоре А. Я., Горштейн Э. С., Ремберга Л. А.</i> Перекисное окисление липидов в митохондриях печени крыс при отравлении некоторыми гепатотропными ядами	62
II. Мембраны клеток миокарда	
<i>Бауман В. Р., Киенкас И. А., Шелухина Б. К., Пупеле О. Я.</i> Лабильзация лизосомальных мембран миокарда при экспериментальной патологии сердца	71
<i>Корзан В. А., Гиргенсоне М. Я., Блума Р. К., Бауман В. Р.</i> Сдвиги биохимических функций клеточных мембран миокарда при глубокой гипотермии	76
<i>Утно Л. Я., Витолинь С. П.</i> Изменения в липидах мембран миокарда при глубокой гипотермии	81
III. Мембраны клеток крови	
<i>Векслер Х. М., Чарная Р. Г., Осна Н. А., Бачинская М. К.</i> Опыт выявления рецепторов мембран лимфоцитов крови к эндогенным антигенным препаратам и фармакологически активным веществам у больных вирусными гепатитами А и В	88
<i>Визбуле Л. Д., Дундуре Б. Л.</i> Способ выделения мембран эритроцитов крыс и определения активности АТФ-аз	93
<i>Гичев Ю. П., Хаснулин В. И.</i> Изменение показателей перекисного окисления и антиокислительной активности липидов при хронических поражениях печени	97

<i>Гольдштейн Н. И., Жемчугова Т. Л., Шинкаренко Л. И., Сондоре Л. А.</i> Изменения процесса перекисного окисления в условиях действия гипербарической оксигенации	101
<i>Скардс И. В., Райпулис Е. П.</i> Относительная концентрация миелопероксидазы в лейкоцитах и их осмотическая устойчивость	107
<i>Скардс И. В., Райпулис Е. П.</i> Снижение супероксиддисмутазной активности лейкоцитов в результате лабильзации мембран при их культивировании	113
<i>Сниедзе Т. Н., Васариня В. А.</i> Влияние некоторых гепатотоксических агентов на осмотическую резистентность эритроцитов крыс	119
<i>Сондоре В. Ю., Васариня В. А., Миеше И. Э., Андрусэ А. А., Лиелбриеде Э. Я., Крупникова Э. З.</i> Осмотические свойства мембран эритроцитов при острых и хронических заболеваниях печени	123

IV. Лечебные средства и мембраны клеток

<i>Одынец А. Г., Берзиня Д. А., Велена А. Х., Вуцина И. А., Краузе А. А., Дубур Г. Я., Кименис А. А.</i> Антиоксидантная и гепатопротекторная активность ряда 3,4-дигидропиридин-2-тионов и их структурных аналогов	127
<i>Пфафрод Л. Р., Слуцкий Л. И., Домбровска Л. Э., Амелин А. З., Капуцкий В. Е.</i> Влияние локальной аппликации остеолатирогена на полимерной основе на цитологические и биохимические показатели грануляционно-фиброзной ткани	134
<i>Сушко Л. И., Шейбак В. М., Абакумов Г. З., Лукиенко П. И., Мойсеев А. Г.</i> Соотношение фракций КоА и активность монооксигеназ эндоплазматического ретикулума печени животных с экспериментальным гепатитом при введении производных пантотеновой кислоты	139

Вкладка на мелованной бумаге между с. 144 и 145.

БИОЛОГИЧЕСКИЕ МЕМБРАНЫ И ПАТОЛОГИЯ КЛЕТКИ

Редактор *Т. Лутьянова*. Художник *С. Витола*. Художественный редактор *И. Егерс*.
Технический редактор *Э. Грике*. Корректор *И. Лебедева*.

ИБ № 2500

Сдано в набор 31. 10. 85. Подписано в печать 17. 06. 86. ЯТ 13611. Формат 60×90/16. Бумага типогр. № 1. Гарнитура литературная. Печать высокая. 10,5 физ. печ. л.; 10,5 усл. печ. л.; 10,88 усл. кр.-отт.; 9,36 уч.-изд. л. Тираж 800 экз. Заказ № 3188. Цена 65 к. Издательство «Зинатне», 226530 ГСП Рига, ул. Тургенева, 19. Отпечатано в производственном объединении «Полиграфистс» Государственного комитета Латвийской ССР по делам издательств, полиграфии и книжной торговли, 226050 Рига, ул. Горького, 6.

УДК 611.36—018.11:616.36—008.811.5

Варгаинова Е. И., Макарова Н. А., Майоре А. Я. Структурно-функциональное состояние митохондрий гепатоцитов при внутрипеченочном холестазае у крыс. — В кн.: Биологические мембраны и патология клетки. Рига: Зинатне, 1986, с. 11—18.

Исследования ультраструктуры и биохимических показателей функционального состояния и энергетической функции митохондрий гепатоцитов (процессов набухания, активного транспорта кальция, активности сукцинат-дегидрогеназы и Mg^{2+} -АТФ-азы) при внутрипеченочном холестазае, вызванном интоксикацией их α -нафтилизотиоцианатом, показали, что при развитии и в разгар умеренного холестаза, обусловленного однократным введением указанного яда в дозе 100 мг/кг массы, происходят сдвиги в энергетическом состоянии митохондрий, а именно наблюдается переход из высокоэнергетического состояния органелл в низкоэнергетическое, который, очевидно, является важным физиологическим звеном в регуляции метаболизма митохондрий гепатоцитов при застое желчи.

Ил. 1, табл. 2, библиогр. 30 назв.

УДК 616.36—099:612.357.15

Гедилина Б. Р. Влияние ацетальдегидной интоксикации на содержание желчных кислот в ткани печени крыс. — В кн.: Биологические мембраны и патология клетки. Рига: Зинатне, 1986, с. 19—25.

В экспериментах на белых крысах линии Вистар выявлено, что токсическое действие ацетальдегида при введении его интактным животным и на фоне хронического введения этанола вызывает значительное увеличение общего количества желчных кислот в ткани печени и сыворотке крови за счет относительно большего повышения содержания дигидроксихолановых кислот. Наиболее выраженные изменения выявлены при введении ацетальдегида на фоне длительного хронического приема этанола. Полученные результаты свидетельствуют о важной роли ацетальдегида в патогенезе поражений печени алкогольной этиологии.

Ил. 2, табл. 1, библиогр. 16 назв.

УДК 616.36—002—008.811.5—092.18:612.35.015.11:612.12

Горштейн Э. С. Соотношение содержания цитохрома Р-450 в микросомах печени с некоторыми биохимическими показателями сыворотки крови при экспериментальном гепатозогепатите и холестазае. — В кн.: Биологические мембраны и патология клетки. Рига: Зинатне, 1986, с. 26—31.

Изменение содержания цитохрома Р-450 в микросомах печени крыс коррелирует с биохимическими признаками холестаза, вызванного α -нафтилизотиоцианатом. Падение концентрации цитохрома Р-450 при поражении крыс CCl_4 происходит на фоне неизменной активности щелочной фосфатазы и содержания билирубина в сыворотке крови, однако оно совпадает по времени с максимальным повышением активности АЛТ.

Снижение содержания цитохрома Р-450 может быть чувствительной реакцией микросомальной монооксигеназы на прямое действие ядов и их метаболитов и может явиться следствием развития синдромов цитолиза и холестаза.

Ил. 2, библиогр. 15 назв.

Дудник Л. Б., Майоре А. Я. Гипербилирубинемия как фактор защиты липидов биологических мембран от перекисного окисления при остром вирусном гепатите и некоторых других патологических и физиологических состояниях. — В кн.: Биологические мембраны и патология клетки. Рига: Зинатне, 1986, с. 32—38.

Приведен обзор литературных данных о роли билирубина в регуляции интенсивности перекисного окисления липидов биологических мембран. Исследована взаимосвязь параметров перекисного окисления липидов (уровня диеновых конъюгатов и антиокислительной активности липидов) с содержанием билирубина в сыворотке крови больных острым вирусным гепатитом и степенью тяжести заболевания. Между содержанием диеновых конъюгатов в липидах и уровнем билирубина существует обратная корреляция, а между антиокислительной активностью липидов и билирубином — прямая корреляция. С нарастанием степени тяжести заболевания степень окисленности липидов снижается, а антиокислительная активность повышается. Обсуждается возможная роль гипербилирубинемии в процессах репаративной регенерации при вирусном гепатите.

Ил. 2, табл. 1, библиогр. 11 назв.

Залцмане В. К. Электронно-микроскопическое исследование цитоплазматической мембраны гепатоцита при патологии печени. — В кн.: Биологические мембраны и патология клетки. Рига: Зинатне, 1986, с. 39—44.

При использовании биопсийного материала печени больных и ткани печени экспериментальных животных выяснены конкретные ультраструктурные признаки изменений цитоплазматической мембраны (ЦПМ) гепатоцитов в условиях патологии. Электронно-микроскопическое исследование ЦПМ гепатоцитов в норме, при острых и хронических заболеваниях печени и холестазах различного генеза показало, что большинство изменений ЦПМ гепатоцитов имеет компенсаторно-приспособительный характер.

Ил. 6, библиогр. 5 назв.

Котловский Ю. В., Бекерев В. Е., Иванов В. В. Роль микросомальной системы печени в окислении и тиолопрививном эффекте акриламида. — В кн.: Биологические мембраны и патология клетки. Рига: Зинатне, 1986, с. 45—50.

Акриламид (АА) при взаимодействии с микросомами печени крыс образует спектральный комплекс I типа с максимумом поглощения при длине волны 385 нм и минимумом — при 418 нм.

В опытах на изолированных микросомах печени крыс АА вызывает ингибирование N-деметилирования диметиланилина, аминопиррина по конкурентному типу и 3,4-бензпирена — по смешанному.

Тиолопрививной эффект АА снижается на 50% в результате обработки микросом моноокисью углерода, но не изменяется на фоне ионола и ЭДТА. Под влиянием АА не происходит изменений НАДФН и аскорбатзависимого ПОЛ в постмитохондриальной надосадочной жидкости печени крыс.

Ил. 1; табл. 3, библиогр. 15 назв.

УДК 612.354:611.36—018:612.014—445

Майоре А. Я., Копылова Т. П., Кузнецова А. В. Характеристика хемилюминесценции ткани печени крыс при интоксикации гепатотропными ядами. — В кн.: Биологические мембраны и патология клетки. Рига: Зинатне, 1986, с. 51—57.

В экспериментах на белых крысах-самцах линии Вистар исследовали иницированную ионами Fe^{2+} хемилюминесценцию гомогенатов ткани печени при однократной интоксикации такими гепатотропными ядами, как четыреххлористый углерод, этанол, солянокислый гидразин, α -нафтиллизотиоцианат, а также после двухмесячного введения этанола и четыреххлористого углерода. При использовании в качестве показателей максимальной амплитуды «быстрой» и «медленной» вспышек и ее I_{ga} получена информация о содержании в печени гидроперекисей липидов, способности липидов к перекисному окислению их и скорости окисления липидов. Установлено, что после однократного введения яда параметры хемилюминесценции ткани печени изменяются сильнее, чем при длительной интоксикации, причем они существенно различаются в зависимости от типа патологических процессов.

Табл. 4, библиогр. 18 назв.

УДК 577.125.2:612.35—085

Маргулис М. С., Квицинская Е. А., Сорокин Ю. А. и др. Интенсивность перекисного окисления липидов и накопления молекул средней массы в ткани печени при ее консервации. — В кн.: Биологические мембраны и патология клетки. Рига: Зинатне 1986, с. 58—61.

Исследования взаимосвязи между накоплением молекул средней массы и интенсивностью перекисного окисления липидов (ПОЛ) в ткани печени при ее консервации и последующей двухчасовой нормотермической изолированной перфузии показали, что в период резкого угнетения процессов ПОЛ отмечается увеличение в ткани печени количества молекул средней массы. Такая зависимость выявлена в период восстановления в консервированном органе кровообращения.

Полученные данные позволяют заключить, что накопление в ткани печени значительного количества молекул средней массы на фоне угнетения процессов ПОЛ ниже исходного уровня, необходимого для нормального функционирования клетки, свидетельствует о необходимости применения для защиты органа препаратов, препятствующих развитию наблюдаемого эффекта.

Табл. 1, библиогр. 15 назв.

УДК 577.125.2:576.311.347:612.354

Элерте Д. Л., Майоре А. Я., Горштейн Э. С., Ремберга Л. А. Перекисное окисление липидов в митохондриях печени крыс при отравлении некоторыми гепатотропными ядами. — В кн.: Биологические мембраны и патология клетки. Рига: Зинатне, 1986, с. 62—70.

Определение содержания конъюгированных диенов в динамике поражения печени крыс линии Вистар при интоксикации их некоторыми гепатотропными ядами показало, что при отравлении четыреххлористым углеродом и гидразином уровень конъюгированных диенов повышается через 24 ч, при отравлении аллиловым спиртом и α -нафтиллизотиоцианатом усиление перекисного окисления липидов наблюдается через 72 ч после введения яда. Интоксикация этанолом не сопровождается изменением уровня конъюгированных диенов в митохондриях печени.

Табл. 5, библиогр. 37 назв.

УДК 617.127:576.311.34

Бауман В. Р., Киенкас И. А., Шелухина Б. К., Пупеле О. Я. Лабильность лизосомальных мембран миокарда при экспериментальной патологии сердца. — В кн.: Биологические мембраны и патология клетки. Рига: Зинатне, 1986, с. 71—75.

Экспериментальные исследования влияния различных внешних и внутренних факторов на функции лизосом и целостность лизосомальных мембран миокарда крысы при экспериментальной патологии сердца показали, что в первые часы поражения миокарда повышаются свободная, общая и связанная с частицами активность лизосомальных ферментов. В то же время сдвиги латентности лизосом не соответствуют глубине поражения. Вопросы механизмов, вызывающих лабильность лизосомальных мембран миокарда, требует дальнейшего исследования.

Табл. 2, библиогр. 17 назв.

УДК 616.127:612.173.1:576.311.34

Корзан В. А., Гиргенсоне М. Я., Блума Р. К., Бауман В. Р. Сдвиги биохимических функций клеточных мембран миокарда при глубокой гипотермии. — В кн.: Биохимические мембраны и патология клетки. Рига: Зинатне, 1986, с. 76—80.

Изучение влияния глубокой гипотермии на функцию клеточных мембран показало, что при гипотермии наблюдается снижение уровня АТФ в миокарде и повышение активности лизосомальных ферментов. Изменения в ядрах и структурных ферментах митохондрий менее выражены. В крови появляется сердечная изоферментная форма креатинфосфокиназы, свидетельствующая о нарушениях целостности цитоплазматической мембраны клеток миокарда. Очевидно, снижение уровня АТФ в клетке и непосредственное отрицательное влияние охлаждения на цитоплазматическую мембрану могут быть главными причинами, вызывающими поражение миокарда в кардиохирургии с применением глубокой гипотермии.

Ил. 1, табл. 1, библиогр. 17 назв.

УДК 613.172.014.2.015.32:612.592

Утно Л. Я., Витолинь С. П. Изменения в липидах мембран миокарда при глубокой гипотермии. — В кн.: Биологические мембраны и патология клетки. Рига: Зинатне, 1986, с. 81—87.

При исследовании влияния глубокой гипотермии на изменение фосфолипидного состава, содержания липидов, холестерина и холестеридов миокарда обнаружено, что в условиях глубокой гипотермии в миокарде повышается общее содержание липидов, фосфолипидов и снижается концентрация общего холестерина и холестеридов, а также изменяется соотношение отдельных фосфолипидов с увеличением доли легкоокисляющихся фракций.

Ил. 1, табл. 2, библиогр. 11 назв.

УДК 612.112.94; 612.017.11; 612—002.17

Векслер Х. М., Чарния Р. Г., Осна Н. А., Бачинская М. К. Опыт выявления рецепторов мембран лимфоцитов крови к эндогенным антигенным препаратам и фармакологически активным веществам у больных вирусными гепатитами А и В. — В кн.: Биологические мембраны и патология клетки. Рига: Зинатне, 1986, с. 88—92.

При исследовании наличия рецепторов на мембране лимфоцитов крови к антигенам гетерологичных (бараны, мыши) и аутологичных эритроцитов у 272 больных вирусным гепатитом А и В установлено, что преимущественно при легкой форме вирусного гепатита В отмечается недостаточность

мобилизации интерлейкин-2-чувствительных ауторозеткообразующих Т-клеток, генерирующих эффекторное звено иммунного ответа организма больных, а также перенести повышение содержания Е-РОК, несущих геофилиновую клетку Т-клеток-супрессоров крови. Указанные критерии могут служить дополнительными тестами для определения тяжести течения процесса.

Табл. 2, библиогр. 12 назв.

УДК 576.314—086:612.111:577.121.7

Визбуле Л. Д., Дундуре Б. Л. Способ выделения мембран эритроцитов крыс и определения активности АТФ-аз. — В кн.: Биологические мембраны и патология клетки. Рига: Зинатне, 1986, с. 93—96.

Разработан новый способ выделения мембран эритроцитов крыс. Лейкоциты отделяют от мембран эритроцитов фракционированным центрифугированием, что позволяет полностью избавиться от примесей лейкоцитов. При определении активности АТФ-аз была снижена концентрация субстрата АТФ, что позволило получить оптимальные значения оптической плотности для контрольных и опытных проб.

Ил. 1, библиогр. 10 назв.

УДК 616.36—002.2:612.15.11

Гичев Ю. П., Хаснулин В. И. Изменение показателей перекисного окисления и антиокислительной активности липидов при хронических поражениях печени. — В кн.: Биологические мембраны и патология клетки. Рига: Зинатне, 1986, с. 97—100.

При обследовании 91 больного хроническими поражениями печени (синдром Жильбера, хронические гепатиты и циррозы) было изучено состояние процессов перекисного окисления и антиокислительной активности липидов (ПОЛ и АОА) эритроцитарных мембран. Показатели активности ПОЛ увеличиваются по мере нарастания выраженности структурных и функциональных повреждений печени, показатели защитной системы АОА липидов снижаются параллельно повышению значений ПОЛ. По-видимому, активация процессов ПОЛ может играть определенную патогенетическую роль при развитии хронических поражений печени.

Табл. 1, библиогр. 16 назв.

УДК 577.125.33:615.836

Гольдштейн Н. И., Жемчугова Т. Л., Шинкаренко Л. И., Сондоре А. А. Изменения процесса перекисного окисления в условиях действия гипербарической оксигенации. — В кн.: Биологические мембраны и патология клетки. Рига: Зинатне, 1986, с. 101—106.

В целях изучения роли свободнорадикального окисления в патогенезе кислородной интоксикации исследовали перекисное окисление липидов (ПОЛ) мембран эритроцитов периферической крови людей, проходивших курс гипербарической оксигенации. Исследования показали, что воздействие терапевтическими дозами гипербарического кислорода приводит к усилению ПОЛ и компенсаторной активации антиокислительных систем. Активация ПОЛ отмечена также в условиях модельных экспериментов. В изученном диапазоне от 1 до 5 ата наблюдается зависимость от дозы и времени сатурации развитие перекисного процесса.

На основании полученных данных сделано заключение о связи токсического действия гипербарического кислорода с процессами ПОЛ.

Ил. 2, табл. 1, библиогр. 15 назв.

УДК 612.112:577.158.52

Скардс И. В., Райнулс Е. П. Относительная концентрация миелопероксидазы в лейкоцитах и их осмотическая устойчивость. — В кн.: Биологические мембраны и патология клетки. Рига: Зинатне, 1986, с. 107—112.

Для установления количества миелопероксидазы (МПО) в лейкоцитарном материале, полученном путем осмотического шока, можно использовать спектрофотометрическое определение поглощения света исследуемыми клетками. Изучение концентрации МПО в зависимости от осмотической устойчивости лейкоцитов показало, что с увеличением количества МПО снижается осмотическая устойчивость лейкоцитов, что свидетельствует о лабильности клеточных мембран.

Ил. 3, библиогр. 11 назв.

УДК 612.112:577.158.7

Скардс И. В., Райнулс Е. П. Снижение супероксиддисмутазной активности лейкоцитов в результате лабильности мембран при их культивировании. — В кн.: Биологические мембраны и патология клетки. Рига: Зинатне, 1986, с. 113—118.

Исследование показало, что при культивировании лейкоцитов клетки быстро теряют супероксиддисмутазу (СОД), гораздо быстрее, чем лактатдегидрогеназу (ЛДГ) и каталазу. На основе закономерностей параллельного снижения активности СОД и чувствительности клеток к интерферону выдвинута гипотеза, с помощью которой можно объяснить усиление продуцирования вируса лейкоза коров при культивировании лейкоцитов коров, больных лимфолейкозом.

Ил. 3, табл. 1, библиогр. 12 назв.

УДК 616.36—099:612.111.17

Сниедзе Т. Н., Васариня В. А. Влияние некоторых гепатотоксических агентов на осмотическую резистентность эритроцитов крыс. — В кн.: Биологические мембраны и патология клетки. Рига: Зинатне, 1986, с. 119—122.

Изучение влияния α -нафтилизотиоцианата и CCl_4 на гемолиз эритроцитов крыс в динамике через 1, 2, 3, 4, 5 и 6 сут после однократного введения ядов показало, что данные гепатотоксины повышают осмотическую резистентность эритроцитов в гипотоническом растворе хлористого натрия.

Табл. 1, библиогр. 17 назв.

УДК 616.155.18:616.36

Сондоре В. Ю., Васариня В. А., Миезе И. Э. и др. Осмотические свойства мембран эритроцитов при острых хронических заболеваниях печени. — В кн.: Биологические мембраны и патология клетки. Рига: Зинатне, 1986, с. 123—126.

При изучении осмотической резистентности эритроцитов в гипотоническом растворе хлористого натрия и глюкозы у больных острым вирусным гепатитом и хроническими поражениями печени была установлена высокая осмотическая стойкость эритроцитов у больных острым вирусным гепатитом в разгар заболевания и суб- и декомпенсированным циррозом печени, низкая — при синдроме Жильбера и жировом гепатозе, что объясняется изменениями содержания липидов в мембранах эритроцитов. Обсуждается роль изменения физико-химических свойств мембран эритроцитов в возникновении гипоксии в ткани печени при различных ее поражениях.

Табл. 1, библиогр. 12 назв.

Одынец А. Г., Берзиня Д. А., Велена А. Х. и др. Антиоксидантная и гепатопротекторная активность ряда 3,4-дигидропиридин-2-тионов и их структурных аналогов. — В кн.: Биологические мембраны и патология клетки. Рига: Зинатне, 1986, с. 127—133.

На модельной системе перекисного окисления липидов (ПОЛ) в липосомах фосфатидилхолина изучали антиоксидантную активность соединений. Гепатопротекторную активность исследовали на модели поражения печени крыс CCl_4 .

Показано, что производные 3,4-дигидропиридин-2-тиона проявляют антиоксидантную активность как в липосомах при инициации ПОЛ метгемоглобином, так и в микросомах печени крыс в присутствии CCl_4 . Однако гепатопротекторный эффект этих соединений выражен слабо.

Табл. 4, библиогр. 14 назв.

УДК 615.275:615.454:616—001.4

Пфафрод Л. Р., Слуцкий Л. И., Домбровска Л. Э. и др. Влияние локальной аппликации остеолатирогена на полимерной основе на цитологические и биохимические показатели грануляционно-фиброзной ткани. — В кн.: Биологические мембраны и патология клетки. Рига: Зинатне, 1986, с. 134—138.

Остеолатирогенный препарат семикарбазид, присоединенный к рассасываемому в тканях полимеру — модифицированной целлюлозе, оказывает локальное влияние на грануляционно-фиброзную ткань раневых дефектов. Это влияние проявляется на клеточном уровне, в частности, в интенсификации макрофагальной реакции. В макрофагах найдены своеобразные включения, по ряду признаков напоминающие фрагменты коллагеновых фибрилл.

Ил. 4, табл. 2, библиогр. 14 назв.

УДК 616.36—002:577.15:577.16

Сушко Л. И., Шейбак В. М., Абакумов Г. З. и др. Соотношение фракций КоА и активность монооксигеназ эндоплазматического ретикулума печени животных с экспериментальным гепатитом при введении производных пантотеновой кислоты. — В кн.: Биологические мембраны и патология клетки. Рига: Зинатне, 1986, с. 139—144.

Крысам-самцам с экспериментальным гепатитом, вызванным введением CCl_4 в суммарной дозе 5 мл/кг, одновременно в течение 10 дней инъекцировали производные пантотеновой кислоты — фосфопантотенат кальция и пантетин. Используемые препараты в суммарной дозе 300 мг/кг эквимолярно пантотенату предупреждают изменение структуры фонда КоА в гепатоцитах, а также нарушение уровня общих липидов, фосфолипидов, холестерина и соотношения фосфатидилхолин/фосфатидилэтаноламин в липидной фракции мембран эндоплазматического ретикулума. Механизмы гепатопротекторной активности производных пантотеновой кислоты не связаны с воздействием на монооксигеназную систему микросомальной фракции печени животных.

Ил. 1, табл. 2, библиогр. 18 назв.

65 коп.

В серии «Экспериментальная медицина» вышли в свет сборники:
УЛЬТРАСТРУКТУРНАЯ ПАТОЛОГИЯ ПЕЧЕНИ. 1984, 154 с.,
цена 1 р. 50 к.

В сборнике дан анализ актуальных проблем ультраструктурной патологии печени, приведена характеристика ультраструктурных компонентов ядер гепатоцитов при частичной гепатэктомии, а также в условиях низких температур. Показано формирование внутриядерных включений при заболеваниях печени, обсуждается степень их диагностической ценности. Отражены новейшие данные об изменениях ультраструктур гепатоцитов печени в различных экспериментальных условиях. Приведены результаты электронно-микроскопических исследований печени при нарушении оттока желчи, дана характеристика ультраструктуры звездчатых эндотелиоцитов при регенерации и поражении тетрахлорметаном, рассказано об использовании методов электронной гистохимии, электронной гистоавторадиографии и морфометрии.

ИЗУЧЕНИЕ И МОДЕЛИРОВАНИЕ ИНФЕКЦИОННОГО ПРОЦЕССА. 1984, 163 с., цена 75 к.

Сборник посвящен применению при различных инфекционных процессах новых иммунологических методов исследования, в частности характеризующих состояние клеточного иммунитета, динамику содержания антигенов, «серологических маркеров» возбудителя в крови и других биологических субстратах. Анализируются результаты применения в клинике инфекционных болезней и в эксперименте ряда современных биохимических методов исследования, приводятся данные экспериментального и клинического изучения воздействия на структуру и функции органов и систем организма некоторых препаратов, используемых в лечебных целях в клинике инфекционных болезней. Представлены материалы по новейшим параклиническим методам диагностики ряда инфекционных заболеваний.

Заказы просим направлять по адресу:

226001 Рига, ул. Ф. Энгельса, 15, магазин «Научная книга».