

5. Нарциссов Р. Н. Применение н-нитротетразолия фиолетового для количественной цитохимии дегидрогеназ лимфоцитов человека. — *Арх. патологии*, 1969, № 5, с. 85—88.
6. Поташов Л. В., Чеминава Р. В. Ультрафиолетовое облучение собственной крови. — *Вестн. хирургии*, 1982, № 6, с. 130—134.
7. Ходанова Р. Н. Способ лечения аллергических заболеваний. Авт. свидетельство СССР № 741877. — *Бюл. изобрет.*, 1980, № 23.
8. Шахтмейстер И. Я., Зудин Б. И. и др. Способ повышения иммунологической реактивности организма (его варианты). Авт. свидетельство СССР № 923550. — *Бюл. изобрет.*, 1982, № 16.
9. Barling P. M. et al. The isolation and characterization of lysozyme from human foetal membranes comparison with the enzyme from other sources. — *Comp. Biochem. a. Physiol.*, 1985, B. 81. № 2, p. 509—511.
10. Lacey J. K. et al. An appraisal of the nitroblue tetrazolium reduction test. — *Amer. Journ. Med.*, 1975, v. 58, p. 685—696.
11. Park B. H. The use and limitations of the nitroblue tetrazolium test as a diagnostic acid. — *Journ. Pediatr.*, 1971, v. 78, p. 376—378.
12. Shore A. et al. Induction and separation of antigen-dependent T-helper and T-suppressor cells in men. — *Nature (London)*, 1978, v. 274, p. 586—587.

*Рекомендована Институтом иммунологии Министерства здравоохранения СССР. Поступила 19 ноября 1986 г.*

УДК 616.36-003.93-099:577.161.2.011

БИОХИМИЯ

## **ДЕЙСТВИЕ ЦИТОПЛАЗМАТИЧЕСКИХ ФАКТОРОВ ИЗ РЕГЕНЕРИРУЮЩЕЙ ПЕЧЕНИ НА ЭТЕРИФИКАЦИЮ ХОЛЕСТЕРИНА В СЫВОРОТКЕ КРОВИ КРЫС ПРИ ПОВРЕЖДЕНИИ ПЕЧЕНИ ТЕТРАХЛОРМЕТАНОМ**

*Н. Ю. Коневалова, А. А. Чиркин*

В опытах на белых крысах изучали действие факторов стимуляции пролиферативных процессов (ФСП), полученных из регенерирующей печени, на этерификацию холестерина в сыворотке крови при острой интоксикации тетрахлорметаном. После однократного введения тетрахлорметана выделены три фазы в динамике содержания холестерина в сыворотке крови. Содержание общего холестерина и эфиров холестерина в первую фазу (24 ч) уменьшается, во вторую (3—7-е сутки) увеличивается, в третью фазу (15-е сутки) эти показатели нормализуются. Введение ФСП не оказывает влияния на характер холестеринемии при острой интоксикации тетрахлорметаном, но стимулирует процессы образования эфиров холестерина в сыворотке крови.

The effect of proliferation stimulating factors (PSF) obtained from regenerating liver on the cholesterol esterification in blood serum under deep tetrachloromethane intoxication has been studied in experiments with white rats. Three phases in dynamics of cholesterol content in blood serum have been picked out after a single tetrachloromethane injection. The content of total cholesterol and cholesterol esters reduces during the first phase (24 h), during the second phase (3—7th day) it increases and during the third phase (15th day) these values become normal. PSF injection does not produce any influence on the nature of cholesterolaemia under deep tetrachloromethane intoxication, but stimulates the processes of cholesterol ester formation in blood serum.

Тетрахлорметан повреждает клетки печени вследствие действия свободных радикалов, стимулирующих реакции перекисного окисления фосфолипидов мембран [3, 5, 10]. Расщепление жирных кислот фосфолипидов сопровождается фрагментацией мембран, снижением активности микросомальных ферментов, торможением синтеза белков из-за

повреждения рибосом [7]. При этом нарушаются микросомальные гидроксилазные системы, катализирующие превращение холестерина в желчные кислоты, изменяется синтез компонентов системы этерификации холестерина в сыворотке крови [3, 6, 11, 13]. Эти данные позволили предположить, что для восстановления этерификации холестерина в сыворотке крови при острой интоксикации тетрахлорметаном следует использовать эндогенные вещества, способные усиливать синтез белков и пролиферацию клеток. К таким веществам относятся цитоплазматические факторы стимуляции пролиферации (ФСП) — смесь термостабильных белков и низкомолекулярных компонентов клеточного пула, выделяемых из регенерирующей печени крыс [2].

Мы изучали действие ФСП на систему этерификации холестерина в сыворотке крови в условиях токсического действия тетрахлорметана.

Опыты поставлены на 145 белых крысах-самцах средней массой 150 г. Раствор ФСП получали из печени крыс через 48 ч после удаления 2/3 массы органа [1, 2]. Животные были разделены на три группы: интактные, контрольные (однократно внутрибрюшинно вводили 0,3 мл смеси тетрахлорметана и оливкового масла в соотношении 1:1) и подопытные (однократно внутрибрюшинно вводили 0,3 мл масляного раствора тетрахлорметана и 5 мл раствора ФСП). Контрольных и подопытных крыс декалцитировали через одни сутки, 3, 7 и 15 суток после введения веществ. Кроме того, были поставлены две контрольные серии: животным внутрибрюшинно вводили 0,3 мл оливкового масла и 5 мл физиологического раствора. Изменения изучаемых показателей у крыс этих серий имели место на протяжении только первых суток (в связи с этим данные в таблицах не приводятся). В сыворотке крови и липопротеидах высокой плотности (ЛПВП) определяли содержание общего, свободного, эфирно-связанного холестерина и фосфолипидов [8]; исследовали содержание апо-В-липопротеидов и холестерина в них [9], а также этерифицирующую холестерин активность сыворотки крови [17]. При этом оценивали фракционную и молярную активности процесса этерификации холестерина. Полученные данные обработаны методом вариационной статистики по Стьюденту — Фишеру.

После однократного введения тетрахлорметана выявлены три фазы в динамике содержания холестерина в сыворотке крови (табл. 1). Содержание общего холестерина и его эфиров в первую фазу (24 ч) уменьшается, во вторую фазу (3-и, 7-е сутки) увеличивается, в третью фазу (15-е сутки) эти показатели нормализуются. При одновременном введении тетрахлорметана и ФСП характер динамики содержания общего и эфирно-связанного холестерина существенно не меняется, за исключением достоверно более заметного увеличения этих показателей через 7 суток. Повышение уровня общего холестерина в сыворотке крови подопытных крыс по сравнению с контрольными (в среднем на 347 мкМ) происходило преимущественно за счет эфирно-связанного холестерина: его содержание возросло в среднем на 213 мкМ, тогда как свободного холестерина — в среднем на 134 мкМ. При обсуждении этих результатов необходимо выяснить два вопроса. Первый касается изменений содержания холестерина в сыворотке крови после введения тетрахлорметана, второй — накопления эфиров холестерина при параллельном введении ФСП.

Для решения первого вопроса следовало оценить химический состав ЛПВП, поскольку у крыс основная масса холестерина транспортируется именно этими частицами [4]. Оказалось, что через сутки в ЛПВП контрольных и подопытных крыс резко уменьшено содержание холестерина — в 3 раза, его эфиров — в 5 раз и фосфолипидов — в 2 раза (табл. 2). В то же время содержание апо-В-липопротеидов повысилось у контрольных животных на 115%, у подопытных на 43,9%. При этом в составе апо-В-липопротеидов было больше холестерина: в контроле  $1142 \pm 146$  мкМ, в опыте  $1003 \pm 81$  мкМ против  $580 \pm 58$  мкМ у интактных животных. Можно предположить, что через сутки после введения тетрахлорметана резко подавлено образование ЛПВП и нарушен рецепторно-опосредованный захват апо-В-липопротеидов печенью [15]. Кроме того, ФСП, возможно, частично защищают процесс захвата апо-В-липопротеидов от повреждения тетрахлорметаном. Таким образом, в первую

Таблица 1. Действие ФСП на содержание холестерина и фосфолипидов в сыворотке крови крыс при острой интоксикации тетрахлорметаном

Вариант	Общий холестерин, мкМ		Эфиры холестерина, мкМ		Свободный холестерин, мкМ		Фосфолипиды, мМ	
	контроль	опыт	контроль	опыт	контроль	опыт	контроль	опыт
До введения веществ	913±48*		447±42		466±39		3,62±0,062	
После введения, сутки								
1-е	740±32*	620±68*	301±62	198±8*	439±77	416±66	3,59±0,125	2,59±0,094***
3-и	1365±113*	1564±169*	779±85*	832±18*	585±41*	732±151*	4,00±0,062*	3,75±0,156
7-е	1183±85*	1530±40***	770±54*	983±52***	413±50	547±12**	4,12±0,156*	5,16±0,156***
15-е	1058±137	1088±65	558±54	657±58	500±83	432±57	3,84±0,125	3,97±0,062*

Примечание. Здесь и в таблицах 2, 3 одним знаком сноски отмечено достоверное отличие по сравнению с исходными данными, двумя — по сравнению с контролем, тремя — по сравнению с исходными данными и контролем.

Таблица 2. Действие ФСП на содержание холестерина и фосфолипидов в ЛПВП сыворотки крови крыс при острой интоксикации тетрахлорметаном

Вариант	Общий холестерин, мкМ		Эфиры холестерина, мкМ		Фосфолипиды, мМ	
	контроль	опыт	контроль	опыт	контроль	опыт
До введения веществ	409±22		206±16		1,84±0,062	
После введения, сутки						
1-е	146±30*	136±38*	42±8*	36±5*	0,87±0,094*	0,78±0,094*
3-и	511±83	370±65	282±37	117±17***	1,78±0,250	2,34±0,250
7-е	520±42*	675±115*	305±44*	106±75**	2,28±0,062*	2,84±0,219***
15-е	542±166	528±33*	189±42	198±78	1,53±0,094*	1,97±0,187**

фазу действия тетрахлорметана наблюдается перераспределение холестерина между липопротеидами. Уменьшение общего содержания холестерина в сыворотке крови следует связать с более выраженным снижением количества ЛПВП по сравнению с накоплением апо-В-липопротеидов.

В начале второй фазы действия тетрахлорметана (3-и сутки) у контрольных и подопытных животных выявлена одинаковая гиперхолестеринемия, связанная с повышением содержания апо-В-липопротеидов (превышение исходного уровня у контрольных крыс на 52,9%, у подопытных — на 47,5%), увеличенным содержанием в них холестерина ( $1109 \pm 89$  мкМ у контрольных крыс и  $910 \pm 37$  мкМ у подопытных) и восстановлением содержания общего холестерина в ЛПВП. По-видимому, на 3-и сутки наблюдения образование ЛПВП нормализуется, но рецепторно-опосредованный захват апо-В-липопротеидов еще нарушен. На 7-е сутки опыта гиперхолестеринемия сохраняется, вероятно, за счет накопления общего холестерина в ЛПВП. Вклад апо-В-липопротеидов в общую гиперхолестеринемия уменьшен, поскольку их количество близко к норме, но содержание холестерина еще превышает исходный уровень ( $753 \pm 53$  мкМ у контрольных и  $756 \pm 34$  мкМ у подопытных животных). Можно полагать, что во вторую фазу действия тетрахлорметана рецепторно-опосредованный захват апо-В-липопротеидов печенью постепенно нормализуется.

Третья фаза действия тетрахлорметана характеризуется исчезновением признаков холестеринемии; содержание холестерина в липопротеидах нормализуется.

Таким образом, динамика изменений содержания холестерина в сыворотке крови контрольных и подопытных крыс сходна и определяется количеством и химическим составом липопротеидов. Для проверки предположения о защитном действии ФСП на рецепторно-опосредованный захват апо-В-липопротеидов через 24 ч после введения тетрахлорметана необходимы специальные опыты.

При решении вопроса о причинах накопления эфиров холестерина после введения параллельно с тетрахлорметаном ФСП следует учесть, что в сыворотке крови функционирует система этерификации холестерина, основным компонентом которой является фермент печеночного происхождения лецитинхолестеринацилтрансфераза (ЛХАТ) [14]. Для этерификации холестерина необходим лецитин (донор ацильных остатков), а вся система этерификации холестерина связана с ЛПВП. При этом лучшими субстратными свойствами обладают ЛПВП<sub>3</sub> и вновь образованные ЛПВП [16].

Судя по данным, представленным в таблицах 1 и 2, в сыворотке крови и ЛПВП на 7-е сутки опыта при введении ФСП содержится достоверно больше фосфолипидов, а сами ЛПВП по химическому составу приближаются к вновь образованным липопротеидам. Это означает, что в сыворотке крови подопытных крыс во вторую фазу действия тетрахлорметана создаются условия для более интенсивного протекания процесса этерификации накапливающегося свободного холестерина.

При прямых измерениях установлено, что в сыворотке крови подопытных животных на 3—7-е сутки достоверно повышены как фракционная, так и молярная скорости этерификации холестерина (табл. 3). Следовательно, введение ФСП обеспечивает более интенсивное функционирование системы этерификации холестерина в сыворотке крови.

Изменения этерифицирующей холестерин активности в сыворотке крови зависят прежде всего от наличия свободного холестерина (главным образом в ЛПВП) и активного фермента (ЛХАТ). При уменьшении содержания свободного холестерина в ЛПВП через сутки после введения тетрахлорметана этерифицирующая холестерин активность снижена как у подопытных, так и у контрольных крыс. Увеличение содержания свободного холестерина в ЛПВП контрольных крыс через

Таблица 3. Действие ФСП на этерифицирующую холестерин активность сыворотки крови крыс при острой интоксикации тетрахлорметаном

Вариант	Фракционная активность, %		Молярная активность, мкМ·ч <sup>-1</sup>	
	контроль	опыт	контроль	опыт
До введения веществ	7,5±0,44		51,7±5,15	
После введения, сутки				
1-е	3,91±1,14*	3,91±0,53*	19,1±4,94*	23,5±3,56*
3-и	7,67±0,53	11,48±1,81**	66,0±5,12	116,7±14,8***
7-е	5,55±0,58*	8,94±0,96**	33,4±4,79*	73,5±8,88***
15-е	11,57±1,16*	9,86±2,39	82,5±12,2*	66,1±19,5

15 суток, а также в сыворотке крови и в ЛПВП подопытных крыс на 3—7-е сутки сопровождалось увеличением скорости образования эфиров холестерина. Анализ этих данных позволяет также предположить, что тетрахлорметан, повреждая синтез белков в печени, нарушает и синтез ЛХАТ [11, 12]. У контрольных животных эта ферментная система нарушена по крайней мере в течение 7 суток. Введение ФСП обеспечивает, вероятно, восстановление синтеза ЛХАТ уже к 3-м суткам наблюдения в результате усиления процессов регенерации поврежденных клеток печени [1].

Итак, цитоплазматические факторы из регенерирующей печени не влияют на характер изменений холестеринемии при острой интоксикации тетрахлорметаном, но стимулируют процессы образования эфиров холестерина в сыворотке крови.

#### Литература

1. Абакумова О. Ю., Котаев А. Ю. и др. Влияние цитоплазматических факторов, стимулирующих пролиферацию, и частичной гепатэктомии на синтез ДНК в печени крыс, подвергнутых длительному действию четыреххлористого углерода. — *Вопр. мед. химии*, 1985, т. 31, № 5, с. 95—97.
2. Абакумова О. Ю., Сванадзе Н. Л. и др. Влияние цитоплазматических факторов, выделенных из регенерирующей печени животных после частичной гепатэктомии, на процессы регенерации в резецированной и цирротически измененной печени крыс. — В кн.: *Сравнительные аспекты изучения регенерации и клеточной пролиферации. Тезисы 7-й Всесоюзной конференции по вопросам регенерации и клеточного деления*. М., 1985, ч. 1, с. 1—3.
3. Губский Ю. И., Смалько П. Я. Влияние оливомицина на ферменты микросомального окисления, митохондрий и белоксинтезирующий аппарат печени крыс при острой интоксикации тетрахлорметаном. — *Вопр. мед. химии*, 1983, т. 29, № 6, с. 54—60.
4. Климов А. Н., Никульчева Н. Г. Липопротеиды, дислипидемии и атеросклероз. Л.: Медицина, 1984.
5. Логинов А. С., Матушин Б. Н. и др. Перекисное окисление липидов печени при ее патологии. — *Терапевт. арх.*, 1985, т. 57, № 2, с. 63—67.
6. Логинов А. С., Молостова Л. В. и др. Влияние длительного введения четыреххлористого углерода на состав желчи у крыс. — *Бюл. эксперим. биологии и медицины*, 1983, т. 96, № 6, с. 33—35.
7. Мусил Я. Основы биохимии патологических процессов. М.: Медицина, 1985.
8. Перова Н. В. (ред.) Современные методы исследования липопротеидов высокой плотности. (Методические рекомендации). М., 1983.
9. Покровский А. А. (ред.) Биохимические методы исследования в клинике. М.: Медицина, 1969.
10. Гринус Ф. П., Писарев А. А. и др. Экспериментально-морфологическое изучение влияния липосом при интоксикации четыреххлористым углеродом. — *Бюл. эксперим. биологии и медицины*, 1985, т. 100, № 12, с. 714—715.
11. Чиркин А. А., Коневалова Н. Ю. Система этерификации холестерина в плазме крови при повреждении печени. — В кн.: *Пятый Всесоюзный биохимический съезд. Тезисы стендовых сообщений*. М.: Наука, 1986, т. 3, с. 145—146.
12. Anttinen H., Ruyhänen L. et al. Decrease in liver collagen accumulation in carbon tetrachloride-injured and normal growing rats upon administration of zinc. — *Gastroenterology*, 1984, v. 86, p. 532—539.
13. Bolarin D. M. Serum bile acid in the evaluation of colchicine treatment of carbon tetrachloride-induced liver injury. — *Exp. Mol. Pathol.*, 1984, v. 41, p. 384—389.

14. Glomset J. A. The plasma lecithin: cholesterol acyltransferase reaction. — Journ. Lipid Res., 1968, v. 9, p. 155—166.
15. Goldstein J., Brown M. Atherosclerosis: the lowdensity lipoprotein receptor hypothesis. — Metabolism, 1977, v. 26, p. 1257—1275.
16. Jahani M., Lacko A. G. A study of the interaction of lecithin cholesterol acyltransferase with subfractions of high density lipoproteins. — Journ. Lipid Res., 1981, v. 22, p. 1102—1110.
17. Stokke K. J., Norum K. R. Determination of lecithin cholesterol acyltransferase in human blood plasma. — Scand. Journ. Clin. Lab. Invest., 1971, v. 27, p. 21—27.

*Рекомендована кафедрой биоорганической и биологической химии Витебского медицинского института. Поступила 2 июня 1986 г.*

УДК 576.36

**БИОХИМИЯ**

### КИНЕТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ ГИДРОКСИЛИРОВАНИЯ 3,4-БЕНЗПИРЕНА В МИКРОСОМАХ ПЕЧЕНИ МЫШЕЙ

*И. Б. Цырлов, Т. Г. Дужак, В. В. Ляхович*

Изучены кинетические характеристики реакций связывания и гидроксилирования гидрофобного субстрата 3,4-бензпирена в контрольных и индуцированных 3-метилхолантrenom микросомах печени мышей. Установлено, что бензпирен-гидроксилазная реакция описывается гиперболической кривой, характеризующей зависимость  $[ES]$  и  $d(P)/dt$  от  $[E_0]$  для реакций, протекающих в бифазной системе. Выявлена ключевая роль фосфолипидов микросомной мембраны в конкурентном ингибировании реакции гидроксилирования 3,4-бензпирена. Для адекватного приложения теории Михаэлиса—Ментен к кинетике бензпирен-гидроксилазных реакций предложен модифицированный метод гидроксилирования 3,4-бензпирена в пробах с очень низким содержанием микросомной фракции.

The kinetic parameters of binding and hydroxylation of hydrophobic substrate 3,4-benzpyrene have been studied in liver microsomes of untreated and 3-methylcholanthrene treated mice. The reaction of benzpyrene-hydroxylase has been established to be described by hyperbolic curve, which characterizes the dependence of  $[ES]$  and  $d(P)/dt$  on  $[E_0]$  for reactions in biphasic system. A key role of microsomal membraneous phospholipids has been revealed in competitive inhibition of 3,4-benzpyrene hydroxylation. For the adequate application of Michaelis—Menten theory for benzpyrene-hydroxylation reaction a modified method of 3,4-benzpyrene-hydroxylation in the samples with low content of protein in microsomal fraction is suggested.

В последние годы внимание специалистов обращено к монооксигеназным реакциям, катализируемым разными молекулярными формами цитохрома P450. Отличительным свойством микросомных монооксигеназ помимо необычного механизма реакции является способность взаимодействовать с широким кругом липорастворимых ксенобiotиков — чужеродных химических соединений различной структуры и биологической активности [1]. Среди ксенобiotиков выделяют полициклические ароматические углеводороды (ПАУ), ферментативную трансформацию которых в организме связывают с возникновением мутагенных и канцерогенных эффектов [14]. Это обусловило появление ряда работ, посвященных кинетике гидроксилирования ПАУ (в первую очередь 3,4-бензпирена) микросомной монооксигеназой, получившей название бензпирен-гидроксилазы (КФ 1.14.14.1) [10, 12]. В этих работах авторы используют уравнения Михаэлиса—Ментен, для определения  $V$  и  $K_M$  — графический метод Лайнуивера — Берка.