

## ДЕЙСТВИЕ ТЕРМОСТАБИЛЬНЫХ ФАКТОРОВ ИЗ ЦИТОЗОЛЯ КЛЕТОК РЕГЕНЕРИРУЮЩЕЙ ПЕЧЕНИ НА ПРОЦЕСС ЭТЕРИФИКАЦИИ ХОЛЕСТЕРИНА В СЫВОРОТКЕ КРОВИ КРЫС ПОСЛЕ ВВЕДЕНИЯ ЭТИОНИНА

*А. А. Чиркин, Н. Ю. Коневалова*

В экспериментах на крысах показано, что при введении этионина повреждается система этерификации холестерина в сыворотке крови. Факторы, стимулирующие пролиферацию гепатоцитов, частично предотвращают токсическое действие этионина.

In the trials on rats it has been found that ethionine injection damages the system of cholesterol esterification in the blood serum. The factors stimulating hepatocyte proliferation prevent partially the toxic action of ethionine.

В цитозоле клеток регенерирующей печени обнаружены факторы, способные стимулировать пролиферацию гепатоцитов (ФСП), усиливать синтез ДНК, увеличивать общее содержание РНК, а также соотношение РНК/ДНК в печени. Полагают, что ФСП представляют собой набор термостабильных белков и низкомолекулярных веществ клеточного пула, которые имеются или появляются в печени после частичной гепатэктомии. Биостимулирующая активность препарата ФСП теряется после удаления низкомолекулярных веществ [1, 2].

Мы исходили из того, что эффективность ФСП можно оценить путем изучения функциональной активности экспортируемых из печени белков в условиях повреждения их синтеза. Для повреждения синтеза белков в печени может быть использован антиметаболит метионина этионин, который в отличие от тетрахлорметана не вызывает некротических изменений в органе [3], но нарушает синтез АТФ [4, 15] и ингибирует образование белка, уменьшая скорость инициации полипептидной цепи [12, 13, 16]. Одним из экспортируемых из печени белков является фермент лецитин: холестерол ацилтрансфераза (ЛХАТ, КФ 2.3.1.43) — ключевой компонент системы этерификации холестерина в сыворотке крови. Для образования эфиров холестерина в кровеносном русле требуются кофакторы ЛХАТ: апопротеины группы А и С, а также липопотеины высокой плотности (ЛПВП), которые синтезируются также в печени [10]. В связи со сказанным представляло интерес исследовать этерификацию холестерина в сыворотке крови крыс при действии ФСП на фоне этионинового поражения печени.

Опыты поставлены на 80 белых крысах-самцах (средняя масса 150 г). Препарат ФСП получали из цитозоля клеток печени крыс через 48 ч после удаления 2/3 массы органа [1, 2]. Животные были разделены на три группы: 1) интактные крысы; 2) контрольная группа (3-кратное с суточным интервалом внутрибрюшинное введение этионина в дозе 50 мг на 100 г массы тела); 3) подопытная группа (после третьей инъекции этионина внутрибрюшинное введение 5 мл препарата ФСП). Кроме того, была поставлена контрольная серия с внутрибрюшинным введением физиологического раствора в объеме, соответствующем объему вводимых препаратов. Изменения у животных этой серии прослеживались лишь на протяжении первых суток (в связи с чем данные не приводятся). Исследованию подвергали сыворотку крови крыс, декапитированных через сутки, 3 и 7 суток после внутрибрюшинного введения препаратов. В сыворотке крови и ЛПВП определяли содержание общего и эфирно-связанного холестерина [7], оценивали уровень апо-В-содержащих липопотеинов (апо-В-ЛП) и количество холестерина в них [8], исследовали этерифицирующую холестерин активность сыворотки (ЭХАС) крови [14] и

активность ЛХАТ [9]. В качестве субстрата для определения активности ЛХАТ использовали протеолипосомы, содержащие лецитин и холестерин в молярном отношении 20 : 1, и суммарный препарат апопротеинов ЛПВП [5, 9]. Зависимость скорости ЛХАТ-реакции от концентрации субстрата определяли в диапазоне концентраций неэтерифицированного холестерина протеолипосом от 2,5 до 49,7 нмоля в пробе (8 точек), что соответствует диапазону концентраций неэтерифицированного холестерина в сыворотке крови от 125 до 2485 мкМ. Полученный материал обработан методом вариационной статистики по Стьюденту — Фишеру.

После введения этионина в сыворотке крови крыс контрольной группы выявлены 3 фазы в динамике изменений содержания холестерина и его эфиров: гипохолестеринемия в 1-е сутки гиперхолестеринемия на 3-и сутки и нормализация уровня холестеринемии на 7-е сутки (табл. 1). При этом изменяются количество и качественный состав липопротеинов. В фазу гиперхолестеринемии резко снижено содержание ЛПВП, судя по 10-кратному уменьшению количества общего холестерина в них. В составе ЛПВП уменьшена доля эфиров холестерина, что следует из возрастания молярного отношения общего холестерина к эфирно-связанному с 1,99 у интактных крыс до 3,27 у животных контрольной группы. Содержание апо-В-ЛП у контрольных крыс уменьшено на 22 %, а содержание холестерина увеличено на 32,6 % (из-за разброса данных в обоих случаях  $0,1 > P > 0,05$ ). Следовательно, в первую фазу действия этионина резко подавлен синтез ЛПВП, причем в их спектре, вероятно, увеличивается количество насцентных липопротеинов, обедненных эфирами холестерина [10]. Накопление холестерина во вторую фазу действия этионина связано с достоверным (на 32,3 %) ростом количества апо-В-ЛП, обогащенных холестерином: содержание общего холестерина в этих липопротеинах увеличивается с  $580 \pm 58$  мкМ у интактных крыс до  $1029 \pm 54$  мкМ у животных контрольной группы. Содержание ЛПВП незначительно возрастает по сравнению с предыдущим сроком наблюдения, а в их составе относительно больше эфиров холестерина (молярное отношение общего холестерина к эфирно-связанному уменьшено до 1,37). В третью фазу действия этионина нормализуется содержание холестерина в ЛПВП и апо-В-ЛП, но количество апо-В-ЛП снижается на 28,7 % по сравнению с исходным уровнем.

Итак, в соответствии с фазами холестеринемии при этиониновом поражении печени выявлена следующая последовательность в изменении липопротеинов сыворотки крови: снижение количества ЛПВП и апо-В-ЛП → накопление обогащенных холестерином апо-В-ЛП при сниженном уровне ЛПВП → нормализация содержания ЛПВП на фоне уменьшенного количества апо-В-ЛП. Пусковым механизмом в этой последовательности изменений липопротеинового состава сыворотки крови является подавление этионином синтеза белков в печени, в том числе, вероятно, и апопротеинов С-I, С-II, С-III и Е. Апопротеины А-I, А-II и В в этих условиях могут синтезироваться в стенке кишечника. Известно, что нарушение синтеза апопротеинов в печени приводит к накоплению в ней липидов [17] и уменьшению количества транспортных форм липидов в сыворотке крови. Параллельно с этим процессом этионин, по всей видимости, повреждает синтез рецепторов к апо-В-ЛП, в результате чего после незначительного уменьшения количества апо-В-ЛП в первую фазу обнаруживается достоверное увеличение их содержания на 3-и сутки опыта [11].

Первым этапом контроля уровня холестеринемии является этерификация холестерина в кровеносном русле, поэтому мы исследовали активность этого процесса в сыворотке крови (табл. 2). Установлено, что скорость этерификации холестерина снижена в 1—3-и сутки наблюдения. Это связано с низким содержанием субстратных ЛПВП, поскольку система этерификации холестерина интегрирова-

на с этим классом липопротеинов. К 7-м суткам скорость этерификации холестерина нормализуется, а молярная скорость этерификации, хотя и повышается, но еще не достигает исходных значений.

Учитывая ключевую роль ЛХАТ в процессе этерификации холестерина в сыворотке крови, мы исследовали активность этого фермента после введения этионина. Необходимо было подобрать оптимальные условия для определения активности фермента. Оказалось, что для сыворотки крови интактных крыс имеется линейная зависимость скорости реакции, катализируемой ЛХАТ, от концентрации субстрата — неэтерифицированного холестерина протеолипосом — в диапазоне 2,5—12,4 нмоля на пробу (соответствует 125—620 мкМ в сыворотке крови), затем следует плато (18,6—31,1 нмоля на пробу, или 930—1555 мкМ), сменяющееся пиком активности при содержании холестерина в пробе 37,3 нмоля (1865 мкМ в сыворотке крови). Дальнейшее повышение концентрации субстрата ведет к ингибированию ЛХАТ-реакции (рис., А). Представленные на рисунке данные показывают, что оптимальная концентрация неэтерифицированного холестерина протеолипосом в пробе для определения активности ЛХАТ составляет 6,2 нмоля, или 310 мкМ. Определение активности ЛХАТ с таким оптимальным субстратом свидетельствует о повышении активности фермента в сыворотке крови контрольных крыс во все сроки наблюдения (см. табл. 2).

Для объяснения несоответствия данных о скорости этерификации холестерина в сыворотке крови и активности ЛХАТ была привлечена рабочая гипотеза о существовании смеси молекулярных форм ЛХАТ [6], согласно которой в сыворотке крови присутствуют как минимум две молекулярные формы ЛХАТ. Первая характеризуется гиперболической зависимостью скорости реакции от концентрации субстрата и работает при физиологических концентрациях субстрата (левая часть кривой). На рисунке физиологическая концентрация неэтерифицированного холестерина показана горизонтальными отрезками с доверительным интервалом  $\pm 0,05$ . Вторая молекулярная форма ЛХАТ характеризуется S-образной зависимостью скорости реакции от концентрации субстрата и может проявлять свое действие при повышении концентрации субстрата (пик в правой части кривой). Накладывание кинетических кривых этих двух молекулярных форм ЛХАТ дает кривую, приведенную на рисунке, А.

Таблица 1. Действие ФСП на содержание общего и эфирно-связанного холестерина в сыворотке крови и ЛПВП крыс при повреждении печени этионином

Сроки наблюдения, сутки	Содержание, мкМ, в сыворотке крови				Содержание, мкМ, в ЛПВП			
	общего холестерина		эфиров холестерина		общего холестерина		эфиров холестерина	
	контроль	опыт	контроль	опыт	контроль	опыт	контроль	опыт
До опыта								
1-е	614 ± 23*	505 ± 87*	223 ± 40*	447 ± 42	36 ± 4*	409 ± 22	11 ± 4*	206 ± 16
3-е	1075 ± 60*	1361 ± 145*	688 ± 31*	205 ± 42*	63 ± 11*	252 ± 29***	46 ± 12*	41 ± 7***
7-е	982 ± 96	1032 ± 69	669 ± 77*	506 ± 46**	484 ± 50	346 ± 85	163 ± 19	92 ± 13***
				483 ± 91				226 ± 33***

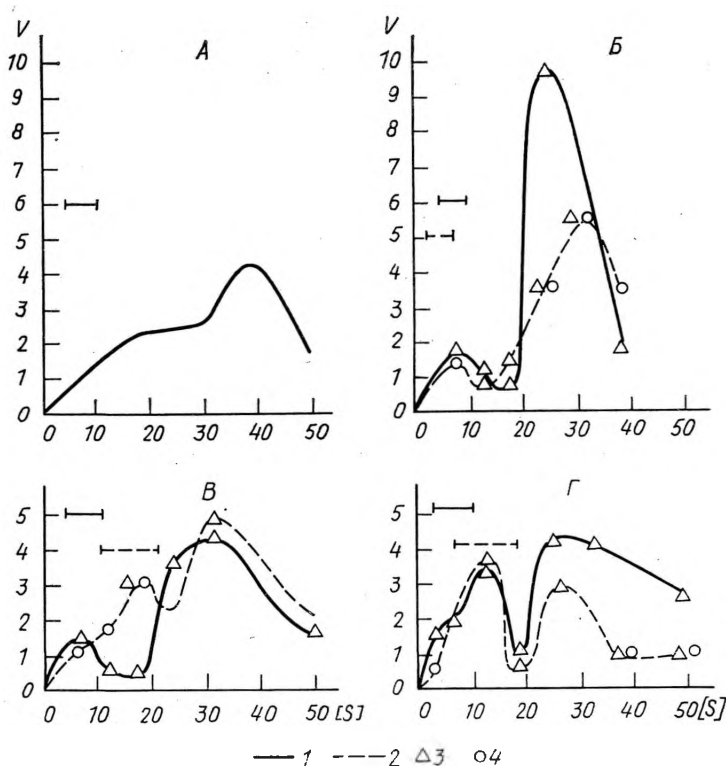
Примечания: 1. Здесь и в таблице 2 одним знаком сноски отмечено достоверное отличие по сравнению с исходными данными, двумя — по сравнению с контролем, тремя — по сравнению с исходным уровнем и контролем. 2. Число животных в группах равно 8—10.

Таблица 2. Действие ФСП на этерифицирующую холестерин активность сыворотки крови крыс при повреждении печени этионином

Сроки наблюде- ния, сутки	Скорость этерификации холестерина				Активность ЛХАТ, мкМ/ч	
	фракционная, %		молярная, мкМ/ч			
	контроль	опыт	контроль	опыт	контроль	опыт
До опыта	7,5±0,44		51,7±5,15		46,7±9,3	
1-е	1,8±0,48*	3,8±0,83***	10,0±2,48*	16,4±3,63*	90,4±7,3*	63,4±5,0**
3-е	3,5±0,19*	5,7±0,88***	20,9±3,28*	71,8±10,2***	80,3±11,0*	53,3±4,1**
7-е	9,0±1,42	9,3±0,95	32,2±7,68*	76,0±11,49***	85,3±7,2*	64,6±9,4

Примечание. Активность ЛХАТ определяли при концентрации неэтерифицированного холестерина протеолипосом в пробе 6,2 нмоля, что соответствует его содержанию в сыворотке крови 310 мкМ (линейный участок кривой зависимости скорости реакции от концентрации субстрата).

После введения этионина форма кинетической кривой ЛХАТ-реакции существенно изменяется: в левой части кривой исчезает плато и появляется небольшой острый пик активности при концентрации неэтерифицированного холестерина в пробе 6,2 нмоля. Повышение концентрации холестерина до 12,4 нмоля (диапазон его физиологической концентрации) приводит к ингибированию ЛХАТ-реакции (1—3-и сутки наблюдения, см. рис., Б, В). Такую форму левой части кинетической кривой можно объяснить уменьшением количества первой молекулярной формы ЛХАТ. Отсюда следует, что, хотя



Зависимость скорости ЛХАТ-реакции (V, нмоль на пробу за 1 ч) от концентрации неэтерифицированного холестерина протеолипосом ([S], нмоль в пробе). А — исходные данные (интактные крысы); Б, В, Г — 1-е, 3-и и 7-е сутки наблюдения:

1 — контроль, 2 — опыт, 3 — достоверное различие по сравнению с исходными данными, 4 — по сравнению с контролем

активность ЛХАТ при оптимальной концентрации холестерина повышена, общая этерифицирующая холестерин активность сыворотки снижается из-за подавления этионином синтеза первой молекулярной формы ЛХАТ. На 7-е сутки наблюдения проявляется тенденция к активации ЛХАТ-реакции при низких концентрациях субстрата, но плато отсутствует и сохраняется ингибирование фермента при концентрации холестерина в пробе 18,6 нмоля (930 мкМ). Можно полагать, что в этот срок наблюдения усиливается синтез первой молекулярной формы ЛХАТ, но ее количество еще не достигает исходного уровня. Поэтому зарегистрировано, что активность ЛХАТ (при оптимальной концентрации холестерина) повышена, нормализуется фракционная скорость этерификации холестерина, но молярная скорость еще не достигает исходного уровня. Второй пик активности ЛХАТ-реакции (при потенциально возможных высоких концентрациях субстрата) по мере удлинения сроков от введения этионина уплощается и сдвигается в область концентраций неэтерифицированного холестерина, типичных для второй молекулярной формы ЛХАТ сыворотки крови интактных крыс.

Таким образом, физиологический контроль холестеринемии поврежден во вторую фазу действия этионина: в крови циркулирует избыток обогащенных холестерином апо-В-ЛП, в сыворотке крови и в ЛПВП повышено содержание эфиров холестерина, проявляется функциональная недостаточность системы этерификации холестерина в кровеносном русле.

Введение ФСП крысам подопытной группы не изменяет динамики общего холестерина в сыворотке крови. В то же время содержание эфиров холестерина в сыворотке нормализуется быстрее — уже на 3-и сутки наблюдения (см. табл. 1). При этом в количественном и качественном составе ЛПВП выявлены меньшие изменения по сравнению с контрольной группой животных. Следует отметить, что на 3-и сутки опыта как в сыворотке крови, так и в ЛПВП увеличена доля неэтерифицированного холестерина. Содержание апо-В-ЛП в сыворотке крови подопытных крыс в 1-е сутки наблюдения не меняется, а спустя 3 суток превышает исходный уровень в такой же степени, как и у контрольных крыс. Введение ФСП обеспечивает менее выраженное снижение фракционной скорости этерификации холестерина (1-е, 3-и сутки опыта) по сравнению с контрольными крысами (см. табл. 2). В то же время молярная скорость этерификации превышает как исходный, так и контрольный уровень на 3-и и 7-е сутки наблюдения. По-видимому, повышение молярной скорости этерификации холестерина у подопытных крыс в разгар гиперхолестеринемии связано с увеличением количества субстрата ЛХАТ-реакции — неэтерифицированного холестерина в сыворотке крови и липопротеинах.

Анализ кинетических кривых ЛХАТ-реакции показал, что в 1-е сутки наблюдения левая часть кривой одинакова для сыворотки крови контрольных и подопытных крыс. Можно лишь отметить, что величина пика активности ЛХАТ, характерной для подопытных крыс, соответствует активности ЛХАТ при этой концентрации субстрата у интактных крыс (см. табл. 2, рис., Б). Объяснение несоответствия величин скорости этерификации холестерина и активности ЛХАТ в этот срок наблюдения аналогично объяснению, приведенному для крыс контрольной группы. Правая часть кривой напоминает эту часть кинетической кривой для интактных крыс, но пик активности ЛХАТ проявляется при меньшей концентрации неэтерифицированного холестерина протеолипосом (31,1 нмоля в пробе, или 1555 мкМ). Вероятно, ФСП способствует сохранению второй молекулярной формы ЛХАТ. На 3-и сутки наблюдения активность ЛХАТ соответствует исходному уровню, а величина этерифицирующей холестерин активности превы-

шает его. Увеличение скорости этерификации холестерина связано с появлением активности ЛХАТ, отображаемой пиком в левой части кинетической кривой, при концентрации субстрата, близкой к концентрации неэтерифицированного холестерина в сыворотке крови подопытных животных (см. рис., В). На 7-е сутки у подопытных крыс пик активности ЛХАТ (левая часть кривой) также соответствует концентрации неэтерифицированного холестерина в сыворотке крови и по величине превышает активность ЛХАТ при этой концентрации субстрата у интактных животных (рис., Г). Поэтому у подопытных крыс в этот срок наблюдения повышена скорость этерификации холестерина в сыворотке крови.

Итак, введение ФСП оказывает защитный эффект при поражении печени этионином, который реализуется, вероятно, на уровне синтеза апопротеинов, необходимых для сборки ЛПВП и молекулярных форм ЛХАТ, работающих при реальных концентрациях неэтерифицированного холестерина в сыворотке крови.

Представленные результаты исследований позволяют сделать следующие заключения. При этиониновом поражении печени изменяется липопротеиновый состав сыворотки крови и нарушается система этерификации холестерина вследствие повреждения молекулярной формы ЛХАТ, катализирующей превращения физиологических концентраций неэтерифицированного холестерина. Факторы, стимулирующие пролиферацию гепатоцитов, частично предотвращают токсическое действие этионина на печень, что можно зарегистрировать по процессу ферментативной этерификации холестерина в кровеносном русле. При токсическом поражении печени нельзя исследовать активность ЛХАТ, используя только одну концентрацию субстрата, а необходимо строить кинетические кривые зависимости скорости реакции от концентрации субстрата.

#### 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., Свападзе Н. Л. и др. Влияние цитоплазматических факторов, выделенных из регенерирующей печени животных после частичной гепатэктомии, на процессы регенерации в резцированной 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. Блиндер Л. В., Гаспарян С. А. и др. Использование ферментных тестов для диагностики характера токсических повреждений печени и контроля эффективности химиотерапевтических воздействий при отравлении  $CCl_4$ . — *Бюл. эксперим. биологии и медицины*, 1973, т. 75, № 5, с. 24—27.
4. Воскобойников Г. В. Оценка функциональной полноценности систем окислительного синтеза макроэргических фосфатов по скорости ликвидации дефицита АТФ у животных, отравленных этионином. — *Биохимия*, 1971, т. 36, № 2, с. 240—243.
5. Иванова Е. М., Никифорова А. А., Алкснис Е. Г. Получение протеолипосом — субстрата для измерения скорости лецитин-холестеринацил-трансферной реакции в цельной плазме крови. — *Вопр. мед. химии*, 1985, т. 31, № 6, с. 123—127.
6. Никифорова А. А., Иванова Е. М., Алкснис Е. Г. Некоторые кинетические свойства лецитин-холестерин-ацилтрансферазы плазмы крови лиц с гиперальфа-липопротеидемией. — *Бюл. эксперим. биологии и медицины*, 1985, т. 99, № 2, с. 158—161.
7. Перова Н. В. (ред.) *Современные методы исследования липопротеидов высокой плотности (Методические рекомендации)*. М., 1983, с. 3—7.
8. Покровский А. А. (ред.) *Биохимические методы исследования в клинике*. М.: Медицина, 1969, с. 292—294.
9. Chen C. H., Albers J. J. Characterization of proteoliposomes containing apo-protein A-I: a new substrate for the measurement of lecithin: cholesterol acyltransferase activity. — *Journ. Lipid Res.*, 1982, v. 23, p. 680—691.

10. Glomset J. A. High-density lipoproteins in human health and disease. — *Adv. Intern. Med.*, 1980, v. 25, p. 91—118.
11. Goldstein J., Brown M. Atherosclerosis: the low density lipoprotein receptor hypothesis. — *Metabolism*, 1977, v. 26, p. 1257—1275.
12. Kisilevsky R. The regulatory parameter of protein synthesis most affected by ethionine, and cycloheximide, a comparison of computer and in vivo studies. — *Biochim. Biophys. Acta*, 1972, v. 272, № 3, p. 463—472.
13. Kisilevsky R., Matheson G. Adenine, reversal of ethionine-induced inhibition of protein synthesis: a comparison with computer—generated data. — *Canad. Journ. Biochem.*, 1973, v. 51, № 10, p. 1428—1432.
14. 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.
15. Tani H., Ogata K., Hatsu T. Effect of ethionine on carbohydrate and lipid metabolism. — *Journ. Lipid Res.*, 1973, v. 14, № 1, p. 32—40.
16. Witshi H. A comparative study of in vivo RNA and protein synthesis in rat liver and lung. — *Cancer Res.*, 1972, v. 32, № 3, p. 1686—1694.
17. Yokota F., Igarachi J., Suzue R. Effects of ethionine feeding on fatty liver and plasma lipoproteins in rats. — *Journ. Nutr.*, 1982, № 112, p. 405—409.

Рекомендована кафедрой биоорганической и биологической химии Витебского медицинского института. Поступила 9 июля 1987 г.

УДК 595.132:591.4

ЗООЛОГИЯ

## УТОЧНЕНИЕ СИСТЕМАТИЧЕСКОГО ПОЛОЖЕНИЯ SPILOPHORELLA BIDENTATA PLATONOVA, 1971 И SP. UNIDENTATA PLATONOVA, 1971

О. И. Дащенко

Установлено, что *Spilophorella bidentata* и *Sp. unidentata* (Платонова, 1971) относятся к роду *Panduripharynx* Timm, 1961. *P. pacifica* Belogurov et al., 1985 — синоним *P. unidentatus* (Platonova, 1971) comb. nov., а *Sp. bidentata sensu* Belogurov et al. (1982) — синоним *Sp. paradoxa* (De Man, 1888). Приведены расширенный диагноз рода *Panduripharynx*, определительная таблица видов этого рода и переописание *P. bidentatus* (Platonova, 1971) comb. nov.

It has been found that *Spilophorella bidentata* and *Sp. unidentata* (Platonova, 1971) belong to genus *Panduripharynx* Timm, 1961. *P. pacifica* Belogurov et al., 1985 is a synonym to *P. unidentatus* (Platonova, 1971) comb. nov., and *Sp. bidentata sensu* Belogurov et al. (1982) is a synonym to *Sp. paradoxa* (De Man, 1888). Supplementary diagnosis of genus *Panduripharynx*, a key of species of this genus and redescription *P. bidentatus* (Platonova, 1971) comb. nov. are presented.

Изучение типовых экземпляров *Spilophorella bidentata* Platonova, 1971 и *Sp. unidentata* Platonova, 1971 показало, что оба вида относятся к роду *Panduripharynx* Timm, 1961. Поэтому виды, описанные Т. А. Платоновой [2] как *Sp. bidentata* и *Sp. unidentata*, должны называться соответственно *Panduripharynx bidentatus* (Platonova, 1971) и *P. unidentatus* (Platonova, 1971). В результате сравнения экземпляров *P. unidentatus* и *P. pacifica* Belogurov et al., 1985 выяснено, что они относятся к одному и тому же виду. Нематоды, описанные О. И. Белогуровым с соавторами [1] как *Spilophorella bidentata*, следует отнести к виду *Sp. paradoxa* (De Man, 1888). Единственное, что отличает япономорские экземпляры от североморских, — более крупные размеры спикул и рулька. Это отличие может считаться особенностью япономорской популяции.