

Н. Ю. Коневалова, И. А. Чиркина, А. А. Чиркин

## ДЕЙСТВИЕ ФАКТОРОВ, СТИМУЛИРУЮЩИХ ПРОЛИФЕРАЦИЮ ГЕПАТОЦИТОВ, НА ПРОЦЕСС ЭСТЕРИФИКАЦИИ ХОЛЕСТЕРИНА В СЫВОРОТКЕ КРОВИ ПРИ РЕГЕНЕРАЦИИ ПЕЧЕНИ

Кафедра биохимии Витебского медицинского института

Ферментный синтез эфиров холестерина в сыворотке крови зависит от состояния гепатоцитов, поскольку основные компоненты системы эстерификации холестерина — фермент лецитин-холестеринацилтрансфераза (ЛХАТ, КФ 2.3.1.43), апопротеины липопротеидов высокой плотности (ЛПВП), насцентные ЛПВП — синтезируются преимущественно в печени [12]. При различных типах повреждения печени процесс эстерификации холестерина в кровеносном русле страдает [9].

В условиях острой интоксикации тетрахлорметаном у крыс было продемонстрировано положительное действие факторов, стимулирующих пролиферацию гепатоцитов (препарат ФСП), на интенсивность образования эфиров холестерина в плазме крови. Механизм такого действия препарата ФСП связан, вероятно, с сохранением или стимуляцией биосинтеза ЛХАТ и ее молекулярных форм в печени, а также с выбросом в кровь насцентных ЛПВП из регенерирующей печени [10].

Целью настоящей работы было исследование влияния препарата ФСП на течение репаративной регенерации печени и систему эстерификации холестерина в кровеносном русле. Изучение системы эстерификации холестерина в процессе репаративной регенерации печени важно потому, что для построения мембран интенсивно делящихся клеток требуется неэстерифицированный холестерин [4].

### Методика

Опыты поставлены на 314 беспородных крысах средней массой 150 г. В работе использована стандартная операция частичной гепатэктомии по Хиггинсу и Андерсену.

Препарат ФСП получали из цитозоля клеток печени крыс через 48 ч после частичной гепатэктомии [1]. Для этого ткань регенерирующей печени выдерживали сутки при  $-10^{\circ}\text{C}$ , затем гомогенизировали с дистиллированной водой в соотношении 1 : 3 в измельчителе РТ-1 при 8000 об/мин в течение 60 с.

Полученный гомогенат центрифугировали 20 мин при 3000 об/мин при  $4^{\circ}\text{C}$ . Супернатант прогревали 15 мин при  $100^{\circ}\text{C}$ . Денатурированные макромолекулы удаляли фильтрованием через 6 слоев марли, а фильтрат центрифугировали при 40 000 об/мин 60 мин в ультрацентрифуге L2-65B фирмы «Спинко-Бекман». Полученный препарат (сумма относительно низкомолекулярных и термостабильных веществ) хранили при  $-20^{\circ}\text{C}$ . Перед употреблением препарат ФСП размораживали и прогревали до  $37^{\circ}\text{C}$ .

Все оперированные животные были разделены на контрольную и опытную группы. Подопытным животным сразу после частичной гепатэктомии вводили внутривенно 5 мл препарата ФСП. Контрольным крысам в это же время вводили 5 мл физиологического раствора.

Контрольных и подопытных крыс декапитировали через 1, 2, 4, 6, 10 и 30 сут после операции. Оценивали митотическую активность гепатоцитов, количество двуядерных клеток, относительную массу органа и морфологическую картину ткани.

В сыворотке крови и ЛПВП определяли содержание общего, неэстерифицированного и эфирно-связанного холестерина [6, 7]. Скорость эндогенной эстерификации холестерина определяли радионуклидным методом Stokke, Norum [14]. Активность ЛХАТ исследовали с помощью искусственного субстрата протеолипосом [3, 11]. Производили исследования кинетических свойств ЛХАТ-реакции путем измерения зависимости скорости реакции от концентрации субстрата [10].

### Результаты и обсуждение

Восстановление массы печени после операции частичной гепатэктомии происходит в два этапа [2, 8]. Наиболее быстрое нарастание массы органа наблюдается в первые 3 сут (1-й этап), затем с 3-х по 6-е сутки имеет место статистически достоверное замедление роста, вслед за которым с 7-х суток вновь отмечается увеличение массы органа (2-й этап). Аналогичные результаты были получены нами (рис. 1). Введение препарата ФСП обеспечило больший прирост массы печени на 6-е сутки опыта, причем достигнуто практически полное совпадение с исходными значениями массы органа. Этот эффект определяется более высоким уровнем митотической активности ге-

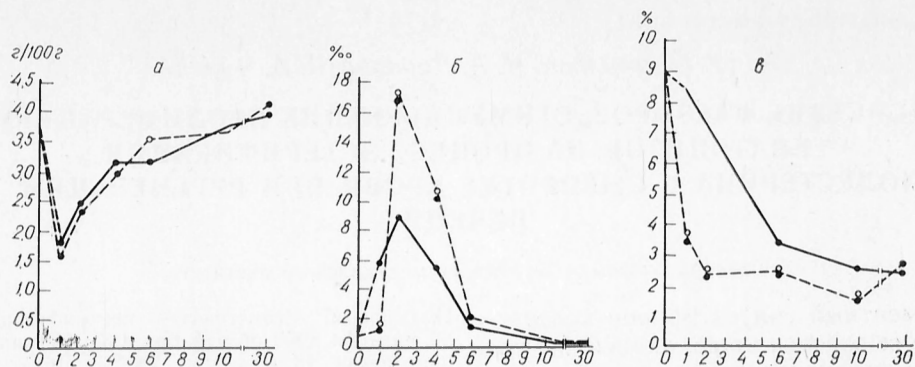


Рис. 1. Действие факторов, стимулирующих пролиферацию гепатоцитов, на течение регенераторной гипертрофии печени.

Сплошная линия — контроль; пунктирная — опыт; темные кружки — достоверные различия по сравнению с исходными данными; светлые — по сравнению с контролем. а — относительная масса печени (в г на 100 г массы тела); б — митозы (в %); в — двуядерные клетки (в %). Здесь и на рис. 2: по оси абсцисс — время после гепатэктомии (сутки).

патоцитов спустя 48 ч после операции и с ранним (на 1—2-е сутки опыта) делением двуядерных клеток. На протяжении 2-го этапа регенераторного процесса наблюдалась гипертрофия клеток печени. У подопытных животных этот эффект был более выражен по сравнению с контрольными крысами. Кроме того, в интервале 6—10 сут наблюдения у подопытных крыс было достоверно меньше двуядерных клеток в печени. К 30-м суткам постепенно появились морфологические признаки «созревания» ткани печени, более выраженные у подопытных крыс.

Анализ результатов морфологических исследований показал, что для течения восстановительных процессов в печени важны минимум два процесса — вступление гепатоцитов в митоз и деление двуядерных клеток. Оба этих процесса сопряжены с обменом холестерина. Известно, что синтезу ДНК в S-фазе митотического цикла предшествует увеличение скорости биосинтеза холестерина, происходящего в G<sub>1</sub>-фазе. Это приводит к увеличению содержания холестерина в плазматической мембране гепатоцитов и увеличению ее вязкости. Выдвинута гипотеза, что накопление холестерина в плазматической мембране клеток в конце G<sub>1</sub>-фазы является сигналом к началу синтеза ДНК, а увеличение вязкости мембраны в конце G<sub>2</sub>-фазы может быть сигналом к началу деления. Обратный процесс — переход клеток из состояния размножения в состояние покоя — сопровождается снижением биосинтеза и содержа-

ния в них холестерина [4]. Другой путь увеличения числа гепатоцитов посредством деления двуядерных клеток также требует образования дополнительных участков бислоя плазмолеммы, а следовательно, и дополнительных количеств неэстерифицированного холестерина. Отсюда следует, что прирост массы печени за несколько суток примерно на 2 г в пересчете на 100 г массы тела должен сопровождаться ощутимыми сдвигами содержания холестерина и в сыворотке крови. Такое предположение базируется на том, что у крыс 82 % холестерина образуется в печени, и печень является одновременно основным органом выведения холестерина из кровотока [13].

Результаты исследований содержания холестерина в сыворотке крови представлены на рис. 2. У контрольных животных содержание общего холестерина резко снижено спустя сутки после частичной гепатэктомии. Механизм этого эффекта связан с тем, что в организме крысы осталось всего около 30 % клеток печени. Затем количество общего холестерина повысилось до исходных значений в интервале 2—4 сут, а содержание неэстерифицированного холестерина достоверно превысило исходный уровень через 48 ч после операции. Поскольку динамика изменений содержания неэстерифицированного холестерина совпадает по срокам с волной митозов, причиной роста количества холестерина можно считать усиление его биосинтеза в митотически делящихся гепатоцитах [4]. В интервале 6—10 сут гепатоциты перехо-

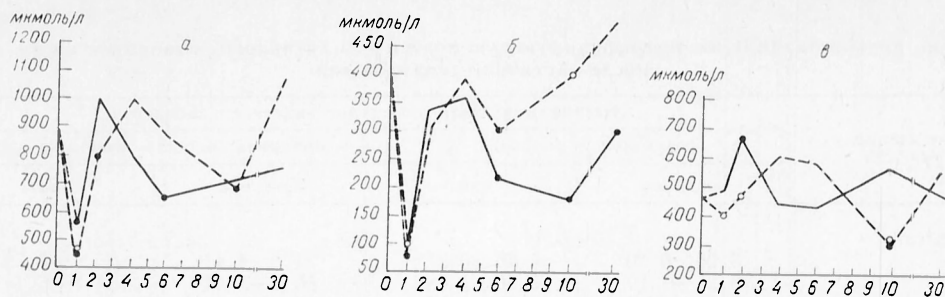


Рис. 2. Действие препарата ФСП на содержание холестерина и его фракций в сыворотке крови крыс после частичной гепатэктомии.  
 а — общий холестерин; б — эфиры холестерина; в — неэстерифицированный холестерин.

дят из состояния интенсивного деления в состояние покоя, характеризующееся нормализацией биосинтеза холестерина. Но в это время начинают усиленно делиться двуядерные клетки, в результате чего, вероятно, и зарегистрировано повторное снижение содержания общего холестерина (6-е сутки). При этом содержание неэстерифицированного холестерина, необходимого для построения плазматических мембран гепатоцитов, поддерживается относительно постоянным за счет параллельного уменьшения количества эфиров холестерина. Тенденция к нормализации уровня холестерина и его фракций проявляется к 30-м суткам наблюдения.

Введение препарата ФСП изменило динамику холестеринемии. Через сутки после частичной гепатэктомии содержание общего и неэстерифицированного холестерина снизилось в большей степени, чем в контроле, а спустя 48 ч повышение уровня общего и неэстерифицированного холестерина было меньшим по сравнению с контрольными крысами. По всей видимости, эти изменения можно трактовать как результат отвлечения части неэстерифицированного холестерина на деление двуядерных клеток, содержание которых через 48 ч уменьшилось в 4 раза. Второе ощутимое снижение содержания общего и неэстерифицированного холестерина было зарегистрировано спустя 10 сут после частичной гепатэктомии, и оно совпадает по времени с дальнейшим уменьшением числа двуядерных клеток. Таким образом, используя гипотезу Ю. М. Лопухина и соавт. (1983 г.), можно искать логические связи между характером холесте-

ринемии и течением восстановительных процессов в печени.

Сопоставление морфологических признаков регенерирующей печени и показателей холестеринемии позволило сделать заключение о стимулирующем влиянии препарата ФСП на процесс восстановления массы органа. Однако при этом возникает вопрос о функциональной полноценности регенерации печени, ускоренной введением препарата ФСП. Для его решения была проанализирована холестеринэстерифицирующая активность сыворотки крови, так как основные компоненты системы эстерификации холестерина в кровеносном русле полностью или преимущественно синтезируются в печени [12].

Исследования показали, что динамика изменений фракционной и молярной скоростей эстерификации холестерина в сыворотке крови контрольных крыс хорошо совпала с динамикой изменений содержания общего холестерина: гипохолестеринемическим фазам обоих этапов восстановления печени соответствовало снижение холестеринэстерифицирующей активности сыворотки крови (табл. 1). Введение препарата ФСП обеспечило превышение исходного и контрольного уровней фракционной скорости эстерификации спустя 6 сут после операции и молярной скорости в интервале 4—6 сут наблюдения. Кроме того, молярная скорость эстерификации холестерина полностью нормализовалась у подопытных животных уже на 10-е сутки опыта.

Рассматривая причины таких изменений в скорости эстерификации холестерина в кровеносном русле, следует оценить свойства субстратных ЛПВП

Действие препарата ФСП на эстерифицирующую холестерин активность сыворотки крови крыс после частичной гепатэктомии

Срок наблюдения, сут	Эстерифицирующая холестерин активность сыворотки			
	фракционная скорость, %		молярная скорость, мкмоль/л в 1 ч	
	контроль	опыт	контроль	опыт
До опыта	7,50±0,44		51,7±5,15	
1-е	2,96±0,49*	4,66±0,97*	21,8±4,41*	25,0±4,73*
2-е	6,27±1,19	5,66±1,08	35,5±3,44*	34,7±6,14*
4-е	7,48±0,50	8,52±1,27	47,5±6,01	105,7±9,76*,**
6-е	4,59±0,66*	10,94±1,25*,**	32,8±8,23	97,8±19,41*,**
10-е	3,90±0,81*	6,12±1,19	30,9±0,20*	51,3±3,44*,**
30-е	6,85±1,10	9,27±0,57*	39,8±3,41	75,2±15,1**

Примечание. Здесь и в табл. 2: одна звездочка — достоверность различий по сравнению с исходными данными; две — по сравнению с контролем.

и активность ЛХАТ. Оказалось, что содержание общего и эстерифицированного холестерина в ЛПВП уменьшилось в 8 раз у контрольных и подопытных крыс через 24 ч после операции, затем повысилось к 4-м суткам до 50 % исходных значений и сохранялось на этом уровне у контрольных крыс до конца наблюдения, а у подопытных к 30-м суткам нормализовалось. Следовательно, частичная гепатэктомия привела к уменьшению количества ЛПВП, являющихся основным субстратом ЛХАТ-реакции. В результате через 24 ч после операции резко снижена скорость эстерификации холестерина в кровеносном русле. Если учитывать дефицит субстрата, то сниженную скорость эстерификации холестерина следовало ожидать во все сроки наблюдения. Однако динамика изменений фракционной и молярной скоростей эстерификации холестерина не подтвердила это предположение. Поэтому причину изменений эстерифицирующей холестерин активности сыворотки крови необходимо искать в свойствах фермента.

Для подтверждения этого предположения была исследована зависимость скорости ЛХАТ-реакции от концентрации протеолипосом на 4, 6 и 10-е сутки после частичной гепатэктомии. При этом концентрация неэстерифицированного холестерина в протеолипосомах проб возрастала от 2,5 до 49,7 нмоль, что соответствовало диапазону концентраций холестерина в сыворотке крови от 125 до 2485 мкмоль/л [10]. Полученные кинетические кривые представлены на рис. 3. В трактовке сложного характера кинетиче-

ской кривой была использована рабочая гипотеза о наличии в сыворотке крови смеси молекулярных форм ЛХАТ [5, 10].

При формальном анализе кинетических кривых установлено, что у контрольных крыс спустя 4 сут после операции зависимость скорости ЛХАТ-реакции от концентрации субстрата представлена куполообразной формой с максимумом при 24,9 нмоль/проба, или 1245 мкмоль/л. На 6-е сутки наблюдения в кинетической кривой появляются 2 пика, причем пик в правой части кривой зарегистрирован при меньшей концентрации субстрата (31,1 нмоль/проба, или 1555 мкмоль/л), чем у интактных крыс. Обращает на себя внимание, что практически все исследованные точки на кинетических кривых на 4-е и 6-е сутки наблюдения достоверно превышали исходные значения. Спустя 10 сут после операции форма кинетической кривой напоминала кривую у интактных крыс, но отсутствовало плато, а пик в правой части кривой находился в области меньших концентраций неэстерифицированного холестерина протеолипосом. После введения препарата ФСП изменения в кинетических кривых были менее выраженными. По всей видимости, во все сроки наблюдения в сыворотке крови присутствовали обе молекулярные формы ЛХАТ. Нормализация зависимости скорости ЛХАТ-реакции от концентрации субстрата наступала у подопытных крыс раньше, поскольку форма кинетической кривой у них на 6-е сутки наблюдения была такой же, как у контрольных крыс на 10-е сутки.



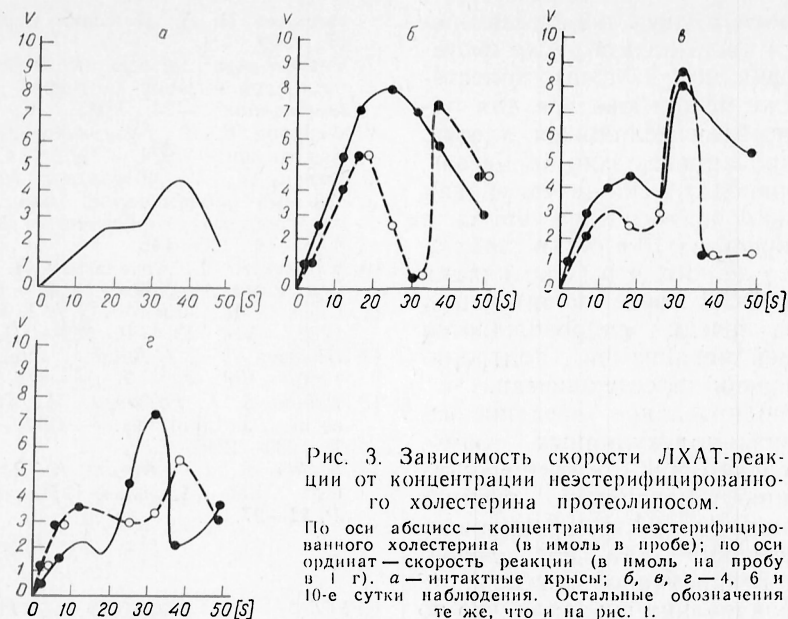


Рис. 3. Зависимость скорости ЛХАТ-реакции от концентрации незэтерифицированного холестерина протеолипосом.

По оси абсцисс — концентрация незэтерифицированного холестерина (в нмоль в пробе); по оси ординат — скорость реакции (в нмоль на пробу в 1 г). а — интактные крысы; б, в, г — 4, 6 и 10-е сутки наблюдения. Остальные обозначения те же, что и на рис. 1.

Активность ЛХАТ, рассчитанная по линейному участку кривых, и величины  $K_M$  и  $V_{max}$  для ферментативного препарата сыворотки крови, найденные в координатах  $S/V$  от  $S$  в диапазоне концентраций субстрата от 2,5 до 18,6 нмоль/проба, приведены в табл. 2. Как видно, у контрольных крыс активность ЛХАТ повышена в интервале 4—6 сут наблюдения, что может быть связано с необходимостью сохранения нормальной молярной скорости эстерификации холестерина в этом периоде в условиях дефицита субстратных ЛПВП. Однако свойства фермента на 4-е и 6-е сутки не одинаковы. По кинетическим кривым и величинам  $K_M$  и  $V_{max}$  можно сделать предварительное заключение, что на 4-е сутки восстановительного процесса в сыворотке крови присутствует большее количество фермента с несколько менее выраженным сродством к субстрату, чем у интактных крыс. На 6-е сутки наблюдения в сыворотке крови обнаруживает-

ся более активный фермент с высоким сродством к субстрату. После введения препарата ФСП описанные изменения сохранялись, но были выражены в меньшей степени.

Особое внимание следует обратить на механизм более ранней нормализации уровня эфиров холестерина в сыворотке крови подопытных крыс к 10-м суткам наблюдения (см. рис. 2). Это результат действия более активного фермента при более высокой величине  $V_{max}$  ЛХАТ-реакции и практически нормальном сродстве субстрата к ферменту. Если учесть, что форма кинетической кривой была близка таковой у интактных крыс, можно считать ферментное обеспечение процесса эстерификации холестерина в сыворотке крови близким к нормализации. Но на 10-е сутки после операции у подопытных крыс зарегистрировано более интенсивное, чем в контроле, деление ядерных клеток. Следовательно, незэтерифицированный холестерин мог

Таблица 2

Характеристика ЛХАТ-реакции в сыворотке крови крыс после частичной гепатэктомии

Срок наблюдения, сут	Активность ЛХАТ, мкмоль/л в 1 ч		$K_M$ , ммоль/л		$V_{max}$ , ммоль/л в 1 ч	
	контроль	опыт	контроль	опыт	контроль	опыт
До опыта	46,7±9,3		0,6		0,158	
4-е	124,7±4,5*	55,7±4,4**	0,82	0,75	0,631	0,203
6-е	157,7±22,7*	88,5±6,1*,**	0,20	0,34	0,250	0,148
10-е	80,8±15,1	114,1±5,5*	0,50	0,55	0,217	0,323

использоваться в двух процессах: переводиться в кровеносном русле системой эстерификации в эфиры холестерина, а также использоваться для построения мембран делящихся клеток. Несбалансированность этих процессов, вероятно, приводит к снижению уровня неэстерифицированного холестерина в сыворотке крови на 10-е сутки наблюдения. А это значит, что стимуляция препаратом ФСП восстановительных процессов в печени сопровождается мобилизацией механизмов, контролирующих уровень холестерина в крови.

Итак, дополнительное введение эндогенных низкомолекулярных термостабильных факторов, стимулирующих пролиферацию гепатоцитов, требует большего расхода неэстерифицированного холестерина для обеспечения ускоренной репаративной регенерации печени. Исследования показали, что по динамике холестеринемии и холестеринэстерифицирующей активности сыворотки крови можно судить о состоянии восстановительных процессов в поврежденной печени.

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Абакумова О. Ю., Котаев А. Ю., Карагулян С. Р. и др. // *Вопр. мед. химии.* — 1985. — № 5. — С. 95—97.
2. Биохимические методы исследования в клинике / Под ред. А. А. Покровского. — М., 1969. — С. 292—294.
3. Иванова Е. М., Никифорова А. А., Алкнис Е. Г. // *Вопр. мед. химии.* — 1985. — № 6. — С. 123—127.
4. Лопухин Ю. М., Арчаков А. И., Владимиров Ю. А., Коган Э. М. *Холестериноз.* — М., 1983.
5. Никифорова А. А., Иванова Е. М., Алкнис Е. Г. // *Бюл. экпер. биол.* — 1985. — № 2. — С. 158—161.
6. Нормальная и патологическая цитология паренхимы печени / Бреслер В. М., Черно-

градская Н. А., Пильщик Е. М. и др. — Л., 1969.

7. Современные методы исследования липопротеидов высокой плотности: (Метод. рекомендации). — М., 1983. — С. 3—7.
8. Федуров В. В., Кузьменко И. В. // *Вопр. мед. химии.* — 1974. — № 2. — С. 172—177.
9. Чиркин А. А., Коневалова Н. Ю. // *Всесоюзный биохимический съезд, 5-й: Тезисы стендовых сообщений.* — М., 1986. — Т. 3. — С. 145—146.
10. Чиркин А. А., Коневалова Н. Ю. // *Вопр. мед. химии.* — 1987. — № 6. — С. 124—128.
11. Chen C. H., Albers J. J. // *J. Lipid Res.* — 1982. — Vol. 23. — P. 680—691.
12. Glomset J. A. // *Advanc. intern. Med.* — 1980. — Vol. 25. — P. 91—116.
13. Robins S. J., Fasulo J. M., Collins M. A. et al. // *J. Lipid Res.* — 1985. — Vol. 26. — P. 1230—1240.
14. Stokke K. J., Norum K. R. // *Scand. J. clin. Lab. Invest.* — 1971. — Vol. 27. — P. 21—27.

Поступила 15.03.88

#### EFFECT OF FACTORS, STIMULATING HEPATOCYTE PROLIFERATION, ON ESTERIFICATION OF CHOLESTEROL IN BLOOD SERUM DURING LIVER TISSUE REGENERATION

*N. Yu. Konevalova, I. A. Chirkina, A. A. Chirkin*

Chair of Biochemistry, Medical School, Vitebsk

Two-step regeneration of rat liver tissue was observed after partial hepatectomy. The first step involved mitosis of hepatocytes and the second step—division of the cells containing two nuclei and hypertrophy of hepatocytes. Both these steps of liver tissue regeneration were accompanied by hypercholesterolemia and a decrease in the cholesterol esterification activity in blood serum. The factors, stimulating hepatocyte proliferation, accelerated the reparative liver tissue regeneration due to activation of mitosis and the early division of the cells containing two nuclei. At the same time, the highest regeneration of the cholesterol esterification system was detected in circulation.

УДК 612.822.1.015.3:547.466.3].08

*В. А. Розанов, В. М. Копелевич, И. В. Савицкий*

#### ИЗМЕНЕНИЯ В СИСТЕМЕ ГАМК ГОЛОВНОГО МОЗГА ПРИ МНОГОКРАТНОМ ИНЪЕЦИРОВАНИИ ПИРИДОКСАЛЬ-5'-ФОСФАТА И ЕГО ШИФФОВА ОСНОВАНИЯ С ГАМК

Одесский медицинский институт им. Н. И. Пирогова

В последнее время пиридоксаль-5-фосфат (ПАЛФ) как коферментный препарат широко применяется при лечении различных поражений централь-

ной нервной системы (ЦНС). Обоснованность его применения в психоневрологии базируется на представлениях о его направленном активирующем вли-