

— белки плазмы крови выполняют весьма важную функцию в регуляции гормондепонирующей способности эритроцитов;

— как в случае инкубации эритроцитарной массы в буферных растворах с различной величиной pH, так и при воздействии ультрафиолетового облучения на образцы цельной крови обнаружена закономерная динамика уровня трийодтиронина в отличие от тироксина.

С нашей точки зрения, роль белков плазмы крови в реализации гормондепонирующей функции эритроцитов заслуживает углубленного исследования. Не исключено, что белки крови, в первую очередь альбумины, являясь полианионами, определенным образом ориентируют фосфолипидные молекулы плазматической мембраны эритроцитов [2], облегчая нековалентное связывание полярными группировками фосфолипидов галогенизированных углеводов, каковыми являются тиреоидные гормоны. В то же время эритроциты человека обладают способностью депонировать не только трийодтиронин, но и его физиологически менее активный предшественник — тироксин. Если предположить, что биологическое назначение эритроцитарного пула тироксина и трийодтиронина состоит в оптимизации транспорта гормонов к компетентным тканям, то правомерно поставить вопрос об адекватных стимулах, определяющих количественные параметры заполнения и использования эритроцитарного депо. Выбранный нами интервал величин pH инкубационного раствора, конечно, не соответствует физиологическому диапазону значений, характерных для данного показателя. Однако модель, предусматривающая анализ зависимости количественных показателей эритроцитарного пула тиреоидных гормонов от величины pH среды, является достаточно перспективной, поскольку тиреоидные гормоны — одни из наиболее мощных регуляторов энергетического обмена клетки, а скорость генерации протонов — весьма важный показатель интенсивности обменных процессов в организме.

Обсуждая перспективность использования ультрафиолетового облучения в качестве простого и надежного теста трийодтирониндепонирующей способности эритроцитов, уместно сделать несколько замечаний. Корреляционный анализ параметров тиреоидного статуса не выявил отрицательной корреляции между уровнями тироксина и трийодтиронина. Также не обнаружено статистически значимого изменения концентрации тиреоглобулина на фоне возрастающей концентрации трийодтиронина. Совокупность приведенных фактов свидетельствует о

том, что зависимое от продолжительности экспозиции ультрафиолетового облучения возрастание уровня трийодтиронина не является следствием фотоактивации конверсии тироксина, а обусловлено выходом депонированной формы гормона. В противном случае существовала бы тесная отрицательная корреляция между содержанием тироксина и трийодтиронина, а концентрация тиреоглобулина снижалась пропорционально степени фотоактивации конверсии тироксина и высвобождению йода [5].

Таким образом, полученные нами результаты свидетельствуют о том, что фонд тиреоидных гормонов, депонированных в эритроцитах человека, во много раз превышает концентрацию данных веществ в плазме крови, а ультрафиолетовое облучение *in vitro* образцов цельной крови можно использовать как простой и эффективный тест в лабораторной практике.

Выводы

1. Эритроциты человека обладают способностью депонировать значительные количества тироксина и трийодтиронина.
2. *In vitro* установлено, что на гормондепонирующую способность эритроцитов оказывают влияние физико-химические (величина pH и наличие белка в инкубационной среде) и физические (ультрафиолетовое облучение, $\lambda = 254$ нм) факторы.

ЛИТЕРАТУРА

1. Верещагина Г. В., Трапкова А. А., Кацулина А. П. // Успехи соврем. биол. — 1991. — Т. 111, вып. 1. — С. 59—72.
2. Максименко О. О., Иванов Н. Н., Фельдштейн М. М. и др. // Биол. мембраны. — 1986. — Т. 3, № 7. — С. 697—703.
3. Сандуляк Л. И. // Докл. АН СССР. — 1974. — Т. 219, № 4. — С. 408—409.
4. Сандуляк Л. И., Ковалев В. П. // Пробл. эндокринологии. — 1978. — Т. 24, № 5. — С. 77—78.
5. Gradas A., Domek H. // Acta Biochim. Pol. — 1993. — Vol. 40, N 2. — P. 237—240.
6. Osty J., Laurence J., Jacques F., Blondeau J.-P. // Endocrinology. — 1988. — Vol. 123, N 5. — P. 2303—2311.
7. Osty J., Valensi P., Michel S. et al. // J. clin. Endocrinol. Metab. — 1990. — Vol. 71, N 6. — P. 1589—1595.

Поступила 18.07.2000

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2001

УДК 616.153.455-008.64-06:616.8]-008.9-074-092.9

П. К. Телушкин, А. Д. Ноздрачев, П. П. Потапов

АКТИВНОСТЬ ФЕРМЕНТОВ ДЕЗАМИНИРОВАНИЯ В МОЗГЕ КРЫС В ВОССТАНОВИТЕЛЬНОМ ПЕРИОДЕ ПОСЛЕ ИНСУЛИНОВОЙ ГИПОГЛИКЕМИИ

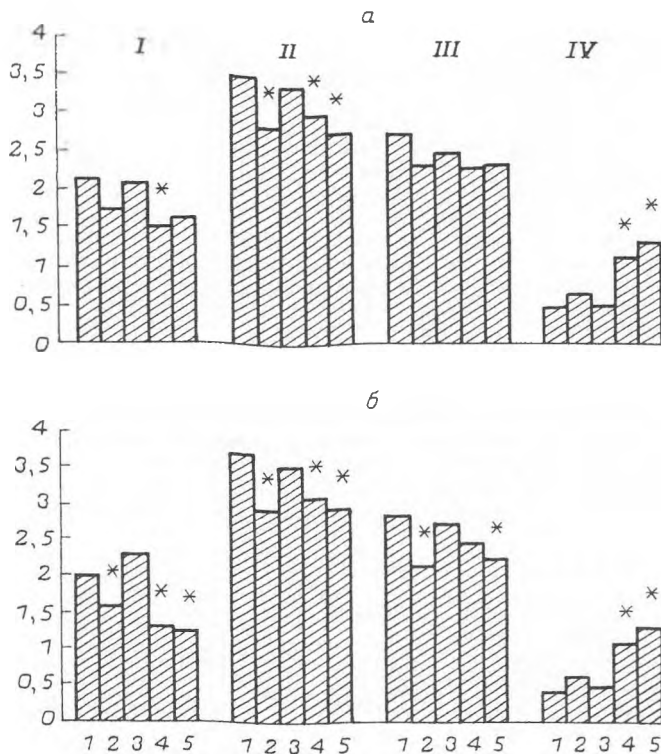
Ярославская государственная медицинская академия, Государственный университет, Санкт-Петербург

У крыс, находящихся в состоянии гипогликемической комы (40 ЕД инсулина на 1 кг массы тела), через 12 и через 48 ч после купирования однократной комы глюкозой и у животных, перенесших 5—7 гипогликемических ком с интервалом 2 дня и забитых на 2-е сутки после последней комы, в больших полушариях и стволе мозга оценивали активность моноаминоксидазы (КФ 1.4.3.4), глутамины (КФ 3.5.1.2), аденозинмонофосфатдезаминазы (КФ 3.5.4.6) и глутаматдегидрогеназы (КФ 1.4.1.3). Обнаружены изменение субстратной специфичности моноаминоксидазы, увеличение активности аденозинмонофосфатдезаминазы и уменьшение активности глутамины в состоянии гипогликемической комы и в различные сроки восстановительного периода. Выявленные изменения являются результатом окислительного стресса и могут иметь значение в патогенезе постгипогликемической энцефалопатии.

Activities of monoaminoxidase (KP 1.4.3.4), glutaminase (KP 3.5.1.2), adenosine monophosphate deaminase (KP 3.5.4.6), and glutamate dehydrogenase (KP 1.4.1.3) in the brain hemispheres and stem were evaluated in rats in a state of hypoglycemic coma (40 U insulin/kg), 12 and 48 h after a single glucose arrest of coma, and in animals subjected to 5-7 hypoglycemic comas at 2-day intervals and sacrificed after the last coma. The substrate specificity of monoaminoxidase was changed, adenosine monophosphate dehydrogenase activity increased, and glutaminase activity decreased in hypoglycemic coma and in various terms of recovery after coma. The detected changes result from oxidative stress and can be involved in the pathogenesis of posthypoglycemic encephalopathy.

Гипогликемия — состояние, связанное с передозировкой инсулина в ходе лечения сахарного диабета и с гиперпродукцией гормона при инсулиноме поджелудочной железы, приводит к постгипогликемической энцефалопатии, механизмы развития которой требуют дальнейшего изучения [2, 5, 11, 12].

Одной из причин возникновения энцефалопатий различного генеза являются нарушения процессов дезаминирования в нервной ткани, поскольку дезаминаты мозга катализируют реакции синтеза и катаболизма нейромедиаторов и энергетического обмена.



Активность МАО в БА (а) и СТ (б) мозга крыс в восстановительном периоде после однократной и возобновляющейся инсулиновой гипогликемии ($M \pm m$). I, 2, 3, 4, 5 — группы животных. I — серотонин; II — триптамин; III — дофамин; IV — глюкозамин. В каждой серии было по 5–8 животных. Звездочкой обозначены статистически достоверные изменения ($p < 0,05$). По осям ординат — активность МАО (в нмоль/мин/мг белка).

В настоящей работе исследована активность дезаминирующих ферментов в мозге крыс в состоянии гипогликемической комы (ГГК) и в восстановительном периоде после однократной и возобновляющейся тяжелой инсулиновой гипогликемии.

Материалы и методы

Опыты выполнены на белых беспородных крысах обоего пола массой 180–200 г. Все животные содержались на обычном рационе и перед опытом голодали в течение 18–24 ч. Воду получали без ограничения. Экспериментальные животные были разделены на следующие группы: 1-я — интактные животные (контроль); 2-я — крысы, находящиеся в состоянии ГГК; 3-я — через 12 ч после купирования ГГК; 4-я — через 48 ч после купирования комы; 5-я — животные, перенесшие 5–7 ГГК с интервалом 2 дня и декапитированные на 2-е сутки после последней комы. ГГК (содержание глюкозы в крови менее 1 ммоль/л) вызывали внутримышечной инъекцией инсулина в дозе 40 ЕД на 1 кг массы, купирование проводили ведением коматозным животным 30 мл 40% раствора глюкозы в желудок.

Исследовали ткани больших полушарий (БП) и ствола (СТ) мозга. Суммарную фракцию митохондрий получали методом дифференциального центрифугирования. Активность моноаминоксидазы (МАО, КФ 1.4.3.4) определяли, используя в качестве субстратов серотонин, креатининсульфат, тирамин гидрохлорид, дофамин гидрохлорид в концентрациях, оптимальных для митохондрий головного мозга крыс [1], и глюкозамин в конечной концентрации 10 мМ. После изотермической отгонки по Конвею и несселеризации содержание аммиака определяли спектрофотометрически.

Глутаминазную (ГЛТ, КФ 3.5.1.2) и аденозинмонофосфатдезаминазную (АМФ-Д, КФ 3.5.4.6) активности также оценивали по накоплению аммиака. Среда инкубации при определении активности ГЛТ включала в себя калий-фосфатный буфер pH 7,6, 50 мМ глутамин, 10 мМ АТФ и 0,1–0,2 мг белка митохондрий. При определении АМФ-Д — 10 мМ АМФ, 5 мМ АТФ и 0,1–0,2 мг белка цитоплазматической или митохондриальной фракции.

Пробы инкубировали в течение 30 мин при 37°C. Реакцию останавливали охлаждением проб до 0°C, белки осаждали ТХУ с последующим центрифугированием. К 0,05–0,2 мл супернатанта прибавляли 5 мл безаммиачной воды, 0,1 мл реактива Несслера и регистрировали изменение оптической плотности при 400 нм в течение 15 с [4]. Активность глутаматдегидрогеназы (ГДГ, КФ 1.4.1.3) оценивали спектрофотометрически [6]. Количество белка определяли по Лоури. Результаты экспериментов обрабатывали статистически с применением *t*-критерия Стьюдента.

Результаты и их обсуждение

У крыс, находящихся в состоянии ГГК, обнаружено уменьшение активности МАО в БП и СТ при использовании в качестве субстратов серотонина, триптамина и дофамина на 17–28%, более выраженное и статистически достоверное в структурах СТ, и отмечена тенденция к увеличению накопления аммиака при инкубации митохондриальной фракции с глюкозаминном (30–36%; $p > 0,05$) (см. рисунок). Активность ГЛТ оказалась сниженной на 10%, АМФ-Д увеличилась на 15% в исследованных отделах мозга (см. таблицу). Через 12 ч после купирования ГГК статистически достоверных изменений большинства исследованных показателей не обнаружено.

У крыс, забитых через 48 ч после купирования первой комы и на 2-е сутки после купирования последнего эпизода гипогликемии из серии ГГК, выявлено уменьшение активности МАО на 20–29% при использовании природных субстратов фермента и выраженное увеличение скорости дезаминирования глюкозамина (в 2–3 раза) в исследованиях отделов мозга. У животных, перенесших серию гипогликемических ком, наблюдали также увеличение активности АМФ-Д в БП и СТ, более выраженное в цитоплазматической фракции (22–45%), при этом активность ГЛТ оказалась сниженной в СТ на 15%, а в БП — на 33%. Изменений активности ГДГ во всех сериях эксперимента не выявлено.

МАО обнаруживает высокую чувствительность к окислительному стрессу, которая выражается в снижении активности при использовании специфических субстратов, и к расширению спектра относительной специфичности фермента [3]. В этом отношении выявленные изменения активности МАО полностью согласуются с обнаруженным ранее уменьшением толерантности к окислительному стрессу нервной ткани животных, подвергнутых многократной гипогликемии [10], и связаны, по-видимому, с окислением тиоловых групп фермента активными формами кислорода. С другой стороны, окисление МАО веществ, в норме не являющихся субстратами фермента, приводит к увеличению продукции активных форм кислорода и дальнейшей активации пероксидного окисления липидов (ПОЛ), ускорению катаболизма компонентов клеточных мембран, а также к дополнительному образованию аммиака в нервной ткани.

Скорость АМФ-Д-реакции существенно зависит от величины аденилатного энергетического заряда [8]. Нейрогликопения является энергодефицитным состоянием и сопровождается накоплением АМФ в мозге [13], с чем может быть связано увеличение активности АМФ-Д, выявленное в настоящем исследовании. Регенерация АМФ из инозинмонофосфата требует аспар-

Активность АМФ-Д, ГЛТ и ГДГ (в нмоль/мин/мг белка) в мозге крыс в восстановительном периоде после однократной и возобновляющейся инсулиновой гипогликемии ($M \pm m$)

Показатели	Отдел мозга	Группа животных				
		1-я	2-я	3-я	4-я	5-я
АМФ-Д:						
надосадо	БП	30,2±1,4	35,3±1,7*	33,0±1,3	31,4±1,8	39,4±2,2*
	СТ	28,5±1,1	34,2±1,4*	30,9±0,9	30,5±1,3	41,3±2,5*
митохондрии	БП	32,5±1,6	36,7±1,8	30,7±1,5	29,9±1,7	39,6±1,9*
	СТ	29,3±1,2	33,6±1,5*	30,1±1,7	28,5±1,6	37,3±1,5*
ГЛТ	БП	73,3±0,8	65,5±2,0*	79,8±1,6*	67,1±1,3*	49,4±3,2*
	СТ	64,7±1,3	58,3±2,0*	66,5±1,7	63,4±1,9	55,3±2,7*
ГДГ	БП	267±18	273±15	262±20	275±15	265±11
	СТ	264±15	261±14	273±17	259±21	250±18

Примечание. В каждой серии проводили 5–8 опытов. Звездочкой обозначены статистически достоверные изменения ($p < 0,05$).

тата, поэтому одной из причин уменьшения уровня аспартата в нервной ткани в восстановительном периоде после возобновляющейся гипогликемии [9] может быть использование этой аминокислоты в образовании АМФ.

Увеличение активности АМФ-Д имеет, по-видимому, неблагоприятные последствия, поскольку именно АМФ-Д-реакция служит одним из основных количественно важных источников свободного аммиака в тканях и является лимитирующим этапом катаболизма адениловых нуклеотидов. Образование и последующее окисление гипоксантина и ксантина в ксантиноксидазной реакции сопровождается продукцией супероксид-анион-радикала, что также должно способствовать стимуляции процессов ПОЛ в нервной ткани при гипогликемии.

Активность ГЛТ уменьшается в состоянии ГГК, снижена через 48 ч после однократной гипогликемии и на 2-е сутки восстановительного периода после купирования последней из серии гипогликемических ком.

ГГК сопровождается освобождением глутамата нервными окончаниями и резким увеличением концентрации глутамата и аспартата во внеклеточном пространстве мозга, что обеспечивает эксайтотоксическую природу повреждения нейронов при гипогликемии [11]. Уровень метаболического пула глутамата и глутамин в нервной ткани в состоянии ГГК, напротив, значительно уменьшается, поскольку эти аминокислоты интенсивно используются в мозге в качестве энергетических субстратов при нейрогликопении [9, 13]. Это приводит к существенному увеличению содержания аммиака в нервной ткани. Вероятно, значительные колебания уровня глутамата, глутамина и аммиака в мозге в состоянии ГГК и в восстановительном периоде являются факторами, приводящими к изменению активности ГЛТ, катализирующей образование в мозге нейротрансмиссерного пула глутамата [7]. Причиной уменьшения активности ГЛТ при гипогликемии может быть также повреждение фермента в результате окислительного стресса. Независимо от конкретных механизмов снижения активности ГЛТ может иметь значение в уменьшении потенциальных возможностей глутаматергической передачи в ЦНС в результате перенесенной гипогликемии.

Таким образом, как в состоянии ГГК, так и в восстановительном периоде наблюдаются изменения субстратной специфичности МАО и активности АМФ-Д, способные приводить к увеличению образования активных форм кислорода и накоплению аммиака в нервной ткани. Это может служить одной из причин повреждения нейронов и иметь значение в развитии постгипогликемической энцефалопатии. Выявленные изменения, по-видимому, являются результатом окислительного стресса [10] и отражают этапы развития эксайтотоксического процесса при гипогликемии и в восстановительном периоде после купирования ГГК глюкозой.

Необходимо отметить, что нарушения, возникающие в восстановительном периоде после серии ГГК, более выражены, чем в восстановительном периоде после однократной гипогликемии. Полученные результаты свидетельствуют о том, что многократная гипогликемия создает явно измененный метаболический фон для развития последующих гипогликемий. Таким образом, существенное значение в патогенезе постгипогликемической энцефалопатии может иметь именно то обстоятельство, что гипогликемия в ходе лечения сахарного диабета и при инсуломе поджелудочной железы наблюдается неоднократно [2, 5, 11, 12].

Выводы

1. Тяжелая инсулиновая гипогликемия приводит к изменению субстратной специфичности МАО, увеличению активности АМФ-Д и уменьшению активности ГЛТ в мозге. Выявленные изменения наблюдаются также в восстановительном периоде после купирования комы глюкозой.

2. Нарушения метаболизма в мозге более выражены в восстановительном периоде после неоднократно перенесенной гипогликемии.

ЛИТЕРАТУРА

1. Вережкина И. В., Аснина В. В., Горкин В. З., Машковский М. Д. // Нейрохимия. — 1987. — № 3. — С. 332—339.
2. Генес С. Н. Гипогликемия. Гипогликемический симптомокомплекс. — М., 1970.
3. Горкин В. З. Аминооксидазы и их значение в медицине. — М., 1981.
4. Лебедева З. И., Березов Т. Т., Орехович В. Н. // Биохимия. — 1981. — Вып. 1. — С. 85—91.
5. Лукьянчиков В. С., Балаболкин М. М. Гипогликемический синдром (Этиология, патогенез, диагностика, лечение). — М., 1987. — Вып. 1.
6. Методы биохимических исследований: Липидный и энергетический обмен / Под ред. М. И. Прохоровой. — Л., 1992.
7. Нейрохимия / Под ред. И. П. Ашмарина, П. В. Стукалова. — М., 1996.
8. Пекель В. А. // Успехи соврем. биол. — 1980. — Вып. 3. — С. 377—393.
9. Телушкин П. К., Шидловская Т. Е. // Вопр. мед. химии. — 1996. — № 4. — С. 306—308.
10. Телушкин П. К. // Пробл. эндокринол. — 1998. — № 3. — С. 35—38.
11. Auer R. N., Siesjo B. K. // Baillieres Clin. Endocrinol. Metab. — 1993. — Vol. 7, N 3. — P. 611—625.
12. Marks V., Teale J. D. // Ibid. — P. 705—729.
13. Siesjo B. K., Agardh C. D. // Handb. Neurochem. — 1983. — Vol. 3. — P. 353—379.

Поступила 17.01.2000

◆ НАМ ПИШУТ

В последнее время в средствах массовой информации, а также с помощью разного рода официальных и неофициальных документов потребителям и врачам активно и весьма агрессивно предлагается "новый" метод борьбы с дефицитом йода, основанный на широком использовании продуктов питания, обогащенных йодказеином, а также приеме биологически активных добавок (БАД) на основе йодказеина.

К сожалению, аргументированная дискуссия по поводу использования йодказеина весьма затруднена тем фактом, что в научной литературе мы не обнаружили публикаций на данную тему. Вместе с тем в ряде газет ("Вечерняя Москва", "Новая газета", "Комсомольская правда") уже были опубликованы хвалебные статьи об йодказеине. Заказной характер этих публикаций совершенно очевиден: полностью идентичные статьи с одинаковыми иллюстрациями (но за подписью разных "авторов") были напечатаны практически одновременно в 3 газетах, причем в "Новой газете" даже двукратно. В связи с этим в качестве источника информации об йодказеине нами использована научная справка "О гигиенической оценке йодсодержащих продуктов", подготовленная Медицинским радиологическим научным центром РАМН, на которую одному из авторов этого письма пришлось готовить ответ. Другим источником сведений об йодказеине явилась статья "Йодированный белок молока — йодказеин как альтернативный продукт для ликвидации йодной недостаточности" (авторы акад. РАМН А. Ф. Цыб, доктор мед. наук В. В. Шахтарин, канд. мед. наук Р. А. Розиев, канд. биол. на-

ук С. И. Черняев, О. В. Томчани), которая была опубликована в Интернете в дискуссионном разделе по патологии щитовидной железы "Тиронет" (<http://rusmedserv.thyronet.com>).

Во всех опубликованных и неопубликованных статьях и документах данной группы авторов выдвигаются 3 основных постулата. 1. Йодированная соль является неадекватным носителем для йода, приводящим к ряду негативных состояний. 2. Йодказеин — новый альтернативный продукт, имеющий значительное преимущество перед йодированной солью и другими обогащенными йодом продуктами. 3. Программа ликвидации йодного дефицита в России должна опираться на широкое использование БАД и продуктов питания, обогащенных йодказеином.

В настоящем письме нам хотелось бы высказать свою точку зрения относительно как научной, так и практической стороны использования йодказеина.

Йодказеин и йодированная соль

Разработчики и производители йодказеина признают, что обогащение поваренной соли йодидом или йодатом калия является наиболее распространенным методом борьбы с йодным дефицитом в мировом масштабе. Вместе с тем они решили, что при реализации программы ликвидации йодной недостаточности у населения путем использования йодированной соли якобы возникли серьезные проблемы, связанные с техникой йодирования соли, ее хранением до использования в пищу, а также с биологическими эффектами передозировки организма неорганическим йодом.