

Архив журнала

## Вопросы медицинской химии

*ISSN 0042-8809*

1985

**Внимание!** Распознавание текста проведено в автоматическом режиме для облегчения работы поисковых систем. Будьте внимательны при копировании, возможны ошибки и неточности. Используйте сканированный графический вариант.

Archive of journal

## Voprosy meditsinskoi khimii

*ISSN 0042-8809*

1985

**Attention!** OCR has been performed automatically for search engines only. Be careful when copying, errors are possible. Use scanned picture as standard.

<http://pbmc.ibmc.msk.ru>

ТОМ XXXI

ВЫПУСК 5

СЕНТЯБРЬ — ОКТЯБРЬ

Двухмесячный научно-теоретический журнал

Основан в 1955 г.

ВОПРОСЫ  
МЕДИЦИНСКОЙ  
ХИМИИ



МОСКВА. МЕДИЦИНА. 1985



РЕДАКЦИОННАЯ КОЛЛЕГИЯ:

Главный редактор С. С. ДЕБОВ

В. И. МАЗУРОВ (зам. главного редактора), Т. Т. БЕРЕЗОВ, Е. Н. ГЕРАСИ-  
МОВА, В. З. ГОРКИН, И. Б. ЗБАРСКИЙ, А. Н. КЛИМОВ, Б. Ф. КОРОВКИН,  
Л. А. ЛОКШИНА, В. Н. ОРЕХОВИЧ, Л. Ф. ПАНЧЕНКО, М. Ш. ПРОМЫСЛОВ,  
Е. Л. РОЗЕНФЕЛЬД, Ю. А. РОМАКОВ (ответственный секретарь), В. А. САКС,  
С. Е. СЕВЕРИН, В. Б. СПИРИЧЕВ

РЕДАКЦИОННЫЙ СОВЕТ:

БАЕВ А. А. (Москва)  
БЕЛИЦЕР В. А. (Киев)  
БЫЧКОВ С. М. (Москва)  
КОНСТАНТИНОВ А. А. (Хабаровск)  
КУДРЯШОВ Б. А. (Москва)  
ЛЯХОВИЧ В. В. (Новосибирск)  
ПАСХИНА Т. С. (Москва)

ТРОИЦКИЙ Г. В. (Симферополь)  
ТАРАКУЛОВ Я. Х. (Ташкент)  
ТЯХЕПЫЛЬД Л. Я. (Тарту)  
УТЕВСКИЙ А. М. (Харьков)  
ШАПОТ В. С. (Москва)  
ЯКОВЛЕВ Н. Н. (Ленинград)  
ЯСАЙТИС А. А. (Вильнюс)

Адрес редакции журнала:

Москва, Солянка, 14

АМН СССР

Тел. 297-16-44

Зав. редакцией Л. А. Фирсова

1983

## О РЕГУЛЯЦИИ СВОБОДНО-РАДИКАЛЬНОГО ОКИСЛЕНИЯ ЛИПИДОВ ЛЕГОЧНЫХ СУРФАКТАНТОВ

НИИ клинической и экспериментальной хирургии им. А. Н. Сызганова Минздрава  
Казахской ССР

Сурфактанты — поверхностно-активные вещества (ПАВ) легочной ткани, секретируемые пневмоцитами II типа и формирующие поверхностную выстилку альвеол, терминальных участков бронхов и плевральной полости [5, 11, 13, 15]. Сурфактанты легочной ткани обладают более высокой поверхностной активностью по сравнению с другими ПАВ организма и, снижая поверхностное натяжение в интерфазе вода — воздух практически до нуля, обеспечивают растяжимость и эластичность легкого, улучшают транспорт кислорода через аэрогематический барьер, предупреждают спадение альвеол на выдохе [1, 3, 14].

Свойства сурфактантов определяются особенностями их липидного состава (который существенно отличается от состава других липидных структур организма) и ориентацией липидного монослоя, обращенного своей гидрофобной частью в просвет альвеол и претерпевшего структурные перестройки соответственно фазе дыхания [8].

Два специфических только для поверхностной выстилки альвеол белка сурфактанта с молекулярной массой 35 000 и 11 000 Д гидрофобны и играют структурную роль [10]. В сурфактантах легкого может протекать свободно-радикальное окисление (СРО), которое индуцируется при контакте с кислородом воздуха, озоном,  $\text{NO}_2$  и другими реакционно-способными компонентами. При форсированном дыхании с сопротивлением на вдохе отмечена убыль в первую очередь именно мононенасыщенных фосфолипидов [6]. Можно полагать, что не только аэродинамические факторы, но и СРО регулирует скорость синтеза, секреции и деградации сурфактанта. Какие-либо биохимические, гормональные, рефлекторные факторы, контролирующие обмен ПАВ легких, не выявлены. В настоящей работе представлены данные о видовых особенностях СРО липидов сурфактантов легкого, активности антиокислительных систем и возможности их регуляции.

### Методика

Эксперименты поставлены на кроликах массой 1,5—2 кг и собаках массой 16—18 кг. Ткань легкого человека для исследования получали у больных, оперированных по поводу бронхоэктатической болезни; при исследованиях использовали участки легкого без морфологических изменений.

Гипоксию у собак вызывали двойным последовательным выключением сердца из кровообращения после торакотомии путем пережатия полых вен общей продолжительностью 25 мин. Собакам вводили  $\alpha$ -токоферолацетат в дозе 200 мг/сут в течение 5 дней.

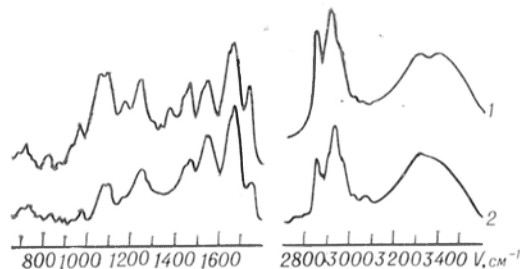
Сурфактант выделяли из 20% гомогенатов легочной ткани [4, 9].

ИК-спектры лиофилизированных препаратов сурфактанта исследовали на спектрофотометре UR-20 («C. Zeiss»). Образцы готовили в виде таблеток с KBr в вакуумной пресс-форме.

Интенсивность перекисного окисления липидов (ПОЛ) изучали как описано Fodashi и соавт. [7]. Состав среды инкубации для исследования аскорбатзависимого перекисления (АЗП): 50 мМ трис-HCl буфер pH 7,5, 1,5 мМ аскорбиновая кислота,  $12 \cdot 10^{-6}$  М  $\text{Fe}^{2+}$ ; для исследования НАДФ-Н-зависимого перекисления (НЗП): 50 мМ трис-HCl pH 7,5,  $12 \cdot 10^{-6}$  М  $\text{Fe}^{2+}$ , 1 мМ НАДФ-Н,  $2 \cdot 10^{-4}$  М АТФ. Для исследования специфического взаимодействия малонового диальдегида (МДА) с тиобарбитуровой кислотой (ТБК) биологический материал обрабатывали раствором 20% уксусной кислоты, содержащей 0,27 М HCl pH 3,5 [12]. Продукты реакции наиболее полно экстрагировали смесью *n*-бутанола и пиридина (15 : 1 объем/объем). Оптическую плотность измеряли при 532 нм, количество МДА выражали в наномолях на 1 мг белка.

Количество витамина Е в сурфактанте регистрировали спектрофлуориметрически («Hitachi» 650/660), при длинах волн возбуждения  $\lambda$  295 нм и эмиссии 323 нм.

Тонкослойную хроматографию липидов сурфактанта проводили на пластинках с



Поглощение сурфактантов (1) и микросом (2) легкого в ИК-области.

Активность свободно-радикального окисления сурфактанта легкого (в нмоль МДА на 1 мг белка в 1 ч)

Вид материала	Число животных	МДА ( $M \pm m$ )	Спонтанное перекисное окисление	АЗП	НЗП
Сурфактант:					
кролика	25	$0,20 \pm 0,01$	$0,050 \pm 0,010$	$0,55 \pm 0,10$	$0,84 \pm 0,10$
собаки	7	$0,022 \pm 0,002^*$	$0,020 \pm 0,006$	$0,12 \pm 0,01^*$	$0,22 \pm 0,02^*$
человека	5	$0,09 \pm 0,01^*$	$0,060 \pm 0,010$	$0,13 \pm 0,01^*$	$0,71 \pm 0,01$
Микросомы:					
кролика	25	$0,20 \pm 0,07$	$0,14 \pm 0,03^{**}$	$1,20 \pm 0,10^{**}$	$1,58 \pm 0,22^{**}$
собаки	7	$0,06 \pm 0,01^{**}$	$0,033 \pm 0,005$	$0,08 \pm 0,02$	$0,30 \pm 0,02$
человека	5	$0,05 \pm 0,01^{**}$	$0,05 \pm 0,01$	$0,10 \pm 0,02$	$0,85 \pm 0,09$

\* Различия по сравнению с данными для кролика достоверны.

\*\* Различия между показателями сурфактанта и микросом достоверны.

силикагелем в среде этиловый эфир — петroleйный эфир — ледяная уксусная кислота (9 : 90 : 1).

Антиокислительную активность (АОА) определяли на модели термического окисления метилового эфира олеиновой кислоты. За величину АОА липидов принимали разницу в периодах индукции окисления метилолеата в присутствии липидов ( $\tau$ ) и чистого метилолеата ( $\tau_0$ ), деленную на концентрацию липидов ( $C$ ) в метилолеате:

$$АОА = \frac{\tau - \tau_0}{C}.$$

## Результаты и обсуждение

Методами ИК-спектроскопии установлено сходство структур сурфактанта легочной ткани биологических мембран: ИК-спектры сурфактанта легкого (см. рисунок) имели характерные для белковой и липидной фракций мембран полосы поглощения, особенно при 1730, 2850 и 2900  $\text{см}^{-1}$ , что свидетельствует о высоком содержании липидов.

Возможность образования реагирующих с ТБК продуктов была изучена на очищенных сурфактантах легкого при

спонтанном (инкубации в среде без инициаторов ПОЛ) или индуцированном аскорбатом и НАДФ·Н перекислении (табл. 1).

Скорость НАДФ·Н-зависимого перекисления была существенно выше, чем аскорбатзависимого. Сурфактант легкого человека по уровню спонтанного перекисного окисления оказался менее стабильным, чем таковой экспериментальных животных.

Ферментативная природа СРО подтверждена его чувствительностью к пара-хлормеркурибензоату (пХМБ) и нагреванию (табл. 2).

Наличие НАДФ·Н-зависимой системы СРО во фракции сурфактанта предполагает присутствие терминального звена цитохромов, которые были идентифицированы методом дифференциальной спектрофлуориметрии. В сурфактантах легких экспериментальных животных были обнаружены полосы поглощения, характерные для цитохромов  $b_5$ ,  $P_{450}$  и  $P_{420}$ .

Интенсивность спонтанного и индуцированного ПОЛ в сурфактанте и микросомальной фракции легких были сопоставимы. Однако резистентность сурфактанта к перекислению оказалась несколько выше по сравнению с мембранами эндоплазматического ретикулума возможно в связи с большим содержанием в нем насыщенных жирных кислот.

Биологическое значение СРО сурфактантов, по-видимому, состоит в обеспечении физиологической деградации полиенольных фосфолипидов; в условиях патологии эти процессы могут

Таблица 2

Влияние п-ХМБ и нагревания на НАДФ·Н-зависимое ПОЛ сурфактанта легкого кролика

Условия опыта	МДА, нмоль на 1 мг белка	Изменения по сравнению с контролем, %
Сурфактант легкого кролика (контроль)	0,51	100
То же + п-ХМБ	0,15	29
То же + нагревание (100 °С, ... мин)	0,07	14

Влияние гипоксии и  $\alpha$ -токоферола на СРО сурфактанта легкого собаки

Условия опытов	МДА, нмоль на 1 мг белка в 1 ч	Спонтанное перекисное окисление	АЗП	НЗП
Контроль	0,022 $\pm$ 0,002	0,020 $\pm$ 0,006	0,12 $\pm$ 0,01	0,22 $\pm$ 0,02
Гипоксия	0,07 $\pm$ 0,01	0,070 $\pm$ 0,008*	0,41 $\pm$ 0,03*	1,77 $\pm$ 0,11*
Гипоксия + токоферол	0,08 $\pm$ 0,02*	0,026 $\pm$ 0,004*	0,45 $\pm$ 0,09*	1,05 $\pm$ 0,17*

\* Различия по сравнению с контролем достоверны.

быть причиной глубокой деструкции ПАВ легких.

Ранее в гомогенатах легочной ткани была обнаружена супероксиддисмутаза, глутатионпероксидаза и глутатионредуктаза [2]. В сурфактанте легкого кролика, собаки и человека имеется корреляция между активностью супероксиддисмутазы и глутатионпероксидазы ( $r = 0,839$ ), между скоростью НАДФ·Н-зависимого перекисного окисления, а также активностью супероксиддисмутазы и глутатионпероксидазы (0,999 и 0,061 соответственно).

Таким образом, активации ферментативного ПОЛ соответствовала более эффективная система ферментативных антиоксидантов, которые для легкого имеют особенно большое значение. Это тем более вероятно, что АОА липидной вытяжки из легких значительно меньше, чем АОА других органов (печень, почки).

Исследована скорость изменения АОА легкого при острой циркуляторной гипоксии, вызванной остановкой сердца, которую можно представить в виде математической функции, подобранной экспериментально и более полно описывающей полученные данные:

$$\text{АОА} = \text{АОА}_0 (e^{-at} - bt).$$

Коэффициент  $a$  для легкого составил 0,15, а для сердца, коркового и мозгового слоев почек — 0,05. Значение этого факта становится понятным, если учесть, что на уровне сурфактанта снижение АОА приводит к уменьшению резистентности к ПОЛ с последующими ателектазами (табл. 3).

В связи с этим становится понятным, что при любых стрессорных воздействиях повреждения сурфактанта могут быть обусловлены активацией СРО.

В этом случае было бы целесообразно корректировать АОА сурфактанта экзо-

генными антиоксидантами. Возможность включения  $\alpha$ -токоферола в липидную фазу сурфактанта была изучена в эксперименте на собаках. У животных, получавших  $\alpha$ -токоферол, его содержание в сурфактанте достигало 2,5 мкг на 1 мг белка. При тонкослойной хроматографии липидов сурфактанта  $\alpha$ -токоферол выявлялся в зоне с  $R_f = 40$  мм, фосфолипидный состав сурфактанта (в процентном отношении от общего весового количества) соответствовал данным литературы [4].

Результаты проведенных исследований показали, что ПАВ легочной ткани, выстилающие альвеолы, имеют подобную биологическим мембранам структуру, состав которой регулируется, кроме прочих факторов, протекающими в ней свободно-радикальными реакциями. Изменение АОА, скорости спонтанного и индуцированного ПОЛ сурфактанта легкого в условиях циркуляторной гипоксии коррелирует с активностью антиокислительных ферментов. Антиокислительные свойства сурфактанта, определяющие резистентность альвеол пневмоцитов, ограничены и могут регулироваться путем включения экзогенных антиоксидантов.

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Биркун А. А., Нестерова Е. Н., Кобозев Г. В. Сурфактант легких. Киев, 1981.
2. Верболович В. П., Петренко Е. П., Подгорный Ю. К. — В кн.: Сурфактанты легкого в норме и патологии. Киев, 1983, с. 98—108.
3. Федосеев Г. Б., Лаврова Т. Р., Жихарев С. С. Клеточные и субклеточные механизмы защиты и повреждения бронхов и легких. Л., 1980, с. 46—59.
4. Abrams M. E. — J. appl. Physiol., 1966, v. 21, p. 718—720.
5. Clements J. A., King R. J. — In: Biochemical Basis of Pulmonary Function. New York, 1976, p. 363—387.

6. Faridy E. E.— Resp. Physiol., 1976, v. 27, p. 323—334.
7. Fodashi O. H., Nogueshi A. H., Cantor M. L. et al.— Nutrition, 1973, v. 103, p. 1502—1511.
8. Groniowski J.— Acta med. pol., 1971, v. 12, p. 303—317.
9. King K. J.— Fed. Proc., 1974, v. 33, p. 2238—2247.
10. King R., Martin H., Mills D. et al. J. appl. Physiol., 1977, v. 42, p. 483—491.
11. Massaro D.— J. Lab. clin. Med., 1982, v. 98, p. 155—165.
12. Ohkawa H., Ohishi N., Yagi K.— Analyt. Biochem., 1979, v. 95, p. 358—361.
13. Tierney D. F.— Ann. Rev. Physiol., 1974, v. 36, p. 209—232.
14. Winsel K., Iwainisky H.— Pharmazie, 1980, Bd 35, S. 575—581.
15. Yorke J.— Biochim. biophys. Acta, 1974, v. 344, p. 241—261.

Поступила 10.05.84

## REGULATION OF FREE RADICAL OXIDATION IN LIPIDS OF LUNG SURFACTANTS

V. P. Verbovolovich, E. P. Petrenko, Yu. K. Podgorodny

A. N. Syzganov Institute of Clinical and Experimental Surgery, Ministry of Public Health of the Kazakh SSR, Alma-Ata

Surface-active substances of lung tissue, covering the alveoli, resembled the biological membranes in their structure. Their composition was controlled, among the other factors, also by free radical oxidation reactions. Under conditions of circulatory hypoxia the activity of antioxidative enzymes correlated with the alterations in antioxidative activity, with the rates of spontaneous and inducible lipid peroxidation in lung surfactants. As surfactant exhibited a limited antioxidative activity important for resistance of alveol pneumocytes, their functions may be controlled by various exogenous antioxidants.

УДК 612.111.7.015.321.014.46:577.175.8591-08

С. А. Макаров, Г. В. Кудрявцева, А. И. Колотилова

## ВЛИЯНИЕ ТРОМБИНА И ПРОСТАГЛАНДИНОВ СЕРИЙ E<sub>2</sub> И F<sub>2α</sub> НА НЕКОТОРЫЕ РЕАКЦИИ УГЛЕВОДНОГО ОБМЕНА В ТРОМБОЦИТАХ ЧЕЛОВЕКА

Ленинградский университет

В реакциях пентозофосфатного пути (ПФП) обмена углеводов участвует свыше 10% метаболизируемой в тромбоцитах глюкозы, что обеспечивает высокий уровень энергетического и пластического обмена этих форменных элементов крови [17]. Действие агрегирующих агентов на кровяные пластинки приводит к перестройке метаболизма углеводов в сторону усиления гликолитических процессов [20]. Хотя имеются данные о влиянии агрегирующих агентов на отдельные реакции ПФП тромбоцитов [1, 6, 8, 19], вопрос о регуляции этого пути обмена углеводов под влиянием факторов свертывания и противосвертывания до сих пор не решен окончательно. В ранее опубликованных работах [6, 7] установлен разнонаправленный эффект действия тромбина и простагландинов (ПГ) E<sub>2</sub> и F<sub>2α</sub> на ключевые реакции ПФП тромбоцитов. Известно, что тромбин стимулирует окисление арахидоновой кислоты с образованием эндоперекисей, простагландинов и тромбоксанов. Полагают, что в основе стимулирующего действия индукторов агрегации лежат два различных механизма:

активация биосинтеза ПГF<sub>2α</sub> и подавление биосинтеза ПГE<sub>2</sub> [3]. В связи с этим представлялось целесообразным продолжить исследование влияния названных регуляторов агрегации тромбоцитов на их метаболизм. В настоящей работе на фоне действия ПГ исследовали влияние тромбина на реакции ПФП, глутатионоксиоредуктазу и лактатдегидрогеназу кровяных пластинок человека.

### Методика

Кровяные пластинки выделяли из свежей консервированной крови человека (250 мл) методом дифференциального центрифугирования [9]. Тромбоциты суспендировали в 20 мл инкубационной среды следующего состава (в г/л): NaCl — 8; KCl — 0,2; NaHCO<sub>3</sub> — 1, NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> — 0,05, CaCl<sub>2</sub> — 0,306, MgCl<sub>2</sub> — 0,203; глюкоза — 1; pH среды 7,35. В полиэтиленовые пробирки отбирали по 2 мл суспензии клеток, содержащей 5 мг общего белка тромбоцитов. В пробы вносили 0,1 мл 0,1% раствора ПГE<sub>2</sub> или ПГF<sub>2α</sub> (производства экспериментального участка опытно-технической базы АН Эстонской ССР, Таллин) и 2 ед. на пробу человеческого тромбина (производства Каунасского химико-фармацевтического завода). Объем проб доводили указанным солевым раствором до 2,5 мл.