

Архив журнала

## Вопросы медицинской химии

*ISSN 0042-8809*

1989 том 35 выпуск 3

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

## Voprosy meditsinskoï khimii

The journal archive

*ISSN 0042-8809*

1989 volume 35 issue 3

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

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

ТОМ 35

ВЫПУСК 3

МАЙ — ИЮНЬ

Двухмесячный научно-теоретический журнал

Основан в 1955 г.

# ВОПРОСЫ МЕДИЦИНСКОЙ ХИМИИ



МОСКВА · МЕДИЦИНА · 1989



## РЕДАКЦИОННАЯ КОЛЛЕГИЯ:

Главный редактор С. С. ДЕБОВ

В. Б. СПИРИЧЕВ (зам. редактора), И. П. АШМАРИН, Т. Т. БЕРЕЗОВ, А. А. ВАСИЛЬЕВ, Е. Н. ГЕРАСИМОВА, В. З. ГОРКИН, И. Б. ЗБАРСКИЙ, В. Л. КОЗЕЛЬЦЕВ (ответственный секретарь), А. И. КЛИМОВ, Б. Ф. КОРОВКИН, Л. А. ЛОКШИНА, В. Н. ОРЕХОВИЧ, Л. Ф. ПАНЧЕНКО, М. Ш. ПРОМЫСЛОВ, Е. Л. РОЗЕНФЕЛЬД, Ю. А. РОМАКОВ, В. А. САКС, С. Е. СЕВЕРИН, В. А. ТУТЕЛЬЯН

## 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)

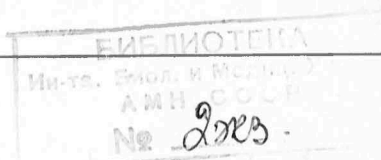
ТУРАКУЛОВ Я. Х. (Ташкент)

ТЯХЕПЫЛД Л. Я. (Тарту)

ШАПОВ В. С. (Москва)

ЯКОВЛЕВ Н. Н. (Ленинград)

ЯСАЙТИС А. А. (Вильнюс)



*Е. И. Мельник, М. Л. Циренина, А. Н. Ушаков, Н. А. Колтовая,  
О. В. Боброва, Б. В. Крехнов, Н. М. Смольникова, Р. У. Островская*

## НЕКОТОРЫЕ БИОХИМИЧЕСКИЕ ПОКАЗАТЕЛИ У КРЫС ПРИ АНТЕНАТАЛЬНОЙ АЛКОГОЛИЗАЦИИ

Институт прикладной молекулярной биологии Минздрава СССР, Москва; НИИ фармакологии АМН СССР, Москва

Алкогольный синдром плода — новая форма патологии, привлекающая к себе внимание в последние годы в связи с общим признанием патогенного действия алкоголя на плод [6, 18]. Неоспорим факт внутриутробного действия этанола на статус ЦНС формирующегося организма [7]. Имеются данные, свидетельствующие о возможности внутриутробного формирования алкоголизма [6]. К сожалению, неоднократно отмечаемые в опытах на животных морфологические и поведенческие сдвиги после антенатального воздействия алкоголя зачастую не были сопоставлены с нарушениями биохимического статуса на молекулярном и клеточном уровнях. Тем не менее показано, что у потомства крыс, алкоголизированных в течение беременности, снижено содержание биогенных аминов в сыворотке крови и в некоторых отделах мозга [21]. Отмечалось снижение уровня связанных синаловых кислот в синапсомембранных мембранах, выделенных из мозга 20-дневных крысят, антенатально, а затем и постнатально подвергавшихся действию алкоголя [24]. Сообщалось о снижении активности некоторых мембраносвязанных ферментов при хронической алкогольной интоксикации плода [15]. Однако эти малочисленные данные с трудом поддаются обобщению, так как даже незначительные методические несоответствия (доза алкоголя, возраст потомства) не позволяют составить комплексную картину развившихся аномалий.

Вместе с тем, помимо частной задачи детального биохимического описания алкогольного синдрома плода, изучение потомства, внутриутробно получавшего алкоголь, может послужить решению и более общих проблем, связанных с универсальным механизмом действия алкоголя на клеточные структуры.

Учитывая известные данные об участии ЦНС в формировании алкоголь-

ной зависимости [1, 3, 13], а также выраженное влияние этанола на состав и функции клеточных мембран организмов, подвергавшихся хроническому воздействию алкоголя [5, 10, 26], мы предприняли исследование, позволяющее одновременно оценить сдвиги в ЦНС, базируясь на состоянии центральных и периферических катехоламинергических звеньев, а также выявить отклонения от нормы в составе эритроцитарных и нейрональных мембран антенатально алкоголизированных животных.

Предлагаемый нами перечень параметров, подлежащих определению, продиктован сформировавшимся в течение последних лет представлением о возможном механизме алкогольных поражений клеток нейрональной ткани, который предполагает активное вмешательство этанола в строго сбалансированный механизм регуляции клеточного гомеостаза. Как известно, одним из путей регуляции клетки является гидролиз мембранных полифосфоинозитидов (точнее, фосфатидилинозит-4,5-дифосфата) до соответствующего инозиттрифосфата и диацилглицерина — синергично функционирующих вторичных мессенджеров, регулирующих интенсивность высвобождения нейротрансмиттеров через промежуточную стадию активации  $\text{Ca}^{2+}$ -зависимых протеинкиназ [8, 28]. Ингибирование гидролиза фосфоинозитидов, осуществляемое механизмами, обеспечивающими отрицательную обратную связь (как предполагается, с помощью активации цАМФ- и цГМФ-зависимых протеинкиназ), должно проявляться в торможении нейрональной активности и снижении активного пула катехоламинов [28].

В этот строго сбалансированный механизм этанол, по-видимому, может вмешиваться двояко: либо стимулируя рассматриваемый распад полифосфоинозитидов, либо, напротив, тормозя его. В частности, ингибирование гидролиза этанолом недавно было показано для клеток печени [12]. В свою очередь со-

общалось и об увеличении в присутствии этанола интенсивности  $K^{+}$ -стимулированного гидролиза фосфоинозитидов синаптосомальных мембран этанол-зависимых животных [16]. В связи с этим нам казалось интересным оценить состояние инозитидной регуляторной системы у крысят, внутриутробно подвергавшихся воздействию алкоголя.

В качестве показателей интенсивности распада полифосфоинозитидов были выбраны следующие параметры: содержание фосфатидилинозит-4,5-дифосфата в мозге (в процентах от суммы фосфолипидов), содержание норэпинефрина и дофамина в плазме крови [17].

Особое внимание мы уделяли определению содержания серотонина в мозге и плазме крови, учитывая его способность стимулировать фосфоинозитидный гидролиз [9], а также продлевать период толерантности к этанолу, приобретенной в процессе хронической алкоголизации [23].

В настоящее время можно считать установленной важную роль синаловых кислот в связывании  $Ca^{2+}$  синаптосомальной мембраной и их участие в регуляции высвобождения нейротрансмиттеров [20]; учитывая эти данные, мы включили уровень связанных синаловых кислот мозга в число определяемых параметров.

Наше внимание привлекли также данные о зависимости функциональной активности  $Ca^{2+}$ -зависимых протеинкиназ от фосфолипидного состава мембранного окружения, в частности активация протеинкиназы C в присутствии фосфатидилсерина [28]. Этот факт навел на мысль о возможном участии фосфатидилсерина в проявлении влияния этанола на клеточные структуры.

Поскольку в литературе отсутствует единое мнение о роли холестерина клеточных мембран в формировании толерантности к алкоголю [11, 22], мы включили в перечень исследуемых параметров и соотношение холестерина: фосфолипиды.

#### Методика

Исследования проводили на 20-дневных крысятах, матери которых в течение всей беременности получали через зонд 25 % раствор этанола в воде в дозе 5 г/кг (9 животных). Контрольную группу составили 7 животных.

Левое полушарие мозга непосредственно по-

сле декапитации животного гомогенизировали с 1,5 мл 0,1 н.  $HClO_4$ , центрифугировали (3 мин, 8000 g). 200 мкл супернатанта использовали для определения норэпинефрина, дофамина и серотонина с помощью ВЭЖХ на жидкостном хроматографе фирмы LKB (Швеция); колонка Lichrosorb RP-18. Элюцию проводили 0,5 М фосфатным буфером pH 3,8 с добавкой 80 мг/л гексансульфоната натрия, содержащего 4 % метанол. Количественный расчет хроматограмм производили на интеграторе CR-2AX фирмы «Shimadzu» (Япония), используя метод абсолютной калибровки. Детектирование осуществляли с помощью спектрофлуориметра фирмы «Hitachi» модель 650-60 (Япония) с проточной кюветой объемом 10 мкл;  $\lambda_{возб}$  280 нм,  $\lambda_{эмисс}$  320 нм.

Правое полушарие мозга экстрагировали дважды [14], в полученном водно-метанольном растворе определяли связанные синаловые кислоты по методу [25]. Для извлечения полифосфоинозитидов остаток ткани, экстрагированной по методу [14], повторно экстрагировали по методу [2]. В объединенных экстрактах определяли процентный состав фосфолипидов методом ТСХ в системе хлороформ — метанол — концентрированный аммиак (60:40:5); обнаружитель — реагент Васильковского [27]. Сканирование хроматограмм производили на денситометре фирмы «Camag» (ФРГ) при длине волны 585 нм. Соотношение холестерина/фосфолипиды определяли в аликвотной части экстракта суммарных липидов мозга методом ТСХ в системе: серный эфир — хлороформ — метанол — уксусная кислота (4:5:0,2:0,02). Обнаружитель — 0,6 % раствор бихромата калия в 50 % серной кислоте. Сканирование хроматограмм производили на денситометре при длине волны 547 нм. Экстракты эритроцитарной массы [14] анализировали аналогичным образом.

Кровь (0,5—1 мл), отобранную при декапитации животного, после добавления гепарина обрабатывали по методу [26]. Для определения серотонина надосады после отделения окиси алюминия обрабатывали 75 мкл 60 % хлорной кислоты, осадок отделяли, раствор обрабатывали 10 % NaOH до pH 3,5. 100 мкл полученного раствора использовали для анализа методом ВЭЖХ в условиях, описанных выше.

#### Результаты и обсуждение

Как видно из таблицы, статистически достоверным является увеличение содержания фосфатидилинозитидфосфата в фосфолипидных фракциях мозга крыс, антенатально подвергавшихся воздействию алкоголя. Достоверным является и уменьшение уровня серотонина в мозге, а также увеличение содержания серотонина в плазме.

Очевидно, увеличение уровня мембранных полифосфоинозитидов, как и уменьшение высвобождения дофамина, являются косвенными свидетельствами ингибирования гидролиза мембранных фосфоинозитидов в мозге крыс при хронической внутриутробной алкоголиза-

Влияние антенатальной алкоголизации на некоторые биохимические показатели в мозге и крови крыс ( $\bar{X} \pm S_x$ )

Объект исследования	Показатель	Контроль	Опыт
Мозг	Серотонин } нг на 10 мг ткани	22,5±0,8	19,6±1,0*
	Дофамин } нг на 10 мг ткани	7,8±0,5	9,3±0,87*
	Норадреналин } нг на 10 мг ткани	2,3±0,2	2,3±0,2
	Фосфатидилинозитидфосфат } % от суммы	2,8±0,3	4,8±0,5**
	Фосфатидилсерин } фосфолипидов	23,0±1,0	12,0±1,7**
	Холестерин/фосфолипиды } отн. ед.	1,13±0,05	0,87±0,05**
	Сиаловые кислоты } отн. ед.	110,0±11,8	115,0±6,4
Кровь	Серотонин } нг на 1 мл плазмы	378,7±73,0	624,0±134,0**
	Дофамин } нг на 1 мл плазмы	6,07±2,90	0,19±0,10*
	Норадреналин } нг на 1 мл плазмы	9,18±2,90	6,82±1,75
	Холестерин/фосфолипиды в мембранах эритроцитов, отн. ед.	0,68±0,05	0,66±0,05

Примечание. Одна звездочка —  $p \leq 0,05$ , две —  $p \leq 0,01$ .

ции. Как уже отмечалось выше, такое ингибирование в свою очередь должно приводить к уменьшению нейрональной активности. К аналогичному эффекту, по-видимому, приводит и уменьшение содержания в мозге фосфатидилсерина за счет ингибирования фосфатидилзависимой протеинкиназы С.

Таким образом, представляется вполне вероятным, что при систематическом антенатальном потреблении алкоголя в нейрональной ткани развиваются адаптационные процессы, приводящие к уменьшению уровня катехоламинов, ответственных за регуляцию пролиферации на ранних стадиях онтогенеза.

Можно предположить, что в последующий постнатальный период в отсутствие непрерывно поступающего в кровь алкоголя организм пытается купировать возникшую серьезную аномалию, инициируя распад полифосфоинозитидов, возможно, с помощью серотонина, высвобождение которого в этот период значительно увеличено и в мозге, и на периферии.

Некоторое увеличение уровня дофамина в мозге при резком его уменьшении в плазме является еще одним косвенным свидетельством сформировавшегося при внутриутробной интоксикации плода синдрома отмены, проявляющегося, в частности, в изменении нейрональной активности даже спустя достаточный интервал времени после отмены этанола.

Не вызывают удивления неизменный уровень норадреналина и в мозге, и в плазме, а также неизменившееся коли-

чество связанных сиаловых кислот (фрагментов ганглиозидов и гликопротеинов клеточной поверхности), так как к моменту определения животные в течение 20 дней не получали алкоголь, а отмеченные параметры принадлежат к числу реагирующих лишь на острое воздействие этанола.

Вполне объяснимо также отсутствие изменений в соотношении холестерина/фосфолипиды в мембранах эритроцитов, так как через несколько дней после отмены алкоголя этот показатель приходит в норму. Уменьшение же соотношения холестерина/фосфолипиды в мозге явилось неожиданностью прежде всего из-за несовпадения с результатом, полученным на эритроцитах, поскольку эритроциты считаются универсальной и доступной моделью для выявления алкогольных поражений клетки благодаря неспецифичности мембранотропного эффекта этанола [3]. С другой стороны, некоторыми авторами отмечалась обратная связь между содержанием холестерина в мембранах и их способностью связывать  $\text{Ca}^{2+}$  [4]. Полученные нами результаты подтверждают это наблюдение. В наших опытах увеличению уровня полифосфоинозитидов, косвенно свидетельствующему о повышении связывания  $\text{Ca}^{2+}$  мембраной, способствует уменьшение соотношения холестерина/фосфолипиды.

Таким образом, для характеристики состояния ЦНС, а также структуры клеточных мембран предложено 11 параметров, позволяющих составить достаточно полное представление об от-

клонениях от нормы, формирующихся в процессе антенатальной алкоголизации животных.

# ЛИТЕРАТУРА

1. Анохина И. П., Коган Б. М. // Токсикология. — М., 1984. — Т. 13. — С. 151—178.
2. Бергельсон Л. Д. и др. // Препаративная биохимия липидов. — М., 1981. — С. 183—185.
3. Буров Ю. В., Ведерникова Н. И. Нейрохимия и фармакология алкоголизма. — М., 1985.
4. Комиссарова И. А., Ротенберг Ю. С., Мастеропуло А. П. Механизмы действия этанола и подходы к коррекции обменных нарушений при хронической алкоголизации. — М., 1986.
5. Майский А. И., Ведерникова Н. И., Чистяков В. В., Лакин В. В. Биологические аспекты наркоманий. — М., 1982.
6. Abel E. L. // Drug Alcohol Depend. — 1984. — Vol. 14, N 1. — P. 1—10.
7. Barrison J. G., Wright J. T. // Alcohol a. Alcoholism. — 1984. — Vol. 19, N 2. — P. 167—172.
8. Berridge M. J. // Biochem. J. — 1984. — Vol. 220. — P. 345—360.
9. Berridge M. J., Fain I. M. // Ibid. — 1979. — Vol. 178. — P. 59—69.
10. Bourhis B. L., Beauge F., Aufrere G., Nordman R. // Alcoholism. — 1986. — Vol. 10. — P. 337—342.
11. Chin J. H., Goldstein D. B. // Lipids. — 1984. — Vol. 19, N 12. — P. 929—935.
12. Crews F. T., Theiss C., Gonzales R. A. // Alcohol a. Alcoholism. — 1986. — Vol. 21, N 2.
13. Fadda F., Gessa G. L. // Progr. Alcohol. Res. — 1985. — Vol. 1. — P. 147—161.
14. Folch J., Less M., Sloane-Stanley G. H. // J. biol. Chem. — 1957. — Vol. 226. — P. 497—509.
15. Guerri C. // Alcohol a. Alcoholism. — 1986. — Vol. 21, N 2.
16. Hudspeth M. J., Brennan C., Charles S., Littleton J. M. // Ibid.
17. MHPG. Basic Mechanisms and Psychopathology / Ed. J. W. Maas. — New York, 1983.
18. Niermeijer M. F. // T. Alcohol. — 1984. — Vol. 10, N 3. — P. 108—114.
19. Nimura N., Ishida K., Kinoshita T. // J. Chromatogr. — 1980. — Vol. 221. — P. 249.
20. Nishimura M., Kozuki S. et al. // Life Sci. — 1984. — Vol. 35. — P. 2435—2441.
21. Shoemaker W. J., Buetge G., Azad R. et al. // Drugs and Hormones in Brain Development. — Basel, 1983. — P. 130—139.
22. Smith T. L. // J. Pharmacol. exp. Ther. — 1985. — Vol. 232, N 3. — P. 702—707.
23. Speisky M., Kalant H. // Alcohol a. Alcoholism. — 1986. — Vol. 21, N 2.
24. Stibler H., Burns E., Kruckeberg T. et al. // Progr. Alcohol. Res. — 1985. — Vol. 1. — P. 37—49.
25. Suzuki K. // Life Sci. — 1964. — Vol. 3. — P. 1227—1233.
26. Thomas P. K. // Acta med. scand. — 1984. — Suppl. 703. — P. 251—264.
27. Vaskovsky V. E., Kostetsky E. J. // J. Lipid Res. — 1968. — Vol. 9, N 3. — P. 396—399.
28. Yasutomi Nishizuka // Science. — 1984. — Vol. 225. — P. 1365—1370.

Поступила 21.04.88

## THE ALCOHOL SYNDROME IN FETUS. SOME BIOCHEMICAL PATTERNS

E. I. Mel'nik, M. L. Tsirenina, A. N. Ushakov, N. A. Kollovaya, O. V. Bobrova, B. N. Krachkov, N. M. Smol'nikova, R. U. Ostrovskaya

Institute of Applied Molecular Biology, Ministry of Public Health of the USSR, Institute of Pharmacology, Academy of Medical Sciences of the USSR, Moscow

A number of biochemical parameters have been determined which characterized the state of CNS and the structure of cell membranes in antenatally alcoholized animals. As compared with the control group the alcoholized animals had a significantly increased level of phosphatidyl inositol diphosphate in brain phospholipid fractions, while content of serotonin was reduced in their brain and increased in blood plasma; content of phosphatidyl serine and the cholesterol/phospholipids ratio were reduced in brain.

УДК 616.153.96:577.112.856]-074

Н. В. Медведева, А. Д. Морозкин, И. Н. Горошкова, Э. К. Рууге,  
И. А. Щербакова, Н. В. Перова, А. А. Лякишев

## РАСПРЕДЕЛЕНИЕ ЛИПОПРОТЕИНОВ НИЗКОЙ ПЛОТНОСТИ ПО ФЛОТАЦИОННЫМ ХАРАКТЕРИСТИКАМ В НОРМЕ И ПРИ ДИСЛИПОПРОТЕИДЕМИЯХ

ВКНЦ АМН СССР, Москва

Липопротеины низкой плотности (ЛПНП) играют важную роль в транспорте липидов в организме человека, а также в регуляции метаболизма холестерина в клетках [1]. Нарушения липидного обмена, сопровождающиеся

увеличением концентрации липопротеинов этого класса в плазме, способствуют развитию атеросклероза; повышенный уровень ЛПНП рассматривается как фактор риска заболевания ишемической болезнью сердца (ИБС).