

Научно-исследовательский институт биомедицинской химии имени В.Н.Ореховича

Архив журнала

Вопросы медицинской химии

ISSN 0042-8809

1989

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

1989

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 35

БЫПУСК 5

СЕНТЯБРЬ — ОКТЯБРЬ

Двухмесячный научно-теоретический журнал

Основан в 1955 г.



МОСКВА · МЕДИЦИНА · 1989

ВОПРОСЫ МЕДИЦИНСКОЙ ХИМИИ



РЕДАКЦИОННАЯ КОЛЛЕГИЯ:

Главный редактор С. С. ДЕБОВ

В. Б. СПИРИЧЕВ (зам. редактора), И. П. АШМАРИН, Т. Т. БЕРЕЗОВ, А. В. ВАСИЛЬЕВ, Е. Н. ГЕРАСИМОВА, В. З. ГОРКИН, И. Б. ЗБАРСКИЙ, В. Л. КОЗЕЛЬЦЕВ (ответственный секретарь), А. Н. 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)
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)
ЯКОВЛЕВ Н. Н. (Ленинград)
ЯСАЙТИС А. А. (Вильнюс)

9. Крыжановский Г. Н. // Пат. физиол. — 1987. — № 1. — С. 3—6.
10. Ланкин В. З. // Биохимия липидов и их роль в обмене веществ / Под ред. С. Е. Северина. — М., 1981. — С. 75—95.
11. Ланкин В. З., Гуревич С. М., Бурлакова Е. Б. // Биоантиокислители. — М., 1975. — С. 73—79.
12. Логонов А. С., Матюшин Б. Н., Ткачев В. Д., Павлова Н. М. // Тер. арх. — 1985. — № 2. — С. 63—67.
13. Никушкин Е. В., Крыжановский Г. Н. // Пат. физиол. — 1987. — № 6. — С. 19—24.
14. Панченко Л. Ф., Пирожков С. В., Попова С. В., Антоненков В. Д. // Бюл. экспер. биол. — 1987. — № 4. — С. 407—410.
15. Пентюк А. А., Яковлева О. А., Коновалова Г. Г., Ланкин В. З. Биохимия. — 1987. — Т. 52, № 6. — С. 1009—1012.
16. Урбах В. Ю. Математическая статистика для биологов и медиков. — М., 1963.
17. Хужамбердиев М., Мамадиев М., Горкин В. З. // Вопр. мед. химии. — 1981. — № 6. — С. 829—834.
18. Green F. A., Claesson H.-E. // Biochem. biophys. Res. Commun. — 1986. — Vol. 140, N 3. — P. 782—788.
19. Halliwell B., Gutteridge J. M. C. // TIBS. — 1986. — Vol. 11, N 9. — P. 372—375.
20. Hoensch H. // Pharmacol. Ther. — 1987. — Vol. 33, N 1. — P. 121—128.
21. Lowry O. H., Rosebrough N. J., Farr A. L., Randall R. J. // J. biol. Chem. — 1951. — Vol. 193, N 1. — P. 265—275.
22. Shaw S., Jayatilake E. // Biochem. biophys. Res. Commun. — 1987. — Vol. 143, N 3. — P. 984—990.
23. Tarashi T., Rubin E. // Lab. Invest. — 1985. — Vol. 52, N 1. — P. 120—131.
24. Wilhelm J., Sonka J. // Experienta (Basel). — 1981. — Vol. 37, N 6. — P. 573—574.

Поступила 21.04.88

SPECIFIC PROPERTIES OF LIPID PEROXIDATION IN ALCOHOL INTOXICATION

L. N. Ovchinnikova, V. Z. Gorkin

All-Union Research Centre of Medico-Biological Problems in Narcology, Institute of Biological and Medical Chemistry, Academy of Medical Sciences of the USSR, Moscow

Content of malonic dialdehyde and dynamics of its accumulation in ascorbate-dependent lipid peroxidation (LP), content of diene conjugates, lipid hydroperoxides and lipofuscin-like pigments as well as activity of antioxidant enzymes (superoxide dismutase, glutathione peroxidase and glutathione transferase) were studied in homogenates of liver, lung, heart and kidney tissues of persons suffering from chronic alcoholism during life-time, of persons lost from acute alcohol intoxication as well as of persons not abusing with alcohol during life-time and lost from accidents (control). In chronic alcoholism the rate of ascorbate-dependent LP was distinctly increased in liver tissue as compared with controls or with acute mortal alcohol intoxication, while the rate of the patterns studied was increased in lung tissue of the latter group of patients. At the same time, increase in content of lipofuscin-like pigments and a decrease in the activity of antioxidant enzymes studied were noted.

УДК 616.132-008.939.22+616.155.33-008.939.22]-02:[615.357:577.175.724

А. В. Васильев, Ли Ха Рен, А. Н. Орехов, В. В. Тертов, В. А. Тутельян

ВЛИЯНИЕ ГЛЮКАГОНА И КОНКАНАВАЛИНА А НА АККУМУЛЯЦИЮ ХОЛЕСТЕРИНА ПЕРИТОНЕАЛЬНЫМИ МАКРОФАГАМИ МЫШИ И КЛЕТКАМИ ИНТИМЫ АОРТЫ ЧЕЛОВЕКА

Институт питания АМН СССР, Москва

Многочисленными клиническими и экспериментальными исследованиями убедительно показана роль повышенных концентраций липопротеидов низкой плотности (ЛПНП) в крови как риск-фактора атеросклероза и их значение в формировании белково-липидных образований при атерогенезе [2, 6, 8]. В настоящее время выяснены важнейшие клеточные проявления атеросклероза, расшифрованы некоторые механизмы цитогенеза бляшки, открыты рецепторы для липопротеидов [3, 12, 19].

Вместе с тем детальные механизмы воздействия ЛПНП на сосудистую

стенку остаются неясными. Результаты клинических и патоморфологических наблюдений свидетельствуют о том, что нет простой однозначной зависимости между нарушениями в обмене липопротеидов и пенетрантностью и экспрессивностью атеросклеротических поражений [1, 4]. В связи с этим встает вопрос о причинах атерогенности ЛПНП, путях транспорта ЛПНП в сосудистую стенку и их катаболизме. Однако, если изучению взаимосвязи между структурными особенностями ЛПНП (нативные и модифицированные формы) и их атерогенностью, как и транспорту ЛПНП в

клетку, уделялось исключительно пристальное внимание исследователей [4, 5, 9, 13], то существующие представления о механизме внутриклеточного катаболизма ЛПНП далеко не полные. Имеющиеся сведения дают основание считать, что деградация липопротеидов связана в основном с лизосомальным аппаратом клетки. Так, внутривенное введение крысам лизосомотропного препарата хлорокуина или включение его в культуру фибробластов кожи человека, гепатоцитов кроликов или перитонеальных макрофагов мыши снижало скорость деградации ЛПНП [15, 22], а также влияло на интенсивность внутрилизосомального протеолиза и активность кислых гликозидаз [17, 18]. Учитывая, что лизосомальный аппарат клетки представляет собой многокомпонентную динамичную систему, в настоящей работе мы поставили задачу изучить роль гетерофагической функции лизосом в процессе атерогенеза с использованием индуктора гетеро- и аутофагоцитоза — глюкагона [7] и ингибитора межмембранных взаимодействий — конканавалина А (КонА) [16, 18].

Методика

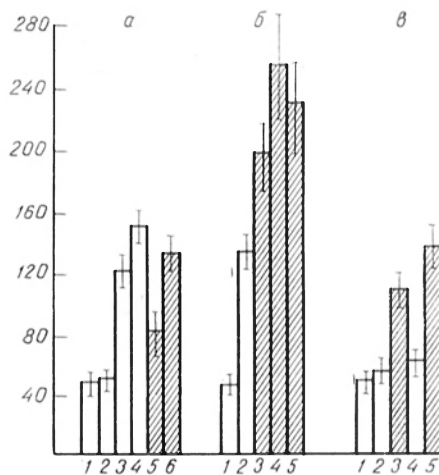
Клетки субэндотелиальной интимы аорты человека получали из свежего аутопсийного материала, взятого через 2—3 ч после внезапной смерти. Клетки выделяли диспергированием атеросклеротической бляшки или непораженных участков интимы 0,15% коллагеназой (тип IV, «Sigma», США) в течение 3—4 ч и сажали в 24-ячеечные культуральные пластинки (плотность посадки $2 \cdot 10^4$ клеток на 1 см^2 , эффективность посадки 50—60%). Клетки культивировали в среде 199, содержащей 10 % эмбриональной телячьей сыворотки, 100 ЕД/мл пенициллина, 100 мкг/мл стрептомицина, 2,5 мкг/мл фунгизона, 2 мМ L-глутамин (Gibco, Великобритания). На 2-й день культивирования в культуру клеток добавляли 20% атерогенную сыворотку (400 мкл среды и 100 мкл исходной сыворотки), полученную от больных ишемической болезнью сердца (ИБС) [14, 21], глюкагон и ^3H -тимидин (1 мКи/мл). В случае КонА через 12 ч после его введения клетки трижды промывали средой и вводили 20% атерогенную сыворотку, нативные или ацетилированные ЛПНП. Выделение ЛПНП из плазмы крови здоровых доноров проводили по методу [11] с последующим ацетилированием с использованием уксусного ангидрида [10].

Через 24 ч клетки трижды промывали изотоническим фосфатным буфером (PBS) и экстрагировали клеточные липиды смесью гексан — изопропанол (3:2 объем/объем). В полученном экстракте определяли содержание холестерина с помощью набора «Boehringer

ger Mannheim» (ФРГ), содержание белка и степень включения ^3H -тимидина [20, 21]. Перитонеальные макрофаги получали от нестимулированных мышей линии BALB/c и помещали в культуральные ячейки (диаметр ячейки 16 мм, плотность посадки $2 \cdot 10^5$ клеток на ячейку) в среде 199, содержащей антибиотик и 10% эмбриональной телячьей сыворотки [12]. После инкубации в течение 4 ч культуры промывали 3—5 раз средой 199 без сыворотки для удаления непривившихся клеток. В дальнейшем макрофаги инкубировали 12 или 24 ч, вводя в культуральную среду в зависимости от характера эксперимента атерогенную сыворотку, ЛПНП, глюкагон или КонА. По окончании инкубации макрофаги 3 раза промывали PBS, 2 раза — PBS, содержащим 0,2% бычьего сывороточного альбумина, и вновь 3 раза PBS, после чего определяли в них содержание холестерина. Жизнеспособность клеток оценивали по выведению трипанового синего.

Результаты и обсуждение

Введение в культуру макрофагов атерогенной сыворотки через 12 и 24 ч вызывало значительное накопление в них холестерина — соответственно до $122,5 \pm 11,0$ и $150,0 \pm 13,6$ мкг на 1 мг белка. Включение в среду на этом фо-



Влияние глюкагона и КонА на накопление холестерина (в мкг на 1 мг белка) в перитонеальных макрофагах мыши при введении в культуру атерогенной сыворотки, нативных и ацетилированных ЛПНП.

а: 1 — 20 % делипидированная сыворотка здорового донора, инкубация 12 ч; 2 — то же, инкубация 24 ч; 3 — 20 % атерогенная сыворотка больного ИБС, инкубация 12 ч; 4 — то же, инкубация 24 ч; 5 — 20 % атерогенная сыворотка больного ИБС+глюкагон ($5 \cdot 10^{-6}$ М), инкубация 12 ч; 6 — то же, инкубация 24 ч. б: 1 — 20 % делипидированная сыворотка здорового донора; 2 — 20 % атерогенная сыворотка больного ИБС; 3 — то же+КонА ($5 \cdot 10^{-6}$ М); 4 — то же+КонА (10^{-6} М); 5 — то же+КонА ($5 \cdot 10^{-6}$ М). в: 1 — контроль; 2 — нативные ЛПНП (0,12 мг белка/мл); 3 — ацетилированные ЛПНП (0,09 мг белка/мл); 4 — нативные ЛПНП+КонА (10^{-7} М); 5 — ацетилированные ЛПНП+КонА (10^{-7} М).

Таблица 1

Влияние глюкогаона на содержание холестерина и пролиферацию атеросклеротических клеток интимы аорты человека ($M \pm m$)

Условия эксперимента	Содержание холестерина, мкг на 1 мг белка	Включение ^3H -тимидина, имп на 1 мкг белка
Контроль	$285,6 \pm 20,7$	$125,6 \pm 11,7$
Глюкогаон, М:		
$5 \cdot 10^{-6}$	$266,8 \pm 24,3$	$110,6 \pm 10,8$
10^{-5}	$190,7 \pm 20,5^*$	$100,2 \pm 12,7$
$5 \cdot 10^{-5}$	$149,9 \pm 21,6^*$	$88,0 \pm 7,0^*$
10^{-4}	$130,7 \pm 16,7^*$	$80,1 \pm 6,2^*$
$5 \cdot 10^{-4}$	$144,7 \pm 21,0^*$	$86,6 \pm 8,0^*$

Примечание. Представлены средние данные 8 опытов. Здесь и в табл. 2 и 3 звездочка— $p < 0,05$.

не глюкогаона сопровождалось спустя 12 ч снижением интенсивности накопления холестерина на 34 % ($p < 0,05$), тогда как через 24 ч подобного эффекта не наблюдалось (см. рисунок). При сочетании введения различных количеств глюкогаона и атерогенной сыворотки в культуру атеросклеротических клеток интимы удалось обнаружить, что в диапазоне концентраций 10^{-5} — $5 \cdot 10^{-4}$ М глюкогаон практически в 2 раза снижал накопление внутриклеточного холестерина, а также степень включения ^3H -тимидина на 30—34 % (табл. 1).

В экспериментах с КонА, выполненных на культуре макрофагов, удалось показать потенцирующее действие этого препарата на внутриклеточное накопление холестерина. Так, предварительное введение КонА с последующим включением в культуру клеток атерогенной сыворотки вызывало увеличение содержания холестерина в макрофагах в 4—5 раз. Подобная закономерность, но выраженная в несколько меньшей степени, была выявлена и в экспериментах с клетками интимы аорты человека. В этом случае введение КонА в культуру в возрастающих концентрациях от 10^{-7} до $5 \cdot 10^{-6}$ М вызывало прямо пропорциональное увеличение содержания в клетках холестерина: от 56 до 204 %. Одновременно с этим в диапазоне концентраций КонА $5 \cdot 10^{-7}$ — $5 \cdot 10^{-6}$ М было обнаружено увеличение пролиферирующей активности клеток на 42—51 % (табл. 2).

Таблица 2

Влияние КонА на накопление холестерина и пролиферацию нормальных клеток интимы аорты человека ($M \pm m$)

Условия эксперимента	Содержание холестерина, мкг на 1 мг белка	Включение ^3H -тимидина, имп на 1 мкг белка
Делипидированная сыворотка	$65,7 \pm 7,8$	$62,0 \pm 6,6$
Атерогенная сыворотка	$135,6 \pm 14,4$	$130,6 \pm 11,5$
Атерогенная сыворотка + КонА, М:		
$5 \cdot 10^{-8}$	$160,0 \pm 17,7$	$149,0 \pm 11,5$
10^{-7}	$211,6 \pm 16,6^*$	$160,1 \pm 19,7$
$5 \cdot 10^{-7}$	$244,0 \pm 26,7^*$	$186,0 \pm 15,6^*$
10^{-6}	$401,5 \pm 55,0^*$	$197,7 \pm 20,1^*$
$5 \cdot 10^{-6}$	$412,5 \pm 38,0^*$	$188,9 \pm 15,6^*$

Примечание. Представлены средние данные 10 опытов.

Привлекают внимание результаты изучения действия КонА на поглощение макрофагами и клетками интимы нативных и ацетилированных ЛПНП (см. рисунок, табл. 2). Хотя степень включения ацетилированных ЛПНП в отсутствие КонА была почти в 2 раза выше включения нативных ЛПНП, КонА незначительно влиял на интенсивность накопления холестерина в макрофагах в зависимости от вида вводимых ЛПНП. Если для нативных ЛПНП практически не было обнаружено различий в степени включения

Таблица 3

Влияние КонА на накопление холестерина и пролиферацию субэндотелиальных клеток, культивируемых из неповрежденной интимы аорты человека при действии нативных ЛПНП и ацетилированных ЛПНП

Условия эксперимента	Содержание холестерина, мкг на 1 мг белка	Включение ^3H -тимидина, имп на 1 мкг белка
Контроль	$51,6 \pm 4,5$	$77,0 \pm 6,5$
Нативные ЛПНП (0,31 мг белка/мл)	$58,0 \pm 5,1$	$82,0 \pm 9,6$
Ацетилированные ЛПНП (0,25 мг белка/мл)	$139,6 \pm 11,2^*$	$122,0 \pm 11,2^*$
Нативные ЛПНП + КонА ($5 \cdot 10^{-7}$ М)	$66,0 \pm 7,8$	$90,1 \pm 10,0$
Ацетилированные ЛПНП + КонА ($5 \cdot 10^{-7}$ М)	$189,6 \pm 11,7^*$	$148,7 \pm 8,0^*$

в макрофаги как в отсутствие, так и в присутствии КонА, то для ацетилированных ЛПНП в сочетании с ним показана тенденция к увеличению содержания в клетках холестерина. В то же время введение ацетилированных ЛПНП в сочетании с КонА в культуру клеток интимы аорты на 36 % ($p < 0,01$) увеличивало содержание внутриклеточного холестерина по сравнению с клетками, в культуру которых вводили только ацетилированные ЛПНП, и в 2,9 раза — по сравнению с нативными ЛПНП, введенными совместно с лектином. Аналогичным образом изменялась и скорость включения ^3H -тимидина в ДНК — на 22 % ($p < 0,05$) и 65 % ($p < 0,01$).

Полученные результаты позволяют считать, что, во-первых, лизосомальный аппарат клеток интимы участвует в процессе атерогенеза, что может реализоваться на стадии нарушения функции гетерофагоцитоза и на этапе образования вторичных лизосом. Во-вторых, незначительная доступность нативных ЛПНП к гетерофагоцитозу по сравнению с ацетилированными формами свидетельствует о том, что определенная структурная модификация этого класса липопротеидов — необходимое условие проявления их атерогенных свойств.

ЛИТЕРАТУРА

1. Климов А. Н., Нагорнев В. А. // Арх. пат. — 1985. — № 6. — С. 12—23.
2. Климов А. Н., Никульчева Н. Г. Липопротеиды, дислипидемии и атеросклероз. — Л., 1984.
3. Ретин В. С. // Бюл. Всесоюз. кардиол. науч. центра. — 1986. — № 1. — С. 116—118.
4. Ретин В. С. Современные молекулярно-клеточные основы липопротеидной теории атеросклероза. — М., 1987.
5. Шнииктер В. О. // Вопр. мед. химии. — 1987. — № 4. — С. 3—14.
6. Чазов Е. И. // Тер. арх. — 1985. — № 11. — С. 29—33.
7. Aronson N. N. Jr. // Life Sci. — 1980. — Vol. 27. — P. 95—104.
8. Assmann G. Lipid Metabolism and Atherosclerosis. — Stuttgart, 1982.
9. Attie A. D., Pittman R. C., Watanable Y.,

- Steinberg D. // J. biol. Chem. — 1981. — Vol. 256. — P. 9789—9792.
10. Basu S. K., Goldstein J. L., Anderson R. C. W., Brown M. S. // Proc. nat. Acad. USA. — 1976. — Vol. 73. — P. 3178—3182.
 11. Brown M. S., Dana S. E., Goldstein J. L. // J. biol. Chem. — 1974. — Vol. 249. — P. 789—796.
 12. Brown M. S., Goldstein J. L., Krieger M. et al. // J. cell. Biol. — 1979. — Vol. 82. — P. 597—613.
 13. Brown M. S., Goldstein J. L. // Ann. Rev. Biochem. — 1983. — Vol. 52. — P. 223—261.
 14. Chazov E. I., Tetlov V. V., Orekhov A. N. et al. // Lancet. — 1986. — Vol. 2. — P. 595—598.
 15. Coetzee G. A., Stein O., Stein Y. // Atherosclerosis. — 1979. — Vol. 32. — P. 277—287.
 16. Cohn Z. A. // Proteases and Biological Control. — Cold Spring Harbor, 1975. — P. 483—493.
 17. Fredman P., Klinghardt G. W., Svannholm L. // Biochim. biophys. Acta. — 1987. — Vol. 917. — P. 1—8.
 18. Goldstein J. L., Brunschede G. Y., Brown M. S. // J. biol. Chem. — 1975. — Vol. 250. — P. 7854—7861.
 19. Goldstein J. L., Brown M. S. // J. Lipid Res. — 1984. — Vol. 25. — P. 1450—1461.
 20. Hara A., Randin N. S. // Analyt. Biochem. — 1978. — Vol. 90. — P. 420—426.
 21. Orekhov A. N., Tertov V. V., Kudryashov S. A. et al. // Atherosclerosis. — 1986. — Vol. 60. — P. 101—110.
 22. Stein O., Vanderhoek P., Stein Y. // Ibid. — 1977. — Vol. 26. — P. 465—482.

Поступила 20.02.89

EFFECT OF GLUCAGON AND CONCANAVALINE A ON ACCUMULATION OF CHOLESTEROL IN MICE PERITONEAL MACROPHAGES AND HUMAN AORTA INTIMA CELLS

A. V. Vasil'ev, Li Khva Ren, A. N. Orekhov, B. B. Tertov, V. A. Tutel'yan

Institute of Nutrition, Academy of Medical Sciences of the USSR, Moscow

Glucagon and concanavaline A were administered into cell cultures of mice peritoneal macrophages and human intima aorta simultaneously with atherogenic blood serum, obtained from patients with ischemic heart disease, or with acetylated and native low density lipoproteins. Their effect was dissimilar: glucagon decreased accumulation of intracellular cholesterol and the rate of ^3H -thymidine incorporation into these cells, while concanavaline A increased the patterns studied. Cellular lysosomes appear to participate in atherogenesis, these results suggest that regulation of lysosomal apparatus may occur at the step of secondary lysosomes formation.