

Архив журнала

Вопросы медицинской химии

ISSN 0042-8809

1992

Том 38 выпуск 3

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

1992

Volume 38 issue 3

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>

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 1992

УДК 616.24-003.662-092.9-07:616.153.1

А. В. Максименко, Л. М. Безрукавникова,
Е. Л. Григорьева, Е. Г. Тищенко, О. Г. Архипова,
В. В. Яглов, В. П. Торчилин

АНТИФИБРОЗНОЕ ДЕЙСТВИЕ МОДИФИЦИРОВАННЫХ ФОРМ КАТАЛАЗЫ И СУПЕРОКСИДИСМУТАЗЫ ПРИ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОМ СИЛИКОЗЕ

Институт экспериментальной кардиологии Всесоюзного кардиологического научного центра АМН СССР и Институт гигиены труда и профзаболеваний АМН СССР, Москва

Одним из достаточно распространенных профессиональных заболеваний является силикоз, развивающийся от попадания в легкие промышленных кварцсодержащих аэрозолей. В эксперименте на животных тормозящее действие на развитие фиброзного процесса в легких оказали модифицированные формы гиалуронидазы [1] и супероксиддисмутазы (СОД) [2]. Повысить эффективность действия СОД (ловушки супероксид-радикала) можно, вероятно, за счет совместного введения ее с каталазой (КАТ), превращающей токсичную перекись водорода в безвредную воду и кислород. Известно, что накопление перекиси водорода ведет к инактивации СОД [5]. Если же в среде присутствует КАТ, то СОД не теряет своей активности даже после дисмутирования 1000 супероксид-радикалов на 1 моль фермента. Учитывая, что супероксид-радикал может частично ингибировать КАТ [8], легко понять, что одновременное функционирование СОД и КАТ может усилить их эффект и в значительной мере предотвратить образование наиболее токсичного гидроксильного радикала.

Результаты совместного применения СОД и КАТ при экспериментальной терапии весьма противоречивы [11], хотя данные обзорного анализа говорят в пользу сочетанного введения этих ферментов [7]. Считают, что применение модифицированных форм СОД и КАТ более эффективно в сравнении с использованием нативных ферментов. Нами были получены модифицированные альдегиддекстраном (АД) СОД [3], КАТ и их конъюгат КАТ—АД—СОД, в котором АД выполняет роль мостика, связывающего ферменты друг с другом без существенной потери их каталитической активности. Выбор такой модификации был обусловлен использованием АД в клинической практике в составе лекарственного препарата стрептодеказы [4] и эффективным применением при экспериментальном силикозе модифицированных этим полимером литических ферментов [10].

Интересно было изучить действие СОД и КАТ как в виде смеси (композиции), так и в составе ковалентного биферментного конъюгата.

Целью данной работы были модификация, изучение свойств и апробация действия нативных

и модифицированных форм СОД и КАТ, а также их конъюгата при экспериментальном силикозе у крыс для выбора наиболее перспективных потенциальных терапевтических агентов и выяснения целесообразности совместного применения СОД и КАТ.

Методика. В работе были использованы КАТ из печени быка и СОД из печени крыс, предоставленные Институтом биохимии АН Армянской ССР. СОД, модифицированную АД (СОД—АД), приготовили и оценили ее каталитическую активность в соответствии с данными [3].

Получение ковалентного комплекса КАТ—АД. В 0,05 М фосфатном буфере pH 8,5 КАТ (10 мкМ) инкубировали с АД (0,02—30 мкМ) в течение 18 ч при 4 °С и осторожном перемешивании. После этого проводили восстановление продукта боргидридом натрия (1 мг/мл) на холоде (4 °С) и выделяли его ультрафильтрационно на установке «Amicon» (США) с фильтром XM-100 и отмывали раствором 0,05 М KH_2PO_4 pH 4,0. Установлено, что кислая отмывка препарата КАТ—АД обеспечивает диссоциацию фермента на субъединицы и он легко отделяется от ковалентного комплекса ультрафильтрацией. В ряде случаев использовали гель-хроматографическое разделение смеси на колонке К-16 (LKB, Швеция) с сефарозой CL-6B. Элюатом являлся 0,05 М фосфатный буфер с 0,015 М NaCl pH 7,0. Выделенный продукт лиофилизировали.

Синтез конъюгата СОД—АД—КАТ. 1,8 мг АД растворяли в 30 мл 0,05 М фосфатном буфере pH 8,5, добавляли 7,2 мг КАТ (243 мкл) и инкубировали раствор при осторожном перемешивании в течение 3 ч при комнатной температуре. Затем в реакционную смесь вводили 1,92 мг СОД и продолжали инкубацию в течение 18 ч при 4 °С. Инкубационную смесь восстанавливали боргидридом натрия (1 мг/мл) в течение 40 мин при 4 °С, затем проводили гель-хроматографическое (колонка с сефарозой CL-6B) или ультрафильтрационное (фильтр XM-300) выделение и лиофилизировали.

Исследование антифиброзного действия нативной и модифицированной КАТ. Эффективность действия препаратов КАТ изучали на модели экспериментального силикоза, вызванного интратрахеальным введением в легкие крыс-самцов линии Вистар [10] 25 мг любрежской кварцевой пыли. Ингаляции и внутрибрюшинные инъекции ферментов начали через 3 нед после введения частиц пыли.

Ингаляционно вводимая доза нативной или модифицированной КАТ 200 ед. на животное, при использовании смеси нативных ферментов — по 200 ед. каждого фермента КАТ и СОД на крысу. Продолжительность ингаляционного курса ферментов 2 мес (по 5 раз в неделю).

При изучении антифиброзного действия биферментного конъюгата КАТ—АД—СОД и смеси модифицированных ферментов СОД—АД и КАТ—АД препараты вводили внутрибрюшинно крысам с экспериментальным силикозом. Биферментный конъюгат вводили в дозе 400 ед. СОД и 750 ед. КАТ на животное, а смесь модифицированных ферментов — в дозе 400 ед. каждого фермента на крысу. Продолжительность инъекционного курса ферментных препаратов 2 мес (по 3 раза в неделю).

После окончания экспериментальной терапии животных забивали и определяли массовые коэффициенты сухих легких и лимфатических узлов (в граммах на 100 г массы тела) и содержание оксипролина в легких и лимфатических узлах, что позволяет судить о степени развития фиброзного процесса. Статистическая обработка полученных данных производилась с использованием Стьюдента критерия *t*.

Морфологические изменения в легких фиксировали по их срезам, окрашенным гематоксилином и эозином, а для выявления соединительнотканых белков — пикрофуксинном по Ван-Гизону.

Результаты и обсуждение. Модификация КАТ. Наибольших величин ковалентного связывания фермента с носителем и остаточной активности КАТ препарата удается достичь при

Таблица 1

Характеристика препаратов нативной, модифицированной АД и конъюгированной через него с СОД КАТ

Исследуемый показатель	Нативная КАТ	Комплекс КАТ—АД	Конъюгат КАТ—АД—СОД
Содержание белка в препарате, %	57	22	29
Сохраняемая активность КАТ, %	100	83	<60
Сохраняемая активность СОД, %	—	—	<70
Содержание аминокрупп на 1 моль белка, %	100	16	17
Остаточная активность КАТ	0	40	40
Остаточная активность СОД	—	—	90

Примечание. Специфическую активность конъюгата (на 1 мг белка) по КАТ и СОД рассчитывали, условно принимая содержание КАТ или СОД равным величине общего содержания белка в препарате, указанном в таблице; остаточная каталитическая активность выражена в % от исходной после 3-часовой инкубации ферментных препаратов при 50 °С в 0,1 М К, Na-фосфатном буфере pH 7,4.

концентрации АД 5 мкМ при соотношении в инкубационной среде фермент—носитель, равном 1:5. Полученный таким способом препарат был подвергнут дальнейшему изучению. Активность исходной КАТ составила 306 ед/мг препарата [6], после модификации активность комплекса КАТ—АД—98 ед/мг препарата. Сравнительные характеристики разных форм КАТ приведены в табл. 1. Наибольшего выхода по белку и остаточной каталитической активности, получая конъюгат КАТ—АД—СОД, удается добиться предложенным методом. Трехэтапное получение конъюгата (модификация КАТ АД — ковалентное присоединение СОД — восстановление продуктов боргидридом натрия) оказалось предпочтительнее, чем одностадийный синтез или способ предварительной модификации СОД. Гель-хроматографический профиль конъюгата представлен на рис. 1. Площадь пиков 1 и 2 составляет 90 ± 3 и 10 ± 3 % соответственно, что свидетельствует о заметном связывании белков в конъюгате. Характеристика конъюгата КАТ—АД—СОД приведена в табл. 1. Специфическая активность конъюгата 93 ед. активности КАТ на 1 мг препарата и 354 ед. активности СОД на 1 мг препарата [3]. Отметим, что модификация каталазы повышает ее термостабильность в комплексе КАТ—АД и конъюгате КАТ—АД—СОД. Повышенной термостабильностью в конъюгате обладает и СОД. Данные SDS-электрофореза [9] показали, что модификация ведет к образованию ковалентных комплексов, обладающих высокой гетерогенностью состава. Многокомпонентность модифицированного препарата не позволяет провести седиментационный анализ частиц. Вероятно, учитывая высокую степень модификации КАТ (заметно снижено содержание аминокрупп после модификации фермента, см. табл. 1) и возможность деструкции АД при связывании с белком [3], можно полагать, что ферменты ковалентно модифицированы остатками носителя. Действительно, основная полоса электрофореграмм для КАТ—АД расположена (в сравнении с маркерами) в области более 200 кДа, а для конъюгата КАТ—АД—СОД — бо-

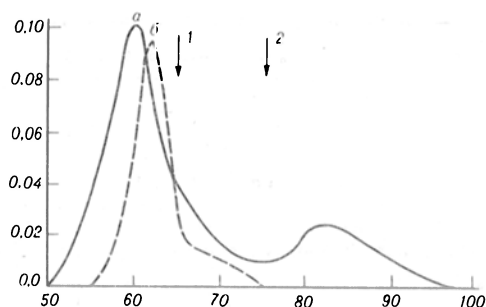


Рис. 1. Гель-хроматограммы конъюгата КАТ—АД—СОД (а) и ковалентного комплекса КАТ—АД (б) на колонке (К-16) с сефарозой CL-6В.

По оси абсцисс — объем, мл; по оси ординат — поглощение при длине волны 280 нм. Стрелки — положение пиков нативных ферментов КАТ (1) и СОД (2).

лее 300 кДа. Мол. м. субъединицы нативной КАТ 50—60 кДа. Предполагаемый состав этих ковалентных комплексов, вероятно, включает тетрамер КАТ и димер СОД, что минимально необходимо для проявления этими ферментами специфической каталитической активности. Экспериментальные данные показывают, что остаточная каталитическая активность модифицированных ферментов высока. Таким образом, вклад в молекулярную массу модифицированных комплексов со стороны каталитически активных КАТ и СОД составляет, вероятно, 240 и 32 кДа соответственно, что также подтверждает модификацию биокатализаторов фрагментом (фрагментами) носителя.

Антифиброзное действие нативной и модифицированной АД КАТ. На модели экспериментального силикоза у крыс было показано, что после курса ингаляций ферментов массовые коэффициенты печени, почек, селезенки и сердца у всех леченых животных не имеют существенных отличий от аналогичных показателей у крыс с силикозом. Попадание в легкие животных кварцевой пыли вызывает развитие фиброзного процесса, при этом возрастает масса легких и лимфатических узлов, в легких растет содержание соединительнотканых белков, определяемых по содержанию оксипролина [1]. Данные, характеризующие развитие фиброза в легких крыс разных экспериментальных групп, представлены в табл. 2. Введение нативной или модифицированной КАТ не оказывает существенного антифиброзного действия. В группе крыс, получавших смесь нативных КАТ и СОД, достоверно понижены по сравнению с группой нелеченых животных масса и массовый коэффициент сухих легких, а также содержание оксипролина, что свидетельствует о торможении развития фиброзного процесса. Однако массовые коэффициенты сухих лимфатических узлов достоверно превышают значения показателей у крыс с силикозом. Во всех группах крыс показатели периферической крови (содержание гемоглобина, количества эритроцитов и лейкоцитов) не отличается от данных биологического контроля.

Перед началом лечения по морфологическим данным в разных отделах легких имелись многочисленные мелкие силикотические гранулемы, находящиеся на стадии клеточно-пылевых очажков. Некоторые из них имеют тенденцию к слиянию, формируя конгломераты неправильной формы, содержащие нежные коллагеновые волокна. В конце эксперимента через 3 мес после введения пыли

Показатели фиброзного процесса в легких крыс после ингаляций нативной и модифицированной КАТ

Исследуемый показатель	Биологический контроль	Силикоз (без лечения)	Вид лечения		
			нативная КАТ	комплекс КАТ—АД	комбинация КАТ и СОД
Масса тела, г	464±14	470±12	471±13	490±27	458±15
Масса сухих легких, г	0,405±0,021	0,935±0,041	0,973±0,030	0,947±0,061	0,726±0,043*
Массовый коэффициент сухих легких, г/100 г	0,088±0,005	0,201±0,009	0,208±0,006	0,197±0,015	0,147±0,012*
Масса сухих лимфатических узлов, г	0,015±0,002	0,100±0,008	0,115±0,010	0,110±0,007	0,127±0,009
Массовый коэффициент лимфатических узлов, г/100 г	0,005±0,002	0,022±0,002	0,024±0,002	0,023±0,002	0,028±0,002*
Содержание оксипролина в легких, мг	7,90±0,82	11,63±1,61	13,72±1,34	12,04±1,52	8,10±1,52*
Содержание оксипролина в лимфатических узлах, мг	0,01±0,01	0,63±0,10	0,64±0,09	0,59±0,08	0,72±0,09*

Примечание. Здесь и в табл. 3 звездочка — $p < 0,05$ относительно группы крыс с силикозом без лечения.

в легких крыс содержались многочисленные мелкие и крупные силикотические гранулы, часто с концентрическим расположением в них клеточных элементов, среди которых выявлялись толстые коллагеновые волокна (рис. 2, а). Вокруг силикотических узелков часто видны эмфизематозно измененные альвеолы и альвеолы, заполненные серозным экссудатом (серозно-десквамативный альвеолит). Просветы мелких бронхов и бронхиол часто заполнены скоплением альвеолярных макрофагов с пикнотично измененными ядрами. Бронхоассоциированная лимфоидная ткань содержит очаги гиперплазии клеток стромы и развитую сеть коллагеновых волокон.

В легких крыс, получавших смесь нативных СОД и КАТ, содержатся многочисленные, часто сливающиеся между собой гранулы, большинство из которых не содержит коллагеновых во-

локон. Серозно-десквамативный альвеолит умеренно выражен.

Сравнительные данные позволяют полагать, что лечение экспериментального силикоза смесью нативных СОД и КАТ оказывает влияние на строение легких и существенно замедляет развитие коллагеновых волокон. Смесь нативных ферментов обладает заметным антифиброзным свойством, снижая массовые коэффициенты легких на 23—27 %.

Антифиброзное действие биферментного препарата КАТ и СОД. Инъекции биферментных препаратов модифицированных ферментов не приводят к изменению массовых коэффициентов печени, почек и селезенки. Данные, характеризующие развитие фиброза легких в различных экспериментальных группах, представлены в табл. 3. Отмечено некоторое снижение массы

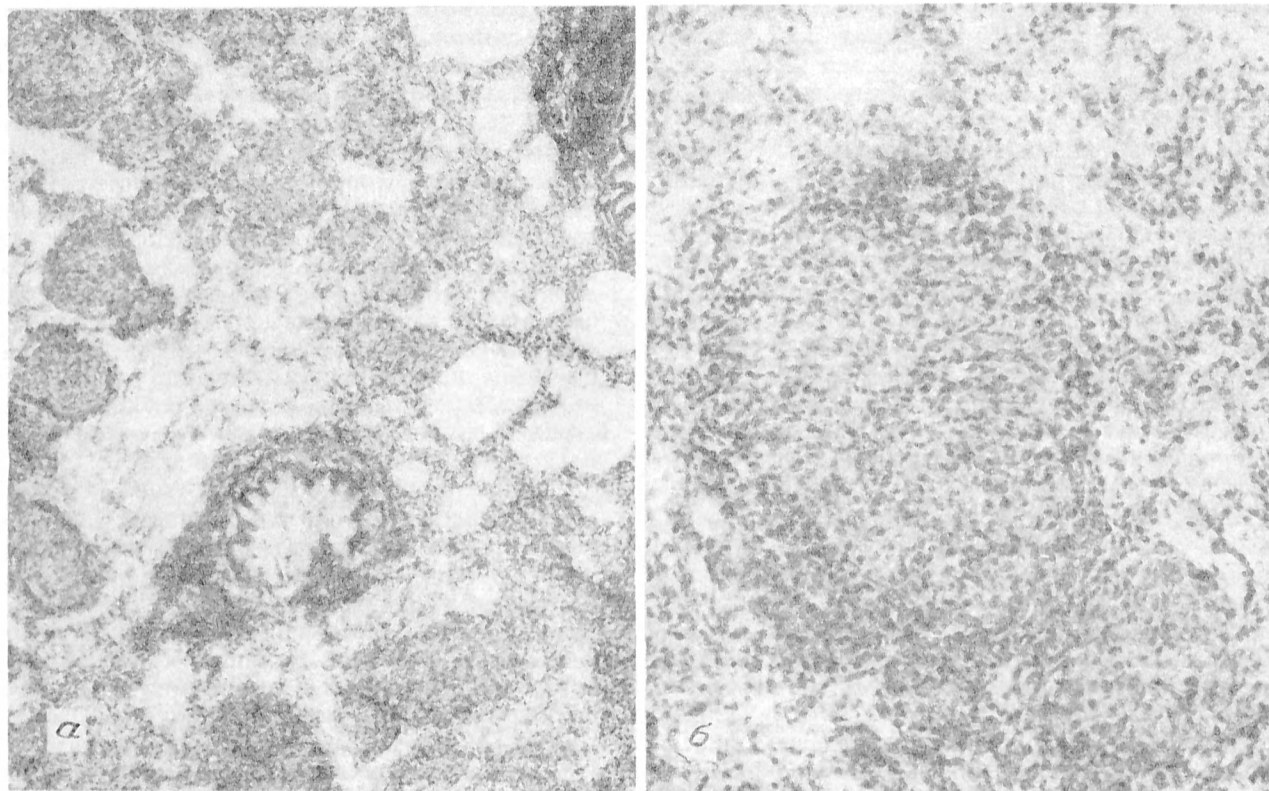


Рис. 2. Очаговый серозно-десквамативный альвеолит (3 мес после интратрахеального введения в легкие крыс кварцевой пыли) (А).

Окраска гематоксилином и эозином. Ув.: об. 16, ок. 10. Крупные сливающиеся силикотические гранулы легкого белой крысы образованы макрофагами, фибробластами и содержат коллагеновые волокна. Серозно-десквамативный альвеолит (силикоз 3 мес, леченный биферментным конъюгатом КАТ—АД—СОД) (Б). Окраска гематоксилином и эозином. Ув.: об. 6,3, ок. 10. Многочисленные мелкие силикотические гранулы легкого белой крысы образованы макрофагами.

Показатели фиброзного процесса в легких крыс после внутрибрюшинного введения биферментных препаратов модифицированных КАТ и СОД

Исследуемый показатель	Биологический контроль	Силикоз (без лечения)	Вид лечения	
			комбинация КАТ—АД и СОД—АД	биферментный конъюгат КАТ—АД—СОД
Масса тела, г	514±15	466±12	473±13	470±15
Масса сухих легких, г	0,492±0,021	0,874±0,051	0,944±0,035	0,751±0,043
Массовый коэффициент сухих легких, г/100 г	0,095±0,005	0,188±0,008	0,200±0,013	0,160±0,009*
Масса сухих лимфатических узлов, г	0,015±0,026	0,065±0,010	0,072±0,008	0,081±0,012
Массовый коэффициент сухих лимфатических узлов, г/100 г	0,003±0,001	0,014±0,002	0,015±0,003	0,017±0,002*
Содержание оксипролина в легких, мг	5,10±0,70	7,22±0,74	6,63±0,57	5,71±0,60*
Содержание оксипролина на 100 мг сухой ткани легких, мг/100 г	0,99±0,15	1,03±0,17	0,69±0,71	0,71±0,04*

сухих легких и достоверное снижение массового коэффициента сухих легких и содержания оксипролина у крыс, получавших биферментный ковалентный конъюгат КАТ—АД—СОД. Аналогичные показатели для комбинации КАТ—АД и СОД—АД достоверно не отличались от величин в группе крыс с силикозом.

Морфологические изменения в легких крыс через 3 мес после введения пыли (без лечения) показаны на рис. 2, а. В те же сроки в легких крыс, леченных как КАТ—АД—СОД, так и смесью КАТ—АД и СОД—АД, наблюдается замедление развития силикотического процесса, выражающееся в образовании многочисленных, преимущественно милиарных гранул, состоящих из макрофагов без признаков фиброобразования. Вокруг силикотических гранул выражен серозно-десквамативный альвеолит (рис. 2, б).

Данные сравнительного изучения позволяют полагать, что лечение экспериментального силикоза как конъюгатом КАТ—АД—СОД, так и композицией КАТ—АД с СОД—АД замедляет слияние милиарных гранул в более крупные и тормозит развитие в них коллагеновых волокон. Однако значительное содержание в легочных альвеолах, расположенных вокруг гранул, серозного выпота и десквамированных клеток альвеолярной выстилки может приводить к тому, что масса и массовый коэффициент сухих легких даже несколько превышают аналогичные значения для группы нелеченых крыс с силикозом, что имеет место в группе животных, леченных комбинацией КАТ—АД и СОД—АД. Отсутствие фиброобразования гранул хорошо подтверждается значительным снижением содержания оксипролина на 100 мг ткани сухих легких в сравнении с группой крыс с силикозом.

Сравнительный анализ представленных данных указывает на заметную эффективность действия композиции нативных КАТ и СОД. По отдельности ни нативная СОД [2], ни нативная КАТ антифиброзной активностью не обладают. Сочетанное применение нативных КАТ и СОД позволяет достичь эффекта, сходного по величине с таковым при использовании модифицированной АД СОД [2]. Это не только подчеркивает важность использования композиций нативных ферментов при силикозе, но и свидетельствует о дополнительном защитном эффекте каталазы, ярко проявляющемся в этих условиях. В составе биферментного ковалентного конъюгата КАТ также оказывала антифиброзное действие, но менее

выраженное, а при использовании комбинации КАТ—АД и СОД—АД заметного эффекта не обнаружилось. Вероятно, причину различной эффективности действия смеси нативных и модифицированных ферментов предположительно можно видеть или в различной локализации в ткани легких КАТ—АД и СОД—АД, или в разной скорости их доставки к очагам поражения, так как ковалентный конъюгат КАТ—АД—СОД в этих условиях оказывает антифиброзное действие.

Итак, химическая модификация КАТ АД ведет к повышению термостабильности фермента в составе как ковалентного комплекса КАТ—АД, так и биферментного ковалентного конъюгата КАТ—АД—СОД при сохранении заметной каталитической активности. Оптимальным является трехэтапное получение биферментного конъюгата.

Ингаляционное введение крысам с экспериментальным силикозом смеси нативных КАТ и СОД оказывает влияние на строение легких и существенно замедляет развитие коллагеновых волокон. Смесью этих ферментов обладает заметным антифиброзным свойством, тогда как индивидуально используемые компоненты такого эффекта не проявляют. По сравнению с действием модифицированной СОД использование смеси нативных ферментов дает больший эффект, свидетельствуя о дополнительном эффекте каталазы. Он проявляется, хотя и в меньшей степени, и при внутрибрюшинных инъекциях биферментного конъюгата КАТ—АД—СОД. Увеличение массовых коэффициентов лимфатических узлов при такой экспериментальной терапии говорит о необходимости варьирования доз и состава используемых композиций.

ЛИТЕРАТУРА

- Архипова О. Г., Яглов В. В., Максименко А. В. и др. // Бюл. exper. биол. — 1987. — № 2. — С. 221—223.
- Максименко А. В., Григорьева Е. Л., Безрукавникова Л. М. и др. // Там же. — 1991. — № 9. — С. 21—23.
- Максименко А. В., Григорьева Е. Л., Морозкин А. Д. и др. // Биохимия. — 1991. — Т. 58, № 7. — С. 1349—1354.
- Майковский М. Д. Лекарственные средства. — 9-е изд. — М., 1984. — Т. 2. — С. 59—60.
- Beauchamp C. O., Fridovich I. // Biochim. biophys. Acta. — 1973. — Vol. 317. — P. 50—64.
- Beers R. F. Jr., Sizer I. W. // J. biol. Chem. — 1952. — Vol. 195. — P. 133—138.
- Kloner R. A., Dunne M., Weitran A., Dunn M. M. // J. Lab. clin. Med. — 1989. — Vol. 80, N 5. — P. 115—1127.
- Kono Y., Fridovich I. // J. biol. Chem. — 1982. — Vol. 257. — P. 5751—5754.
- Laemmli U. K. // Nature. — 1970. — P. 680—685.

10. Maksimenko A. V., Arkhipova O. G., Yaglov V. V., Torchilin V. P. // Interbiotech-87. Enzyme Technologies. — Amsterdam, 1988. — Vol. 4. — P. 509—522.
11. Opie L. H. // Circulation. — 1989. — Vol. 80, N 4. — P. 1049—1062.

Поступила 20.12.90

ANTIFIBROUS EFFECTS OF NATIVE AND MODIFIED FORMS OF CATALASE AND SUPEROXIDE DISMUTASE IN EXPERIMENTAL SILICOSIS

A. V. Maximenko, L. M. Bezrukavnikova, E. L. Grigoryeva, E. G. Tischenko, O. G. Arkhipova, V. V. Yaglov, V. P. Torchilin

Institute of Experimental Cardiology, All-Union Cardiology Research Centre, Institute of Industrial Hygiene and Professional Diseases, Academy of Medical Sciences of the USSR, Moscow

The forms of catalase modified by treatment with dextran aldehyde were obtained and studied. Efficacy of the preparations containing native and modified forms of catalase and superoxide dismutase as well as their covalent bienzyme conjugate containing catalase-dextran aldehyde-superoxide dismutase was studied in rats with simulated silicosis. The preparations were administered into rats by means of inhalation and intraperitoneal injection. Positive protective effect exhibited a mixture of native enzymes and their covalent conjugate. The most pronounced additional effect was caused by the mixture of native catalase and superoxide dismutase as compared with modified preparation of superoxide dismutase. The preparation of bienzyme containing conjugate was less effective.

© Б. Г. ЛЯПКОВ, Т. В. КИСЕЛЕВА, 1992

УДК 612.664.1:547.426.21/.23

Б. Г. Ляпков, Т. В. Киселева

МОЛЕКУЛЯРНЫЕ ТИПЫ ТРИАЦИЛГЛИЦЕРИНОВ ЖЕНСКОГО МОЛОКА НА РАЗЛИЧНЫХ СТАДИЯХ ЛАКТАЦИИ

Институт питания АМН СССР, Москва

До настоящего времени наши представления о липидах женского молока основывались на данных жирнокислотного состава общей липидной фракции или отдельных классов липидов, выделенных из нее [5, 8]. Однако у всех млекопитающих основным классом липидов молока являются триацилглицерины (ТАГ), составляющие 87,5 % от суммы общих липидов у крысы, 97,5 % у коровы и 98,2 % у человека [3]. Поэтому основным первичным субстратом, поступающим в пищеварительный тракт ребенка с молоком, являются ТАГ. Усвоение ТАГ происходит в желудочно-кишечном тракте путем гидролиза их липазами: поджелудочной, желудочной и панкреатической. Указанные ферменты имеют определенную избирательность к субстратам, что показано в опытах *in vitro* [6], а также различную активность в разные периоды кормления молоком [4]. Данные об особенностях усвоения ТАГ растительных масел и животных жиров обобщены в ряде публикаций [7]. В связи с увеличением случаев гипогалактии идут интенсивные поиски адекватных заменителей женского молока. Это предполагает необходимость детального исследования ТАГ состава женского молока на разных стадиях лактации с целью определения природного эталона (женского молока) не по жирнокислотному составу, а по индивидуальным ТАГ как первичным субстратам в метаболизме экзогенных липидов

для моделирования последних в молочных смесях, являющихся его заменителями.

Методика. Проведены исследования ТАГ липидов женского молока на различных стадиях лактации: ранней (1-я неделя), в «зрелом» молоке (2—3 мес лактации) и в молоке позднего периода лактации (12 мес). ТАГ выделяли методом ТСХ на силикагеле из общего липидного экстракта в системе петролейный эфир — диэтиловый эфир (15:2). Полученную фракцию растворяли в гексане и вводили в инжектор жидкостного хроматографа «Бекман» (США), М.336 с колонкой «Ultrasphere ODS» 250×4,6 мм, 5 мкм, детектором «Кратос» (США), М.757 при 205 нм. Мобильная фаза — ацетонитрил (Burdick, Jackson) — ацетон (о.с.ч.), (34:66); скорость потока 1,5 мл/мин. Запись хроматограмм и расчеты проводили на интеграторе CR-3A «Shimadzu» (Япония). Пики на хроматограммах идентифицировали по разработанной нами ранее программе [2] на ЭВМ, основанной на зависимости между эквивалентным углеродным числом — ECN — индивидуальных ТАГ и временами их удерживания при хроматографии. Жирнокислотный состав ТАГ, необходимый для введения в программу идентификации ТАГ, определяли методом ГЖХ на хроматографе «Карло Эрба» (Италия) М.5300 с использованием капиллярной колонки 60 м с фазой диэтиленгликольсукцинат. Подтверждение отдельных молекулярных типов ТАГ проводили отбором соответствующих фракций с колонки жидкостного хроматографа с последующим анализом жирнокислотного состава и введением данных в программу идентификации ТАГ в ЭВМ. Обработку полученных данных проводили тремя методами: анализом по главным компонентам; определением степени подобия по программе «ближнего соседа»; графическим выражением исследованных объектов в «star symbol plot» пакета STATGRAPHICS. Анализ осуществляли с помощью ЭВМ. При анализе по главным компонентам в обработку брали значения ECN-эквивалентного углеродного числа для каждого молекулярного типа ТАГ [2]. Матрица для данного анализа включала 48 строк со значениями ECN от 29,74 до 51,97. Группировка и длина векторов в пространстве, обозначенном двумя главными компонентами, являлись математической характеристикой для каждого образца [1] и сравниваемых групп. При определении степени подобия образцов по «ближнему соседу» меру близости исследуемых объектов устанавливали по значениям обычного евклидова расстояния [1], вычисленного для основных (каждый более 3 %) 14 молекулярных типов ТАГ зрелого женского молока. По указанным основным молекулярным типам ТАГ осуществляли графическое построение в «star symbol plot».

Результаты и обсуждение. В таблице представлены данные о составе ТАГ «зрелого» молока ($n=7$), молока ранней лактации ($n=5$) и позднего периода лактации ($n=2$). «Зрелое»

Содержание основных (более 3 % каждый) молекулярных типов триацилглицеринов (в %) в женском молоке на разных стадиях лактации

Молекулярный тип ТАГ	«Зрелое» молоко	Ранняя лактация	Поздняя лактация
DLaO	3,0	(2,3)	0
LaPO	4,1	5,0	5,5
LaOLa	(2,4)	0	4,1
LaPL	4,4	(1,5)	0
LaMO	0	0	4,7
LaOO	7,1	4,7	0
LaOL	5,0	4,1	9,5
MOO	5,2	6,2	5,0
MOL	6,6	3,9	13,7
MPL	(1,8)	4,3	0
MPO	3,7	5,2	3,2
POOL	0	3,4	0
PLP	3,0	4,6	0
POL	11,2	9,7	7,6
POO	6,6	5,0	3,7
POP	5,0	(2,4)	3,7
PLL	0	4,6	0
OLL	5,3	(1,8)	6,7
OLO	5,2	4,5	3,1
Остальные ТАГ	20,4	26,8	26,0