

ТОМ 40

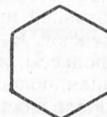
ВЫПУСК 2

МАРТ — АПРЕЛЬ

Двухмесячный научно-теоретический журнал

Основан в 1955 г.

ВОПРОСЫ МЕДИЦИНСКОЙ ХИМИИ



РЕДАКЦИОННАЯ КОЛЛЕГИЯ:

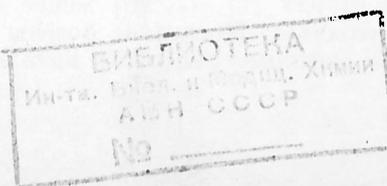
Главный редактор С. С. ДЕБОВ

В. А. ТУТЕЛЬЯН (зам. редактора), А. И. АРЧАКОВ, И. П. АШМАРИН, Т. Т. БЕРЕЗОВ,
Ю. В. БУКИН, 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,
Ю. А. РОМАКОВ, В. А. САКС, В. Б. СПИРИЧЕВ, Е. А. СТРОЕВ

РЕДАКЦИОННЫЙ СОВЕТ:

БЛЕВ А. А. (Москва)
БЫЧКОВ С. М. (Москва)
КОНСТАНТИНОВ А. А. (Хабаровск)
ЛЯХОВИЧ В. В. (Новосибирск)

ПАСХИНА Т. С. (Москва)
ТУРАКУЛОВ Я. Х. (Ташкент)
ТЯХЕПЫЛД Л. Я. (Тарту)
ЯСАЙТИС А. А. (Вильнюс)



© А. М. СОЛДАТОВА, О. Н. ВОСКРЕСЕНСКИЙ, 1994

УДК 617.735-007.17-053.8/.9-02:615.356:577.164.18/-07

А. М. Солдатова, О. Н. Воскресенский

ВИТАМИНЫ АНТИОКСИДАНТНОГО ДЕЙСТВИЯ И ВОЗРАСТНАЯ ДИСТРОФИЯ СЕТЧАТКИ

Одесский медицинский институт им. Н. И. Пирогова

В настоящее время получил признание термин «свободнорадикальная патология», охватывающий хронические неинфекционные заболевания зрелого и пожилого возраста, патогенез которых связан с общими свободнорадикальными механизмами старения клеток и тканей [3, 7, 8]. К таким заболеваниям, по-видимому, может быть отнесена центральная возрастная дистрофия сетчатки (сенильная макулярная дистрофия, склеротическая макулострофия). В сетчатой оболочке глаза риск свободнорадикального повреждения особенно велик. Это обусловлено тем, что сетчатка подвергается действию света, способного осуществлять фотоиницирование свободных радикалов и развитие процесса перекисного окисления липидов (ПОЛ). В сетчатке содержатся окрашенный фотосенсибилизатор (ретиаль), легкоокисляемые субстраты (липиды мембран и родопсин) [40—44], повышена концентрация кислорода [2, 56, 58], что и предопределяет опасность развития в ней патологического процесса по механизму свободнорадикального фотоиндуцированного окисления [30].

В настоящей статье представлена концепция ведущей роли перекисных факторов в патогенезе возрастной центральной дистрофии сетчатки, сопряженных с общими свободнорадикальными механизмами геронтогенеза.

Главным источником свободных радикалов в сетчатке, по-видимому, являются ее фоторецепторные клетки — палочки и колбочки. В этих клетках образование и утечка свободнорадикальных липидных частиц возможны в богатых высоконенасыщенными жирными кислотами дисках наружных сегментов в связи с фотохимическими процессами и в митохондриях (O_2^- и OH^-) в результате сбоя активности цитохромоксидазы. **Физиологическая антиоксидантная система (ФАС) сетчатки**

В нормальных условиях в здоровой клетке при физиологических уровнях освещенности неферментативное ПОЛ полностью блокировано. В процессе эволюции в пигментоцитах и фоторецепторных клетках сетчатки сформировалась мощная ФАС. Основная роль в элиминации свободных радикалов принадлежит α -токоферолу, ферментные механизмы антирадикальной защиты в фоторецепторах [11, 17, 20] менее активны, чем в пигментоцитах. Последние богаты микропероксидами, которые содержат каталазу. Уровень

пероксидазной активности в них сопоставим с таковым в лейкоцитах, до 80 % ее связано с фракциями плазматических мембран и меланозомом. В цитозоле клеток пигментного эпителия высоко содержание селензависимой глутатионпероксидазы; активность независимой от селена глутатионпероксидазы значительно ниже [5, 41]. Кроме того, в них содержится специфический дополнительный компонент ФАС — меланосомы [12, 13].

Таким образом, ФАС сетчатки включает в себя 3 звена: 1) токоферол, восстанавливающий свободные радикалы R^{\cdot} . Поток водорода от фонда НАДФН + НАДН к токоферолу осуществляется цепью антирадикальных ингибиторов (глутатион, эрготионин-аскорбат) при участии соответствующих редуктаз и дегидрогеназ; 2) ферментный механизм. Пероксидазы осуществляют элиминацию гидроперекисей $ROOH$, супероксиддисмутаза — супероксидного анион радикала O_2^- ; 3) меланосомный механизм защиты, обеспечивающий поглощение функционально незначимого света, способного индуцировать свободнорадикальное окисление (СРО). Помимо этого, меланосомы комплексируют ионы Fe^{2+} (катализатор СРО), а также связывают свободнорадикальные частицы парамагнитными центрами меланина. Обобщенная схема ФАС сетчатки с учетом новейших данных представлена на рис. 1. Очевидно, что срыв функциональной активности ФАС сетчатки возможен вследствие в первую очередь воздействия 4 главных факторов: 1) интенсивного освещения; 2) недостаточности облигатных компонентов ФАС (витаминов-антиоксидантов); 3) недостаточности фонда восстановленных пиридиннуклеотидов — НАДФН и НАДН; 4) снижения активности антиоксидантных ферментов.

Развитие процессов ПОЛ вызывает ряд повреждений в сетчатке: страдают мембраны фоторецепторов и пигментоцитов [15, 16, 18, 22, 24, 40], окисляются SH-группы родопсина и образуются межмолекулярные дисульфидные шивки между несколькими молекулами родопсина, который теряет при этом свои нативные свойства, в первую очередь способность к регенерации [30, 31, 33]. Вследствие лабильности мембран лизосом пигментного эпителия освобождаются литические ферменты, что приводит к вторичным повреждениям клеточных структур пигментного эпителия и фоторецепторов сетчатки [28, 47, 54].

Состояние ФАС у больных центральной возрастной дистрофией сетчатки

В эксперименте на животных показано, что риск повреждающего действия света на сетчатку увеличивается с возрастом [54, 61]. Надо полагать, это связано с ослаблением ФАС при старении. Фундаментальными исследованиями последних лет установлено возрастное уменьшение в тканях и клетках содержания природных антиоксидантов (α -токоферола, восстановленного глу-

тациона, убихинонов, SH-содержащих белков и др.), активности защитных ферментов (супероксиддисмутазы, каталазы, глутатионзависимых редуктаз и пероксидаз), а также увеличение концентрации продуктов перекисного окисления в тканях [3, 10, 29, 48, 55].

Однако в некоторых работах приводятся данные о повышении с возрастом в тканях уровня токоферола [59], повышении активности селеновой глутатионпероксидазы и каталазы [52]. Общий недостаток большинства исследований динамики ФАС в онтогенезе — игнорирование сезонных колебаний в поступлении облигатных пищевых биоантиоксидантов, влияющих на ее активность [4], а также биологических ритмов физиологических функций организма [21]. Проведенные нами исследования уровня обеспеченности витаминами-антиоксидантами и активности антиоксидантных ферментов у больных склеротической макулодистрофией выявили сезонные различия в состоянии отдельных звеньев ФАС [35]. Имело место снижение обеспеченности токоферолом и аскорбатом в зимнее и весеннее время года, а также активности глутатионпероксидазы во все сезоны по сравнению с контрольной группой здоровых лиц того же возраста. Перекисный гемолиз эритроцитов и содержание малонового диальдегида у них были выше, чем в контрольной группе, на протяжении всего года (рис. 2).

Исследование углеводного обмена у этих больных выявило ряд изменений. Наблюдались активация анаэробного гликолиза, снижение активности пентозного цикла, повышение содержания метаболитов гликолиза и цикла Кребса, в большей степени их окисленных форм [36]. Известно, что величина отношения окисленных метаболитов к восстановленным характеризует уровень восстановленных пиридиннуклеотидов — фонд НАДН и НАДФН [6, 27, 49]. Таким образом, судя по изменению указанных отношений (рис. 3), у больных склеротической макулодистрофией во все се-

зоны года, особенно весной и летом, в эритроцитах уменьшается фонд НАДН и НАДФН, т. е. снижается функциональный резерв начального звена ФАС.

Перекисная концепция патогенеза возрастной центральной дистрофии сетчатки

Полученные клинические данные позволили предположить, что в патогенезе возрастной макулодистрофии ведущую роль играют 3 фактора: 1) метаболические нарушения, уменьшающие пополнение фонда НАДН и НАДФН; 2) снижение активности антиоксидантных ферментов; 3) снижение обеспеченности витаминами-антиоксидантами, возможно, вследствие повышенного темпа расхода их. Выдвинутое предположение было подвергнуто экспериментальной проверке. Изучена сетчатка кроликов, находившихся под воздействием света люминесцентных ламп умеренной интенсивности (освещенность на уровне роговицы 3000 лк), в 3 сериях экспериментов: I — при антиоксидантной недостаточности [9]; II — при метаболическом алкалозе, сопровождающемся дефицитом восстановительных эквивалентов [26]; III — при сочетании антиоксидантной недостаточности и метаболического алкалоза. В первых двух сериях животным через 100—120 дней эксперимента была воспроизведена центральная дистрофия сетчатки, подтвержденная офтальмоскопическими и гистоморфологическими исследованиями. В III серии сроки развития дистрофии сетчатки сократились до 50—60 дней, т. е. вдвое. В сетчатке всех подопытных животных, судя по возрастанию уровня малонового диальдегида, значительно усиливались процессы ПОЛ. Так, в конце эксперимента содержание малонового диальдегида в I серии составляло $180,3 \pm 6,56$ мкмоль на 1 г ткани, во II — $171,5 \pm 7,26$ мкмоль/г и в III — $205,9 \pm 10,41$ мкмоль/г при контрольном значении в группе интактных кроликов $127,3 \pm 6,24$ мкмоль/г ($p < 0,001$).

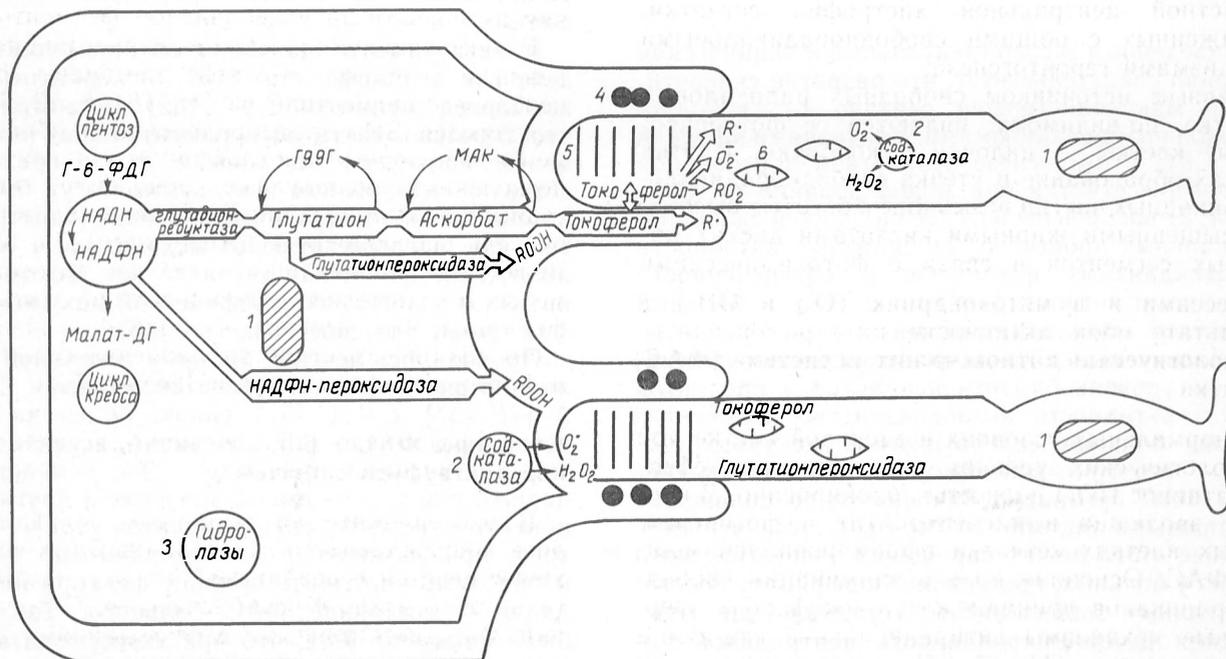


Рис. 1. ФАС сетчатки.

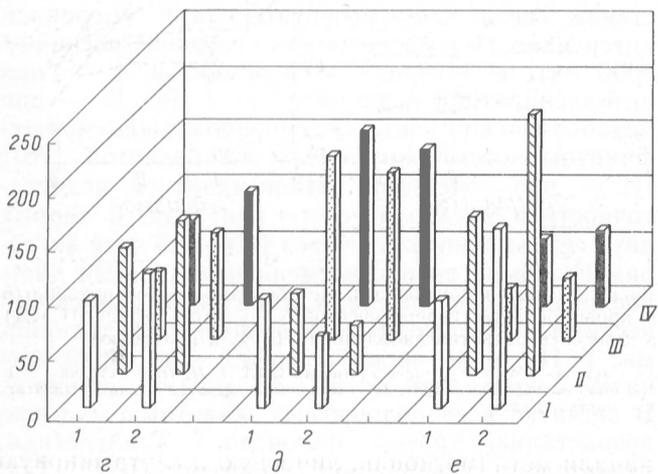
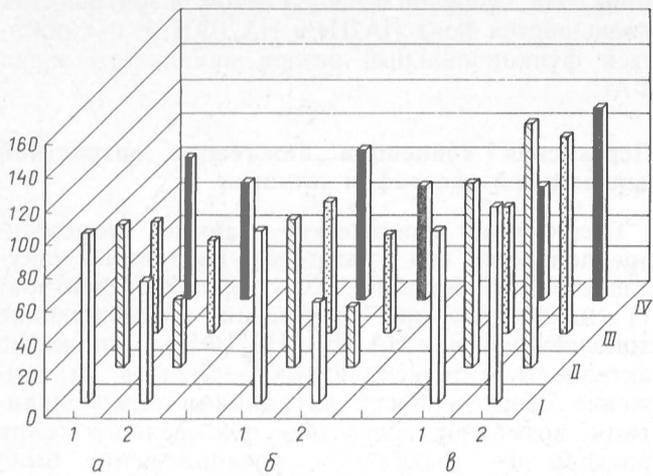


Рис. 2. Сезонная динамика показателей ФАС у здоровых лиц (1) и больных склеротической макулодистрофией (2) (в % к контролю).

I — зима; II — весна; III — лето; IV — осень. а — активность глутатионпероксидазы; б — активность глутатионредуктазы; в — содержание малонового диальдегида; г — % гемолиза эритроцитов; д — содержание α -токоферола; е — лингвальный тест на обеспеченность аскорбиновой кислотой.

Приведенный экспериментальный и клинический материал свидетельствует, что развитие склеротической макулодистрофии связано со свободнорадикальными механизмами. Критериями ведущей роли СРО в патогенезе возрастной центральной дистрофии сетчатки при моделировании ее дистрофии; 2) воспроизведение ее индукцией свободнорадикальных процессов; 3) снижение активности антиоксидантных ферментов и обеспеченности витаминами-антиоксидантами в крови больных возрастной макулодистрофией.

Используемые в клинических условиях показатели — уровень биоантиоксидантов и продуктов СРО и активность антиоксидантных ферментов в крови больных склеротической макулодистрофией — интегративно отражают снижение активности ФАС организма как целого по сравнению со здоровыми лицами того же возраста. Очевидно, в основе этого лежат нарушения энергетического обмена у больных, приводящие к дефициту восстановительных эквивалентов. Установленная генетическая детерминированность центральной инволюционной дистрофии сетчатки [19, 50] позволяет считать, что в становлении свободнорадикальной патологии сетчатки существенно роль

обусловленных генотипом тканеспецифических особенностей ФАС. Кроме того, состояние ФАС сетчатки определяется на протяжении онтогенеза фенотипически — гетерохронностью снижения активности (уровня) в них различных компонентов системы ингибирования СРО в зависимости от преобладающих на протяжении зрелого периода жизни тех или иных индукторов СРО. Например, в этиологии и патогенезе сенильных макулярных дегенераций установлена большая роль повышенной солнечной радиации [46, 60]. Таким образом, в реальных условиях у индивидуума разные комбинации упомянутых эндогенных и экзогенных факторов срыва ФАС определяют как общие свободнорадикальные механизмы физиологического старения [1, 3, 7, 29], так и частные пусковые звенья развития патологических процессов в сетчатке.

Антиоксидантная фармакотерапия возрастной дистрофии сетчатки

Помимо упомянутых выше критериев отнесения склеротической макулодистрофии к свободнорадикальной патологии, наиболее практически важным является лечебный эффект антиоксидантов. В настоящее время для профилактики и лечения дистрофии сетчатки, в том числе и возрастной, нашли широкое применение синтетические антиоксиданты, в первую очередь эмоксилин [13]. Однако многолетний характер становления и развития дистрофии сетчатки определяет необходимость чрезвычайной длительности применения средств фармакопрофилактики и терапии, корригирующих метаболизм не только в сетчатке, но и во всем организме больного. Синтетические антиоксиданты должны использоваться главным образом при острых состояниях (транссудативной декомпенсации, при воздействии света высокой интенсивности), а для многократных курсов профилактики и лечения дистрофии сетчатки более рационально применять природные антиоксиданты.

В эксперименте доказано ретинопротекторное действие α -токоферола [15], аскорбатов [53], комплекса витаминов С и Р [32]. Несмотря на то что большая часть экспериментальных исследований проведена на модели фотоповреждения сетчатки, полученные результаты могут быть отнесены и к склеротической макулодистрофии, так как патогенетические механизмы и морфологические изменения сетчатки при фотомакулопатиях и возрастной атрофической макулодистрофии имеют большое сходство [45].

Проводилось лечение больных сенильной макулярной дистрофией сетчатки витаминами Е [25], А + Е [57], Е + С [51], однако не всегда достаточно эффективно [38], очевидно, в связи с тем, что в регуляции процессов СРО, гомеостаза и надежности клетки имеют значение и другие компоненты системы антиоксидантов [37]. Кроме того, при назначении антиоксидантной терапии необходимо учитывать природу фактора пероксидации и состояние ФАС больного. Так, нами было показано [23], что при экспериментальной дистрофии сетчатки в 3 группах кроликов, вызванной внутривенным введением монобромата, содержанием кроликов на безантиоксидантном

рационе, а также сочетанным действием этих двух факторов, у всех животных в ткани сетчатки усиливались процессы СРО. Однако при этом поражались разные звенья ФАС, в связи с чем применение комплекса витаминов — α -токоферола ацетата, аскорбиновой кислоты, рутина — приводило к нормализации изучаемых показателей лишь в группе животных, находившихся на безантиоксидантном рационе. В других группах кроликов применение указанных витаминов дало частичный эффект. Отмечено, что показатели СРО в сетчатке коррелировали с таковыми же в эритроцитах и плазме крови экспериментальных животных. Учитывая вышесказанное, можно считать, что клиничко-лабораторные данные о состоянии ФАС в эритроцитах и плазме крови больных макулодистрофией косвенно отражают уровень процессов СРО в сетчатке и могут быть критерием при назначении антиоксидантной терапии.

Известно, что витамины-антиоксиданты оказывают синергическое действие. Аскорбиновая кислота восстанавливает продукт окисления токоферола α -токофероксид в α -токоферол, витамины С и Р также взаимно обратимо восстанавливаются. Аскорбиновая кислота более стабильна в присутствии метилметионина, так как сульфгидрильные группы способны восстанавливать дегидроаскорбиновую кислоту в аскорбиновую. Метилметионин, поставляющий SH-группы, обеспечивает функционирование глутатионового звена — одного из основных механизмов антиоксидантной системы. Кроме того, он участвует в выведении из организма как активных радикалов, так и избытка радикалов-биоокислителей [14]. Липоевая кислота, которая участвует в процессе биологического окисления в липидном и углеводном обмене, коэнзим А также обладают выраженными антиоксидантными свойствами. Под их влиянием увеличивается фонд НАДН, что способствует восстановлению окисленного глутатиона [1].

На основании вышесказанного результатов клинических и экспериментальных исследований, а также данных литературы [1, 32, 39 и др.] нами разработаны комплексы витаминов-антиоксидантов, применяющиеся дифференцированно в зависимости от клиничко-лабораторных показателей и сезона года. В зимнее время, когда у больных склеротической макулодистрофией имели место недостаточность аскорбата и токоферола и снижение активности антиоксидантных ферментов, назначали комплекс прямых и непрямых антиоксидантов в суточных дозах: α -токоферола ацетат — 100 мг, аскорутин — 0,3 г, метилметионин — 0,3 г, липоевая кислота — 0,075 г.

Весной, когда риск свободнорадикального повреждения сетчатки особенно велик в связи со снижением уровня экзогенных антиоксидантов и усилением солнечной радиации, к указанному комплексу витаминов добавляли глутаминовую кислоту по 1,5 г в сутки и селенсодержащий препарат в виде настоя травы астрагала шерстичеткового, приготовленного из расчета 10—20 г сухой травы на 200 мл готового настоя по 1 столовой ложке 3 раза в день [34].

В летний и осенний периоды, когда нет явлений недостаточности витаминов Е и С, больным наз-

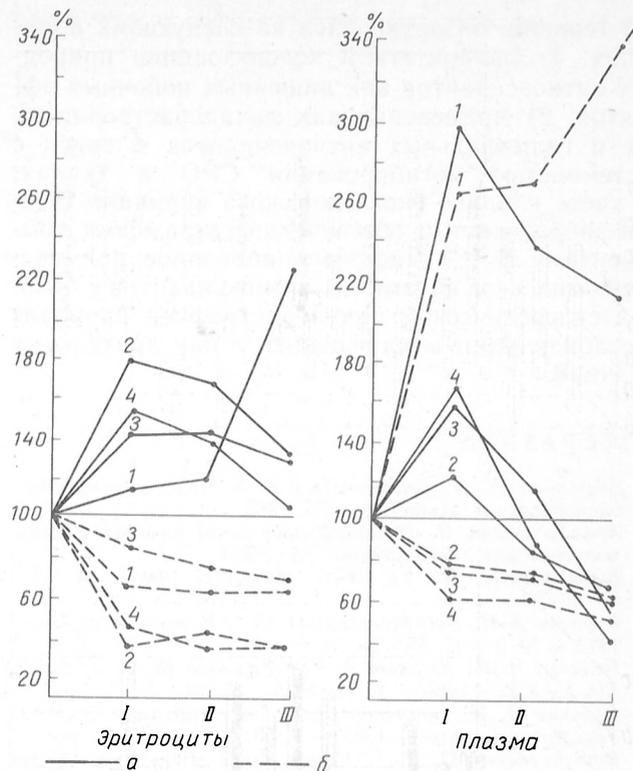


Рис. 3. Отношения окисленных метаболитов к восстановленным в крови больных склеротической макулодистрофией (СМД) в динамике развития заболевания (в % к контролю).

а — «сухая» СМД; б — трансудативная СМД. I, II, III — стадии СМД. 1 — α -кетоглутарат/изоцитрат; 2 — оксалоацетат/малат; 3 — пируват/лактат; 4 — пируват/малат.

начали метилметионин, липоевую и глутаминовую кислоты в приведенных выше дозах.

Описанный метод лечения применен у 75 больных склеротической макулодистрофией. Каждый из них на протяжении 3 лет 2—3 раза в год получал комплексное лечение антиоксидантами с учетом клиничко-биохимических показателей и сезона года. Больным назначали местно ультразвуковое воздействие или фотостимуляцию. Контролем являлись 10 больных, получавших идентичное местное лечение и витамин Е, и 10 больных, получавших местно ультразвук и внутрь сосудорасширяющие средства.

Зрительные функции у лиц, регулярно принимавших комплексы витаминов-антиоксидантов, в течение 3 лет сохранились и улучшились, ухудшение отмечено лишь в 4 %, тогда как среди больных, не принимающих антиоксиданты, ухудшение функций имело место в 60 %. При применении витамина Е показатели зрительных функций и состояние ФАС были хуже, чем при использовании комплекса антиоксидантов. Так, после последнего курса лечения с применением комплекса антиоксидантов острота зрения у больных дистрофией сетчатки повысилась с $0,52 \pm 0,04$ до $0,74 \pm 0,05$ ($p < 0,01$), а у лиц, получавших только витамин Е, — с $0,53 \pm 0,06$ до $0,62 \pm 0,06$ ($p > 0,1$).

Таким образом, проведенные нами исследования показали, что среди патогенетических механизмов инволюционных дистрофических изменений сетчатки существенная роль принадлежит активизации ПОЛ и снижению функции ФАС организма. Для ингибирования СРО мы рекомендуем назначение комбинированной антиоксидант-

ной терапии, базирующейся на следующих принципах: 1) приоритетном использовании природных антиоксидантов как лишенных побочных эффектов; 2) применении как липидорастворимых, так и гидрофильных антиоксидантов и связи с системностью ингибирования СРО в тканях; 3) учете клинико-биохимического варианта течения заболевания и обеспеченности разными компонентами ФАС. Дифференцированное применение комплексов витаминов-антиоксидантов у больных склеротической макулодистрофией приводит к стабилизации и улучшению у них зрительных функций.

ЛИТЕРАТУРА

1. Абрамова Ж. И., Оксенгендлер Г. И. Человек и противокислительные вещества.— Л., 1985.
2. Архангельский В. Н. Морфологические основы офтальмологической диагностики.— М., 1960.
3. Бобырев В. Н. // Пат. физиол.— 1989.— № 5.— С. 90—94.
4. Бобырев В. Н., Воскресенский О. Н. // Вопр. мед. химии.— 1982.— № 2.— С. 75—78.
5. Веллева Н. Р., Юсифов Э. Ю., Мамедов Ш. В. // Докл. АН АзССР.— 1985.— Т. 41, № 5.— С. 24—27.
6. Великий Н. Н., Кучеровская Т. М., Пархомец П. И. // Укр. биохим. журн.— 1981.— Т. 53, № 1.— С. 60—66.
7. Воскресенский О. Н. // Итоги науки и техники: Общие проблемы биологии.— М., 1986.— Т. 5.— С. 163—201.
8. Воскресенский О. Н. // Клиническая витаминология.— М., 1991.— С. 12.
9. Воскресенский О. Н., Витт В. В. // Арх. пат.— 1971.— № 6.— С. 51—55.
10. Воскресенский О. Н., Туманов В. А. Ангиопротекторы.— Киев, 1982.
11. Джафаров А. И., Магомедов Н. М., Кулиева Э. М. // Бюл. экспер. биол.— 1985.— № 1.— С. 427—429.
12. Донцов А. Е., Островский М. А. // Итоги науки и техники: Физиология человека и животных.— М., 1984.— Т. 28.— С. 127—176.
13. Егоров Е. А., Шведова А. А., Образцова И. С. // Вестн. офтальмол.— 1989.— № 5.— С. 52—55.
14. Журавлев А. М. // Биоантиокислители.— М., 1975.— С. 15—17.
15. Каган В. Е., Барыбина Г. В., Новиков К. Н. // Бюл. экспер. биол.— 1977.— № 4.— С. 411—413.
16. Каган В. Е., Кулиев И. Я., Спиричев В. Б. и др. // Там же.— 1981.— № 2.— С. 165—167.
17. Каган В. Е., Ланкин В. З. // Там же.— 1979.— № 8.— С. 164—165.
18. Каган В. Е., Новиков К. Н., Белоусова Л. В. и др. // Свободнорадикальное окисление липидов в норме и патологии.— М., 1976.— С. 57—61.
19. Кацнельсон Л. А., Агранович Н. С., Иванова Л. И., Иванова М. В. // Вестн. офтальмол.— 1985.— № 1.— С. 19—21.
20. Керимов Р. Ф., Джафаров А. И. // Бюл. экспер. биол.— 1990.— № 7.— С. 50—52.
21. Лисицын Ю. П., Березкин М. В. Актуальные вопросы хрономедицины: Науч. обзор.— М., 1981.
22. Магомедов Н. М., Нейман-Заде Н. К., Кулиева Э. М. и др. // Бюл. экспер. биол.— 1983.— № 3.— С. 37—39.
23. Малецкая О. Н., Солдатова А. М., Воскресенский О. Н. // Клиническая витаминология.— М., 1991.— С. 203.
24. Мамедханлы Т. А. // Изв. АН АзССР. Сер. биол. наук.— 1981.— № 1.— С. 96—98.
25. Марченко М. Н. // Вестн. офтальмол.— 1985.— № 4.— С. 48—51.
26. Мельничук Д. А. // Укр. биохим. журн.— 1989.— Т. 61, № 3.— С. 3—21.
27. Мельничук Д. А., Скорик Л. В., Сулима И. М. // Там же.— Т. 59, № 4.— С. 59—64.
28. Метелицина И. П. Автореф. дис. ... канд. биол. наук.— Киев, 1986.
29. Обухова Л. К. // Итоги науки и техники: Общие проблемы биологии.— М., 1986.— Т. 5.— С. 36—68.
30. Островский М. А., Богословский А. И. // Вестн. АМН СССР.— 1979.— № 12.— С. 57—61.

31. Островский М. А., Федорович И. Б. // Физиология человека.— 1982.— № 4.— С. 512—577.
32. Плошко Д. Г., Воскресенская Л. К., Корниенко В. В. // Офтальмол. журн.— 1988.— № 7.— С. 427—429.
33. Покровский Б. В., Шабанова М. Е., Гусман Б. С. и др. // Вопр. мед. химии.— 1983.— № 4.— С. 87—91.
34. Скакун Н. П. // Врач. дело.— 1991.— № 3.— С. 52—56.
35. Солдатова А. М. // Клиническая витаминология.— М., 1991.— С. 188.
36. Солдатова А. М., Пахомова В. А. // Гериатрические средства: экспериментальный поиск и клиническое использование.— Киев, 1990.— С. 129—130.
37. Тарусов В. И. // Надежность клеток и тканей.— Киев, 1980.— С. 16—18.
38. Шершевская С. Ф. // Терапевтическая офтальмология.— М., 1985.— С. 322—358.
39. Эмануэль Н. М. // Геронтология и гериатрия: Ежегодник.— Киев, 1979.— С. 118—127.
40. Эмануэль Н. М., Островский М. Д. Химическая физика проблемы «Глаз и солнце» (Свободнорадикальные механизмы фотоповреждения глаза).— М., 1983.
41. Юсифов Э. Ю., Сакина Н. Л., Дошиев А. Е. // Биохимия.— 1980.— Т. 45, № 8.— С. 1470—1475.
42. Anderson R. E., Benolken R. M., Dudley P. A. et al. // Exp. Eye Res.— 1974.— Vol. 18, N 3.— P. 205—213.
43. Anderson R. E., Maude M. B. // Arch. Biochem.— 1972.— Vol. 151, N 1.— P. 270—276.
44. Benolken R. M., Anderson R. E., Wheller T. G. W. // Science.— 1973.— Vol. 82.— P. 1253—1254.
45. Borges J. H. D., Li Zong-Yi M. D., Tso M. O. M. // Arch. Ophthalmol.— 1990.— Vol. 108, N 5.— P. 727—733.
46. Gastro-Correia J., Coutinho M. F., Maria J. et al. // Ophthalmologie.— 1988.— Vol. 2, N 2.— P. 177—179.
47. Hayasaka S., Vin-Lok Lai // Exp. Eye Res.— 1979.— Vol. 29, N 2.— P. 123—129.
48. Joselyn P. C. Biochemistry of the SH-Compounds.— New York, 1972.
49. Krebs H. A., Veech R. L. // Pyridine Nucleotide Dependent Dehydrogenases.— Berlin, 1970.— P. 413—438.
50. Melrose M., Magargal L., Lucier A. // Ophthalm. Surg.— 1985.— Vol. 16.— P. 648—651.
51. Naseman J. // Z. prakt. Augenheilk.— 1988.— Bd 9, N 7.— S. 375—378.
52. Nohl H., Hegner D., Summer K. H. // Mech. Ageing Develop.— 1979.— Vol. 11, N 3.— P. 145—151.
53. Organisciak D. T., Wang H. M., Li Z. Y., Tso M. O. // Invest. Ophthalm. Vis. Sci.— 1985.— Vol. 26, N 11.— P. 1580—1588.
54. Penn J. S., Baker B. N., Howard A. G., Williams T. P. // Exp. Eye Res.— 1985.— Vol. 41, N 3.— P. 275—284.
55. Robinson M. F., Goldfrey P. J., Thomson C. D. et al. // Amer. J. clin. Nutr.— 1979.— Vol. 32, N 7.— P. 1477—1485.
56. Ruffolo J. J., Ham W. T., Mueller H. A., Millen J. E. // Invest. Ophthalm. Vis. Sci.— 1984.— Vol. 25, N 7.— P. 893—898.
57. Stark H. // Klin. Mbl. Augenheilk.— 1985.— Bd 187, N 4.— S. 296—302.
58. Takamashi V. // Soc. Ophthalm. jap.— 1975.— Vol. 79, N 9.— P. 1167—1176.
59. Valassory H. F., Anderhofer C. K., Knox C. A. // J. Neurochem.— 1984.— Vol. 43, N 2.— P. 409—412.
60. West Sh. K., Rosenthal F. S. // Arch. Ophthalmol.— 1989.— Vol. 107, N 6.— P. 875—879.
61. Yew D. T., Tsang D. S. C., Chan Y. W. // Acta anat.— 1985.— Vol. 123, N 1.— P. 34—38.

Поступила 15.04.93

THE ANTIOXIDATION VITAMINS AND AGE-DEPENDENT DYSTROPHY OF THE RETINA.

A. M. Soldatova, O. N. Voskresensky, N. I., Pirogov Medical School, Odessa.

Importance of free radical oxidation in development of age-dependent dystrophy of retina was studied. The newly developed hypothesis of the disease pathogenesis suggests that an increase in the rate of photosensitized free radical oxidation occurred in retina tissue due to a deficiency in reduction equivalents in these patients as well as to a lack of exogenous antioxidants. Complexes of vitamins-antioxidants were advanced for treatment of the patients with sclerotic maculodystrophy.

© Е. Л. ДОВЕДОВА, 1994

УДК 615.214.32.015.4.076.9

Е. Л. Доведова

К МЕХАНИЗМУ ДЕЙСТВИЯ АМФЕТАМИНА НА НЕЙРОМЕДИАТОРНЫЕ СИСТЕМЫ МОЗГА

НИИ мозга РАМН, Москва

В настоящее время можно считать установленным факт правомерности экспериментального моделирования на животных симптомов психопатологических расстройств у человека, вызванных некоторыми лекарственными препаратами [4, 6, 8]. Многочисленные экспериментальные данные подтверждают моноаминовую гипотезу происхождения симптомов, присущих шизофрении [1, 15, 19]. В связи с этим правомерен интерес к изучению химических механизмов нейромедиаторных систем при экспериментальном воздействии.

При системном введении амфетамина экспериментальным животным возникает комплекс поведенческих реакций, определяемый в литературе как фенаминовая стереотипия (ФС) поведения. При этом ведущую роль в развитии ФС играют накопление в мозге дофамина (ДА) и гиперфункция дофаминовой системы [1, 11, 17].

В настоящей работе изучено состояние нейромедиаторных систем по уровню биогенных аминов: ДА, норадреналина (НА), серотонина (Сер) и их основных метаболитов — гомованилиновой кислоты (ГВК) и 5'-оксииндолуксусной кислоты (5'-ОИУК). Исследована также активность ферментов утилизации нейромедиаторов — моноаминоксидазы (МАО) типа А и Б и ацетилхолинэстеразы (АХЭ) — в сенсомоторной коре и хвостатом ядре мозга крыс под влиянием амфетамина.

Методика. Эксперименты проведены на половозрелых животных — крысах линии Вистар массой 250—300 г, разделенных на 3 группы. В 1-ю группу вошло 15 контрольных крыс, во 2-ю — 15 экспериментальных крыс, которым однократно внутрибрюшинно вводили амфетамин в дозе 2,5 мг на 1 кг массы тела и в течение 60 мин наблюдали за поведением животных. Введение препарата крысам вызывало беспокойство, повышение двигательной активности. В 3-ю группу

вошло 15 экспериментальных крыс, которые получали амфетамин в течение 3 нед ежедневно в указанной дозе (общее количество препарата 52,5 мг на 1 кг массы тела). Через 60 мин после последней инъекции животных декапитировали под легким эфирным наркозом и мозг брали для исследования. Во всех группах объектом исследования служили гомогенаты и фракции митохондрий коры и хвостатого ядра, выделенные при помощи дифференциального центрифугирования при 0 °С [2].

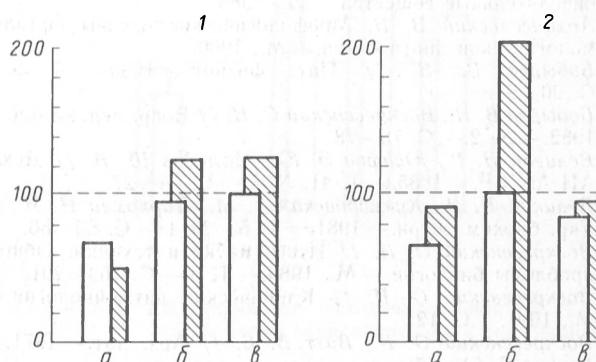


Рис. 1. Влияние амфетамина на ферментативную активность во фракции митохондрий моторной коры (1) и хвостатого ядра (2) мозга крыс.

а — МАО; б — МАО Б; в — АХЭ. Незаштрихованные столбики — амфетамин, 60 мин; заштрихованные столбики — амфетамин, 3 нед. Здесь и на рис. 2 звездочка — результаты статистически достоверны ($p < 0,05$) и представлены в % по отношению к контролю, контроль — 100 %.

В указанных фракциях спектрофотометрически определяли содержание белка: активность МАО А и Б — соответственно по методу [16] при 250 нм и по методу [3] при 450 нм, активность АХЭ по методу [14] при 540 нм. Результаты выражали в единицах удельной активности ферментов на 1 мг белка фракции. Содержание биогенных аминов и их метаболитов определяли соответственно флюориметрически в гомогенатах мозга по методу [5] и [7] и выражали в пикограммах.

Результаты каждой серии опытов обрабатывали статистически по Стьюденту.

Результаты и обсуждение. На рис. 1 и в табл. 1 видно, что при однократном введении амфетамина через 60 мин в обоих образованиях мозга практически не изменяется активность МАО Б (субстрат — паранитрофенил-

Таблица 1

Удельная активность МАО А, Б и АХЭ во фракциях митохондрий мозга крыс в норме и при введении амфетамина

Условия опыта	Моторная кора			Хвостатое ядро		
	МАО А, ΔЕ ₂₅₀ /мгб	МАО Б, ΔЕ ₂₅₀ /мгб	АХЭ, мкМ Ах/мгб	МАО А, ΔЕ ₂₅₀ /мгб	МАО Б, ΔЕ ₂₅₀ /мгб	АХЭ, мкМ Ах/мгб
Контроль	8,96±0,82	3,10±0,21	8,21±0,9	11,62±1,20	3,6±0,30	16,9±1,5
Амфетамин, 60 мин	6,0±0,51	3,0±0,18	8,20±0,5	7,40±0,9	3,6±0,15	14,4±1,0
Амфетамин, 3 нед	4,78±0,18	3,81±0,20	10,16±1,5	10,64±1,2	7,38±0,90	15,93±0,9

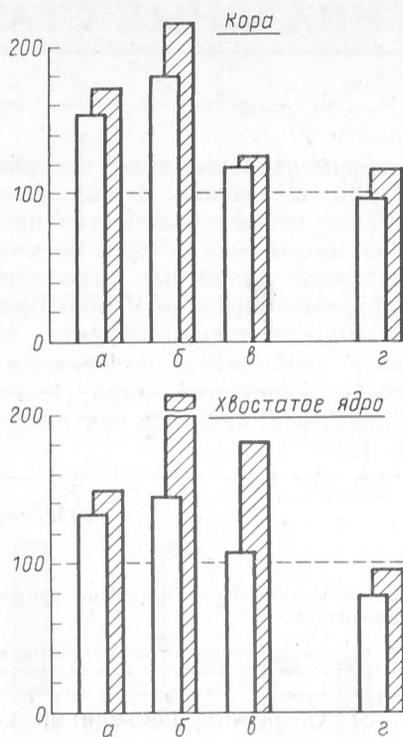


Рис. 2. Влияние амфетамина на оборот ДА, НА и Сер в моторной коре и хвостатом ядре мозга крыс.

а — ГVK/ДА; б — ГVK/НА; в — ДА/НА; г — ОИУК/Сер.

этиламии) и АХЭ, статистически достоверно снижается активность MAO А (субстрат — Сер). При длительном введении препарата активность MAO Б повышается в обоих образованиях мозга, особенно в хвостатом ядре (200 %), АХЭ — не изменяется в хвостатом ядре, но активизируется в коре; активность MAO А остается подавленной, особенно в коре (на 50 %). Можно предположить, что первоначально амфетамин подавляет активность MAO А, не влияя на активность MAO Б и АХЭ в обоих образованиях мозга.

В литературе имеются сведения об участии серотонинергической системы в первичном эффекте амфетамина [10]. При этом уровень биогенных аминов в мозге и особенно конечных продуктов их обмена отражает специфику воздействия амфетамина в различные сроки его введения. Так, краткосрочное (60 мин) введение препарата практически не отражается на уровне ДА и НА, но при этом значительно повышается содержание ГVK в обоих образованиях мозга (210 и 140 %). Одновременно отмечено снижение содержания Сер и 5'-ОИУК в коре и хвостатом ядре.

При длительном действии амфетамина показано повышение уровня ДА (но не НА), особенно в хвостатом ядре, при дальнейшем увеличении уровня ГVK (229 и 246 % соответственно). Уровень Сер сохраняется неизменным и не превышает нормального уровня (табл. 2, 3).

Расчет оборота нейромедиаторов (отношение ГVK/ДА, ГVK/НА, 5'-ОИУК/Сер) в ткани мозга показал, что под влиянием амфетамина оборот ДА и НА значительно увеличивается при обоих сроках воздействия препарата, при этом при однократном введении амфетамина отношение конечного продукта обмена катехоламинов (КА) — ГVK — для ДА и НА относительно одинаково и значительно меньше, чем при длительном введении препарата, особенно для НА (рис. 2).

Из литературы известно, что использование блокаторов ДА-рецепторов (но не НА-рецепторов) значительно подавляет двигательную активность, вызванную амфетамином [17]. Это свидетельствует о том, что ДА-медиация играет решающую роль в проявлении локомоторной активности, вызванной амфетамином.

В то же время, несмотря на то что НА играет второстепенную роль в детерминации воздействий амфетамина на двигательную активность, некоторые исследования показали, что НА может выступать синергистом ДА [8]. При более длительном введении препарата амфетамина в результате гиперчувствительности ДА-рецепторов происходит истощение дофаминовой системы, подавление нейрональной активности и снижение синаптической плотности на 50 % в коре и стриатуме [19].

Полученные в работе данные свидетельствуют об активации катехоламиновой системы, значительно усиливающейся при хроническом воздействии амфетамина. Взаимотношение ДА и НА рассчитано по уровню ДА/НА и отличается от контрольного только в ткани хвостатого ядра при длительном воздействии амфетамина. Помимо накопления ДА, отношение ДА/НА имеет большое значение в развитии ФС [11].

Оборот Сер во всех условиях эксперимента практически не отличается от контроля (см. рис. 2). Однако абсолютные величины ферментной активности (MAO А) и уровни медиатора и его конечного продукта свидетельствуют о подавлении серотонинергической системы в целом. Основываясь на представлении о тормозной функции Сер в организации поведенческих реакций, можно предположить, что более низкий уровень обмена Сер является отражением усиления ФС [12].

При стереотипии, вызванной амфетамином и апоморфином, не изменяется активность АХЭ в стриатуме. Одновременное возбуждение серо-

Таблица 2

Содержание биогенных аминов и их метаболитов в гомогенатах моторной коры мозга крыс в норме и при введении амфетамина

Биогенные амины и их метаболиты, нг на 1 г ткани	Контроль (I)	Амфетамин (II), 3 нед	II/I, %	Амфетамин (III), 60 мин	III/I, %
ДА	1226±12,6	1624±15,0	132,5	1672±36,2	136,4
НА	226,0±4,3	239,5±3,5	105,9	259,9±28,0	115,2
Сер	347,5±28,0	264,4±12,0	76,1	297,5±16,0	85,6
5'-ОИУК	195,6±15,2	166,0±70,0	84,9	158±10,2	81,0
ГVK	5,04±0,5	11,5±1,5	229,0	10,6±1,2	210,3

Содержание биогенных аминов и их метаболитов в гомогенатах хвостатого ядра мозга крыс в норме и при введении амфетамина

Биогенные амины и их метаболиты, $\mu\text{г}$ на 1 г ткани	Контроль (I)	Амфетамин (II), 3 нед	И/И. %	Амфетамин (III), 60 мин	И/И. %
ДА	7255 \pm 84,3	11750 \pm 35,2	162,1	7690 \pm 50,0	106,0
НА	1174 \pm 9,4	1204 \pm 20,3	87,4	1132,3 \pm 22,0	97,3
Сер	6512 \pm 51,4	6765 \pm 28,8	103,9	5795 \pm 43,6	89,0
5'-ОИУК	729,6 \pm 30,4	719,4 \pm 12,3	98,6	503,8 \pm 9,8	69,0
ГВК	12,8 \pm 0,9	31,5 \pm 1,5	246	18,2 \pm 0,8	142,2

тонинергических и холинергических систем приводит к уменьшению ФС [15].

Наблюдаемые изменения в активности исследуемых нейромедиаторных систем индивидуальны и неодинаковы как в отдельных образованиях мозга, так и в динамике фармакологического воздействия. Можно считать, что амфетамин вызывает определенную реципрокность указанных изменений: повышает активность КА медиации и подавляет серотонинергическую медиацию.

Таким образом, можно сделать вывод о том, что амфетамин в стриокортикальных структурах мозга в значительной степени усиливает активирующие механизмы нейромедиаторных систем с одновременным угнетением деятельности тормозных систем. Большинство исследователей объясняют механизм действия алкаламинов и, в частности, амфетамина активацией нейромедиаторных процессов в корковых структурах за счет каудатного влияния на кору в тормозных нигростриатных ДА-синапсах. Возможно прямое воздействие ДА-, НА- и АХ-синапсов в коре [13, 15].

Действие амфетамина *in vivo* приводит к усилению центральной ДА-передачи. Остальные компоненты нейромедиаторных систем играют, по-видимому, второстепенную роль при запуске КА механизмов, однако эти изменения отражаются на их взаимодействии [9, 18].

Полученные в работе экспериментальные данные демонстрируют связь механизмов движений и их нарушений при заболеваниях с измененным состоянием нейромедиаторных систем в стриокортикальных структурах мозга на субклеточном уровне. Особенности этих изменений зависят не только от дозы соответствующих препаратов, но и от длительности их применения.

ЛИТЕРАТУРА

1. Арушанян Э. Б., Толпышев Б. А. // Бюл. exper. биол.— 1984.— № 10.— С. 450—453.
2. Бизольд Д. // Биохимия и функция нервной системы.— Л., 1967.— С. 115—121.
3. Горкин В. З., Вережкина А. В., Гриднева Л. И. и др. // Современные методы в биохимии.— М., 1968.— Т. 2.— С. 155—157.
4. Громова Е. А. // Катехоламинергические нейроны.— М., 1979.— С. 97—105.
5. Козан Б. М., Печев Н. В. // Лаб. дело.— 1979.— № 5.— С. 301—303.
6. Крыжановский Г. Н. Детерминантные структуры в патологии нервной системы.— М., 1980.— С. 358.
7. Anden N. E., Roos B. E. // Life Sci.— 1963.— Vol. 7.— P. 448—458.
8. Anden N. E. // Advanc. in Parkinsonism. Proch. Sci.— Basel, 1976.— P. 169—176.
9. Cools A. R. Cocaine and other Stimulants.— New York, 1977.
10. Cliftas W., Callaway M., Johnson M. P., Jold L. H. et al. // Psychopharmacology.— 1991.— Vol. 104.— P. 293—301.
11. Elinwood E. H. // Neuropsychopharmacology of Monoamines and their Regulatory Enzymes.— New York, 1974.— P. 150—156.

12. Fuxe K., Ungerstedt S. // Amphetamines and Related Compounds.— New York, 1970.— P. 41—51.
13. Hornykiewicz O. // Pharmacol. a. Toxicol.— 1977.— Vol. 17.— P. 546—559.
14. Hestrin S. // J. biol. Chem.— 1949.— Vol. 180.— P. 249—255.
15. Kokkinidis L., Anisman H. // Psychol. Bull.— 1980.— Vol. 88, N 3.— P. 551—579.
16. Popov N., Roslev V., Thiemann C., Mathies H. // Acta biol. med. germ.— 1971.— Vol. 26.— P. 239—241.
17. Roberts D. C. S., Lis A. P., Fibiger H. C. // Brain Res.— 1975.— Vol. 93.— P. 441—454.
18. Segal D. S., Weinberges S. B., Cahill J., Mc Cumny S. J. // Science.— 1980.— Vol. 207.— P. 904—906.
19. Sing M., Kay Stanley // Psychoendocrine Dysfunction.— New York; London, 1984.— P. 517—548.
20. Zecevic Zj, Rakic L. // Brain Res. Rev. Proc.— 1987.— Vol. 12.— P. 157—160.

Поступила 12.04.93

EFFECT OF AMPHETAMINE ON THE BRAIN NEUROTRANSMITTER SYSTEMS.

E. L. Dovedova

Institute of Brain, Russian Academy of Medical Sciences, Moscow.

Some biochemical patterns of the neurotransmitter system activity were studied in mitochondrial fraction of rat brain locomotor cortex and caudate nucleus under normal conditions as well as after short-term (60 min) and long-term (3 weeks) administration of amphetamine at a dose of 2.5 mg/kg. Under these conditions some alterations were detected in activity of monoamine oxidases of the A and B types involved in utilization of neurotransmitters as well as in content of catecholamines (dopamine, noradrenaline and serotonin). Similar alterations were also observed in the ratio between content of biogenic amines and their metabolic end-products: homovanilic and 5-hydroxyindole acetic acids which indicates the rate of the neurotransmitter metabolism. These alterations in parameters of the neurotransmitter systems were strongly individual and dissimilar depending both on localization in brain structures and on the step of the pharmacological treatment. Amphetamine appears to cause definite reciprocal alterations of the patterns studied: activation of the catecholamine-dependent mediation and inhibition of the serotonergic reactions.

© П. П. ГОЛИКОВ, Н. Ю. НИКОЛАЕВА, 1994

УДК 612.453.018:577.53/.06:615.31:546.33/.08

П. П. Голиков, Н. Ю. Николаева

МОДУЛЯЦИЯ ГЛЮКОКОРТИКОИДРЕЦЕПТОРНОГО ВЗАИМОДЕЙСТВИЯ ЭТАЗОЛ-НАТРИЕМ

НИИ скорой помощи им. Н. В. Склифосовского, Москва

Изучение влияния лекарственных средств на чувствительность рецепторов к эндогенным лигандам является одним из перспективных направ-

Содержание биогенных аминов и их метаболитов в гомогенатах хвостатого ядра мозга крыс в норме и при введении амфетамина

Биогенные амины и их метаболиты, нг на 1 г ткани	Контроль (I)	Амфетамин (II), 3 нед	II/I, %	Амфетамин (III), 60 мин	III/I, %
ДА	7255±84,3	11750±35,2	162,1	7690±50,0	106,0
НА	1174±9,4	1204±20,3	87,4	1132,3±22,0	97,3
Сер	6512±51,4	6765±28,8	103,9	5795±43,6	89,0
5'-ОИУК	729,6±30,4	719,4±12,3	98,6	503,8±9,8	69,0
ГВК	12,8±0,9	31,5±1,5	246	18,2±0,8	142,2

тонинергических и холинергических систем приводит к уменьшению ФС [15].

Наблюдаемые изменения в активности исследуемых нейромедиаторных систем индивидуальны и неодинаковы как в отдельных образованиях мозга, так и в динамике фармакологического воздействия. Можно считать, что амфетамин вызывает определенную рецепторность указанных изменений: повышает активность КА медиации и подавляет серотонинергическую медиацию.

Таким образом, можно сделать вывод о том, что амфетамин в стриокортикальных структурах мозга в значительной степени усиливает активирующие механизмы нейромедиаторных систем с одновременным угнетением деятельности тормозных систем. Большинство исследователей объясняют механизм действия алкиламинов и, в частности, амфетамина активацией нейромедиаторных процессов в корковых структурах за счет каудатного влияния на кору в тормозных nigro-стриатных ДА-синапсах. Возможно прямое воздействие ДА-, НА- и АХ-синапсов в коре [13, 15].

Действие амфетамина *in vivo* приводит к усилению центральной ДА-передачи. Остальные компоненты нейромедиаторных систем играют, по-видимому, второстепенную роль при запуске КА механизмов, однако эти изменения отражаются на их взаимодействии [9, 18].

Полученные в работе экспериментальные данные демонстрируют связь механизмов движений и их нарушений при заболеваниях с измененным состоянием нейромедиаторных систем в стриокортикальных структурах мозга на субклеточном уровне. Особенности этих изменений зависят не только от дозы соответствующих препаратов, но и от длительности их применения.

ЛИТЕРАТУРА

1. Арушанян Э. Б., Толпышев Б. А. // Бюл. exper. биол.— 1984.— № 10.— С. 450—453.
2. Бизольд Д. // Биохимия и функция нервной системы.— Л., 1967.— С. 115—121.
3. Горкин В. З., Веревкина А. В., Гриднева Л. И. и др. // Современные методы в биохимии.— М., 1968.— Т. 2.— С. 155—157.
4. Громова Е. А. // Катехоламинергические нейроны.— М., 1979.— С. 97—105.
5. Козан Б. М., Печаев П. В. // Лаб. дело.— 1979.— № 5.— С. 301—303.
6. Крыжановский Г. Н. Детерминантные структуры в патологии нервной системы.— М., 1980.— С. 358.
7. Anden N. E., Roos B. E. // Life Sci.— 1963.— Vol. 7.— P. 448—458.
8. Anden N. E. // Advanc. in Parkinsonism. Proch. Sci.— Basel, 1976.— P. 169—176.
9. Cools A. R. Cocaine and other Stimulants.— New York, 1977.
10. Cliftas W., Callaway M., Johnson M. P., Jold L. H. et al. // Psychopharmacology.— 1991.— Vol. 104.— P. 293—301.
11. Ellinwood E. H. // Neuropsychopharmacology of Monoamines and their Regulatory Enzymes.— New York, 1974.— P. 150—156.

12. Fuxe K., Ungerstedt S. // Amphetamines and Related Compounds.— New York, 1970.— P. 41—51.
13. Hornykiewicz O. // Pharmacol. a. Toxicol.— 1977.— Vol. 17.— P. 546—559.
14. Ijestrin S. // J. biol. Chem.— 1949.— Vol. 180.— P. 249—255.
15. Kokkinidis L., Anisman H. // Psychol. Bull.— 1980.— Vol. 88, N 3.— P. 551—579.
16. Popov N., Roslev V., Thiemann C., Mathies H. // Acta biol. med. germ.— 1971.— Vol. 26.— P. 239—241.
17. Roberts D. C. S., Lis A. P., Fibiger H. C. // Brain Res.— 1975.— Vol. 93.— P. 441—454.
18. Segal D. S., Weinberges S. B., Cahill J., Mc Cumny S. J. // Science.— 1980.— Vol. 207.— P. 904—906.
19. Sing M., Kay Stanley // Psychoendocrine Dysfunction.— New York; London, 1984.— P. 517—548.
20. Zecevic Zj, Rakic L. // Brain Res. Rev. Proc.— 1987.— Vol. 12.— P. 157—160.

Поступила 12.04.93

EFFECT OF AMPHETAMINE ON THE BRAIN NEUROTRANSMITTER SYSTEMS.

E. L. Dovedova

Institute of Brain, Russian Academy of Medical Sciences, Moscow.

Some biochemical patterns of the neurotransmitter system activity were studied in mitochondrial fraction of rat brain locomotor cortex and caudate nucleus under normal conditions as well as after short-term (60 min) and long-term (3 weeks) administration of amphetamine at a dose of 2.5 mg/kg. Under these conditions some alterations were detected in activity of monoamine oxidases of the A and B types involved in utilization of neurotransmitters as well as in content of catecholamines (dopamine, noradrenaline and serotonin). Similar alterations were also observed in the ratio between content of biogenic amines and their metabolic end-products: homovanilic and 5-hydroxyindole acetic acids which indicates the rate of the neurotransmitter metabolism. These alterations in parameters of the neurotransmitter systems were strongly individual and dissimilar depending both on localization in brain structures and on the step of the pharmacological treatment. Amphetamine appears to cause definite reciprocal alterations of the patterns studied: activation of the catecholamine-dependent mediation and inhibition of the serotonergic reactions.

© П. П. ГОЛИКОВ, Н. Ю. НИКОЛАЕВА, 1994

УДК 612.453.018:577.53/.06:615.31:546.33/.08

П. П. Голиков, Н. Ю. Николаева

МОДУЛЯЦИЯ ГЛЮКОКОРТИКОИДРЕЦЕПТОРНОГО ВЗАИМОДЕЙСТВИЯ ЭТАЗОЛ-НАТРИЕМ

НИИ скорой помощи им. Н. В. Склифосовского, Москва

Изучение влияния лекарственных средств на чувствительность рецепторов к эндогенным лигандам является одним из перспективных направ-

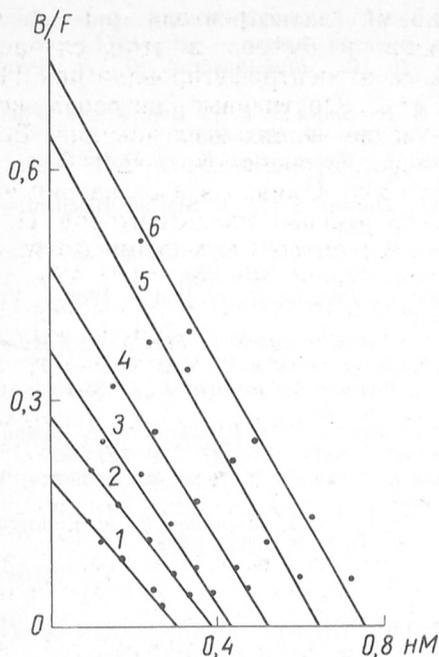


Рис. 3. Анализ Скэтчарда специфического связывания ^3H -кортикоостерона глюкокортикоидными рецепторами III типа под влиянием этазол-натрия.

По оси абсцисс — связанный ^3H -кортикоостерон; по оси ординат — отношение связанного ^3H -кортикоостерона (В) к свободному (F). 1 — контроль; этазол-натрий: 2 — 0,62 мМ; 3 — 1,25 мМ; 4 — 2,5 мМ; 5 — 5,0 мМ; 6 — 10,0 мМ.

жащие немеченый гормон или этазол-натрий, вносили 100 мкл соответствующего буфера для восполнения объема. В данном случае этазол-натрий использовали в концентрациях 0,62, 1,25, 2,5, 5 и 10 мМ. Пробы инкубировали при 0°C всего 15 мин. Не связанный рецепторами III типа ^3H -кортикоостерон удаляли 100 мкл суспензии угля (3,75 %) и декстрана-500 (0,375 %). Через 10 мин уголь отделяли центрифугированием при 2000 g в течение 10 мин при 0°C . Последующие этапы сходны с теми, которые проводили при определении функции глюкокортикоидных рецепторов II типа.

Плотность специфических глюкокортикоидных рецепторов II и III типов, их специфические константы ассоциации и диссоциации определяли с помощью анализа Скэтчарда [15]. О характере ингибирования или стимулирования функции глюкокортикоидных рецепторов этазолом судили на основании анализа Лайнуивера—Берка [1, 5, 16]. Концентрацию белка в цитозоле определяли методом Лоури [12].

В работе использованы 1,2,4- ^3H -АТ (22 Ки/ммоль), 1,2,6,7- ^3H -кортикоостерон (80 Ки/ммоль) фирмы «Амершам» (Англия), немеченый ацетонид триамцинолона и кортикоостерон фирмы «Сигма» (США), этазол-натрий отечественного производства, остальные реагенты — производства фирмы «Мерк» (Германия).

Результаты и обсуждение. Исследование влияния этазол-натрия на функцию глюкокортикоидных рецепторов II типа показало (рис. 1), что препарат существенно снижает плотность глюкокортикоидных рецепторов II типа. Снижение плотности рецепторов находится в прямой зависимости от концентрации этазол-нат-

рия (контроль — $52,0 \text{ фмоль} \cdot \text{мг}^{-1}$ белка; этазол-натрий: 6,2 мМ — $34,0 \text{ фмоль} \cdot \text{мг}^{-1}$ белка, 12,5 мМ — $30 \text{ фмоль} \cdot \text{мг}^{-1}$ белка, 25,0 мМ — $23 \text{ фмоль} \cdot \text{мг}^{-1}$ белка). Параллельно со снижением плотности глюкокортикоидных рецепторов II типа этазол-натрий снижал и константу ассоциации стероидрецепторного комплекса (контроль — $2,17 \cdot 10^9 \text{ M}^{-1}$; этазол-натрий: 6,2 мМ — $1,03 \cdot 10^9 \text{ M}^{-1}$, 12,5 мМ — $0,61 \cdot 10^9 \text{ M}^{-1}$, 25 мМ — $0,42 \cdot 10^9 \text{ M}^{-1}$). Константа диссоциации комплекса под влиянием этазол-натрия, наоборот, увеличивалась в зависимости от концентрации препарата.

Из анализа Лайнуивера—Берка специфического связывания ^3H -АТ глюкокортикоидными рецепторами II типа следует (рис. 2), что этазол-натрий конкурентно ингибирует функцию глюкокортикоидных рецепторов II типа, поскольку кривые специфического связывания имеют одну точку пересечения, расположенную на оси ординат.

Таким образом, полученные данные свидетельствуют о том, что этазол-натрий снижает плотность глюкокортикоидных рецепторов II типа путем изменения конформации глюкокортикоид-связывающего локуса.

Изучение влияния этазол-натрия на функцию глюкокортикоидных рецепторов III типа показало (рис. 3), что препарат дозозависимо увеличивает плотность глюкокортикоидных рецепторов III типа (контроль — $59,0 \text{ фмоль} \cdot \text{мг}^{-1}$ белка; этазол-натрий: 0,62 мМ — $75,0 \text{ фмоль} \cdot \text{мг}^{-1}$ белка, 1,25 мМ — $85,0 \text{ фмоль} \cdot \text{мг}^{-1}$ белка, 2,50 мМ — $103,0 \text{ фмоль} \cdot \text{мг}^{-1}$ белка, 5,00 мМ — $129,0 \text{ фмоль} \cdot \text{мг}^{-1}$ белка, 10,00 мМ — $148,0 \text{ фмоль} \cdot \text{мг}^{-1}$ белка). Под влиянием этазол-натрия дозозависимо повышалась константа ассоциации стероид-рецепторного комплекса (контроль — $0,66 \cdot 10^9 \text{ M}^{-1}$; этазол-натрий: 0,62 мМ — $0,73 \cdot 10^9 \text{ M}^{-1}$, 1,25 мМ — $0,86 \cdot 10^9 \text{ M}^{-1}$, 2,5 мМ — $0,9 \cdot 10^9 \text{ M}^{-1}$, 5,0 мМ — $0,97 \cdot 10^9 \text{ M}^{-1}$, 10,0 мМ — $0,99 \cdot 10^9 \text{ M}^{-1}$). Одновременно под влиянием этазол-натрия снижалась константа диссоциации комплекса.

Из анализа Лайнуивера—Берка специфического связывания ^3H -кортикоостерона глюкокортикоидными рецепторами III типа следует (рис. 4), что этазол-натрий неконкурентно повышает плотность глюкокортикоидных рецепторов III типа, так как кривые связывания пересекаются в точке, расположенной вне оси ординат.

Полученные данные свидетельствуют о том,

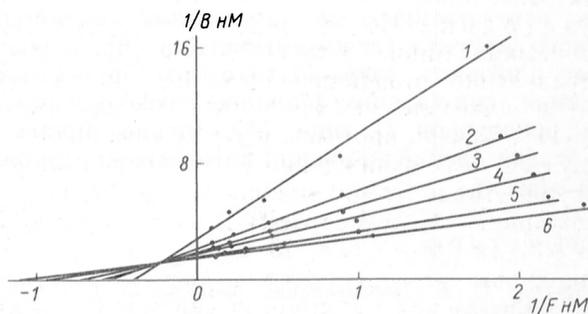


Рис. 4. Анализ Лайнуивера — Берка специфического связывания ^3H -кортикоостерона глюкокортикоидными рецепторами III типа под влиянием этазол-натрия.

Обозначения те же, что на рис. 3.

что этазол-натрий повышает плотность глюкокортикоидных рецепторов III типа за счет локусов, расположенных вне пределов специфического глюкокортикоидного локуса III типа.

При изучении влияния нестероидных веществ на функцию глюкокортикоидных рецепторов II типа было установлено, что ненасыщенные жирные кислоты снижают плотность глюкокортикоидных рецепторов II типа и их константу ассоциации [16]. Ингибирование функции глюкокортикоидных рецепторов ненасыщенными жирными кислотами происходит по неконкурентному типу, что дало основание этим авторам предполагать наличие другого локуса на рецепторной молекуле, расположенного вне пределов специфического глюкокортикоидного локуса, воспринимающего сигнал от ненасыщенных жирных кислот. В результате происходит изменение конформации всей рецепторной молекулы, которое обуславливает снижение функции глюкокортикоидного рецептора II типа.

В наших исследованиях этазол-натрий также угнетал плотность глюкокортикоидных рецепторов II типа и снижал константу ассоциации комплекса. Однако ингибирование функции этих рецепторов этазол-натрием было конкурентным. По-видимому, этазол-натрий воздействует непосредственно на специфический глюкокортикоидный локус, вызывая его конформационные изменения, что приводит к угнетению функции глюкокортикоидного рецептора II типа.

Особый интерес вызывают данные о многократном повышении плотности глюкокортикоидных рецепторов III типа под влиянием этазол-натрия. Можно было предположить, что это повышение плотности глюкокортикоидных рецепторов III типа происходит за счет глюкокортикоидных рецепторов II типа, которые трансформируются при воздействии этазол-натрия в глюкокортикоидные рецепторы III типа. Однако сравнительное сопоставление максимального уровня глюкокортикоидных рецепторов II и III типов свидетельствует о несоответствии такого предположения (глюкокортикоидные рецепторы II типа — 52 фмоль·мг⁻¹ белка, глюкокортикоидные рецепторы III типа — 148 фмоль·мг⁻¹ белка). По-видимому, этазол-натрий активирует новые локусы на глюкокортикоидном рецепторе III типа, которые функционально весьма сходны с глюкокортикоидным локусом III типа.

Исходя из того, что этазол-натрий снижает плотность истинных глюкокортикоидных рецепторов, ответственных за реализацию метаболического эффекта глюкокортикоидов [6], и повышает плотность глюкокортикоидных рецепторов III типа, снижающих функцию глюкокортикоидных рецепторов II типа [4], можно полагать, что этазол-натрий проявляет антиглюкокортикоидный эффект.

ЛИТЕРАТУРА

1. Бреслер С. Е. Молекулярная биология.— Л., 1973.— С. 146—155.
2. Голиков П. П. Рецепторные механизмы глюкокортикоидного эффекта.— М., 1988.
3. Голиков П. П., Кладиев А. А., Николаева Н. Ю. // Вестн. АМН СССР.— 1989.— № 7.— С. 20—28.
4. Голиков П. П., Кириллова Е. Г., Николаева Н. Ю. // Вопр. мед. химии.— 1983.— № 1.— С. 131—134.

5. Ленинджер А. Биохимия. Молекулярные основы структуры и функции клетки.— М., 1974.— С. 189—193.
6. Сергеев П. В., Шимановский П. Л. Рецепторы.— М., 1987.
7. Billiner S. B., Smith S. E. // Brit. J. clin. Pharmacol.— 1986.— Vol. 22.— P. 691—695.
8. Crossman A., Weerasuriya K. // Horm. Res.— 1987.— Vol. 25.— P. 65—71.
9. Duval D., Durant S. // J. Steroid Biochem.— 1984.— Vol. 20.— P. 283—287.
10. Henricks P., Esch B. // Europ. J. Pharmacol.— 1988.— Vol. 152.— P. 321—330.
11. Johansson L., Persson H. // Ibid.— 1986.— Vol. 130.— P. 97—103.
12. Lowry O. H., Rosebrough N. J., Farr A. L., Randall R. J. // J. biol. Chem.— 1951.— Vol. 193.— P. 265—275.
13. Renoir J., Radanyi S., Baulieu J. // Steroids.— 1989.— Vol. 53.— P. 1—20.
14. Risberg J., Hordnes C., Tyssebotn I. // Scand. J. clin. Lab. Invest.— 1987.— Vol. 47.— P. 521—527.
15. Scatchard T. // Ann N. Y. Acad. Sci.— 1949.— Vol. 51.— P. 660—665.
16. Vallette G., Vanet A., Sumida Ch. // Endocrinology.— 1991.— Vol. 129.— P. 1363—1369.

Поступила 20.10.92

SODIUM SULFAETHIDOLE MODULATION OF THE GLUCOCORTICOID-RECEPTOR INTERACTION.

P. P. Golikov, N. Yu. Nikolaeva

N. V. Sklifosovsky Institute of Emergency Care, Moscow.

The effect of sodium sulfaethidole on Types II and III glucocorticoid receptors was studied in liver cytosol fraction obtained from female Wistar rats of 180-200 g body weight. Functions of Type II glucocorticoid receptors in liver cytosol were evaluated by triamcinolone ³H-acetonide and Type III glucocorticoid receptors by ³H-corticosterone. The Scatchard and Laynuiver-Berck analyses indicated that sodium sulfaethidole decreased the density of Type II glucocorticoid receptors and the complex association constant. A decrease in functions of Type II glucocorticoid receptors in the presence of the drug occurred by the competitive type. At the same time, sodium sulfaethidole increased greatly the function of Type III glucocorticoid receptors and an increase in the density of these receptors was realized noncompetitively. The decrease in the functions of Type II glucocorticoid receptors and increase in that of Type III receptors in the presence of sodium sulfaethidole suggest that the drug exhibits antiglucocorticoid properties.

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 1994

УДК 616.379-008.64-07:616.127-008.939.15

С. А. Джавадов, А. А. Эйюбова, Л. К. Мамедова, Е. Б. Гельфгат, Г. Погача

КОЛИЧЕСТВЕННЫЙ АНАЛИЗ ФОСФОЛИПИДНОГО СОСТАВА МИОКАРДА ПРИ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОМ САХАРНОМ ДИАБЕТЕ: ВЛИЯНИЕ ТОТАЛЬНОЙ ИШЕМИИ

НИИ кардиологии Минздрава Республики Азербайджана, Баку, Национальный институт кардиологии, Будапешт, Венгрия

Сахарный диабет (СД), сопровождаемый относительной или абсолютной недостаточностью инсулина и гипергликемией, влияет практически на все системы организма, приводя в конечном счете к прогностически неблагоприятным осложнениям, главным образом со стороны сердечно-сосудистой системы. Изучение метаболизма миокарда при СД давно находится в центре внимания многих исследователей. До недавнего времени ухудшение сократительной функции сердца

у больных СД связывали с развитием атеросклероза, гипертонии, ангиопатий и других сопутствующих патологий. Однако, начиная с 70-х годов, проводились исследования на животных с использованием различных моделей экспериментального СД, результаты которых свидетельствуют о специфическом поражении сердца при данной патологии [11, 26, 33, 38].

Несмотря на проведение многочисленных исследований, точный молекулярный механизм нарушения сократительной способности миокарда при СД не известен. Хотя были обнаружены дефекты в отдельных звеньях метаболизма и функции сократительных кардиомиоцитов, причинно-следственная взаимосвязь между этими нарушениями не установлена. К метаболическим нарушениям, обнаруженным в сердце при СД, относятся: изменение изоферментного спектра миофибрилярной аденозинтрифосфатазы (АТФазы) [36]; дефекты в сократительных белках (актин и миозин), обусловленные нарушениями их структуры и конформации [25]; изменение кальциевого гомеостаза кардиомиоцитов за счет нарушения активности ферментов и насосов, регулирующих внутриклеточную концентрацию Ca^{2+} при сокращении и расслаблении сердечной мышцы [24, 34]; дефекты в энергетическом метаболизме, в частности в процессах гликолиза и гликогенолиза в цитоплазме, а также в цикле трикарбоновых кислот и окислительного фосфорилирования в митохондриях [27, 35]; нарушение липидного обмена, в первую очередь β -окисления жирных кислот, увеличения концентрации свободных жирных кислот и их производных, кетоновых тел и триглицеридов [23, 27].

Одним из главных аспектов в изучении сердца у больных СД является действие ишемии на их метаболизм и функцию. Экспериментальные исследования, проводимые до сих пор на разных видах животных с использованием различных моделей диабета и ишемии, свидетельствуют о низкой резистентности диабетических сердец к ишемии по сравнению с контрольными [20, 28], однако имеется ряд работ, не подтверждающих это заключение [41, 45], что оставляет данную проблему открытой как для экспериментаторов, так и для клиницистов.

Фосфолипиды являются основными структурными компонентами клеточных мембран. Учитывая огромную роль плазматических мембран в поддержании жизнедеятельности клетки, можно предположить, что любые функциональные и метаболические нарушения целостности клетки должны отразиться на составе фосфолипидов или быть результатом количественного и качественного изменения последних.

Целью настоящей работы явилось исследование количественного состава основных классов фосфолипидов, а также лизофосфолипидов (ЛФГ), являющихся токсичными продуктами гидролиза фосфолипидов, в сердцах диабетических животных в норме и при тотальной ишемии.

Методика. Эксперименты проводили на беспородных крысах и кроликах, а также на крысах линии Вистар и новозеландских кроликах. Были использованы самцы массой 250—350 г (крысы) и 1,7—2,2 кг (кролики).

Модель экспериментального диабета у кроли-

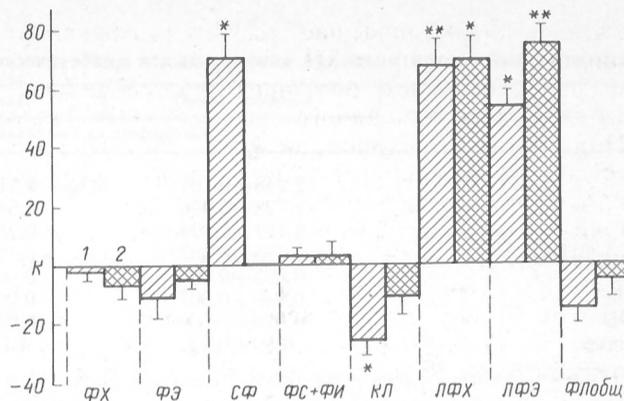


Рис. 1. Влияние СД (1) или тотальной ишемии продолжительностью 60 мин (2) на уровень фосфолипидов (в % от контроля — К) в миокарде крыс.

Одна звездочка — $p < 0,05$, две — $p < 0,01$.

ков была создана под нембуталовым наркозом путем внутривенного введения 160 мг на 1 кг массы тела аллоксан-тетрагидрата («Мегск», ФРГ), растворенного в физиологическом растворе. Диабет длился 4 нед. В течение диабета уровень глюкозы оценивали через каждую неделю с помощью индикаторных полосок («Dextrostix», «Miles», Великобритания). Для экспериментов использовали животных, у которых содержание глюкозы в крови колебалось от 26 до 30 ммоль/л (диабет — $28,3 \pm 0,7$ ммоль/л, контроль — $5,6 \pm 0,4$ ммоль/л). Экспериментальный диабет у крыс вызывали путем внутривенного введения 60 мг на 1 кг массы тела, аллоксан-тетрагидрата («Мегск», ФРГ), растворенного в 0,1 М цитратном буфере pH 4,5. Как и в предыдущем случае, продолжительность диабета составила 4 нед. Для эксперимента были взяты животные с уровнем глюкозы в крови 25—30 ммоль/л (диабет — $27,9 \pm 0,6$ ммоль/л, контроль — $6,1 \pm 0,3$ ммоль/л).

Модель тотальной ишемии была создана на изолированных и перфузируемых по методу Лангендорфа сердцах крыс и кроликов. Для этого сердца сначала были перфузированы раствором Кребса — Хензелейта [состав, в ммоль: NaCl — 118, $NaHCO_3$ — 25, NaЭДТА — 0,5,

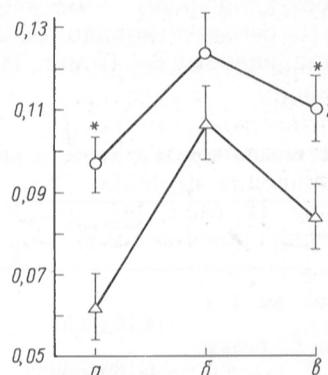


Рис. 2. Изменение содержания ЛФГ (ЛФГ=ЛФХ+ЛФЭ) в контрольных (1) и диабетических (2) сердцах крыс после тотальной ишемии продолжительностью 60 мин и реперфузии.

Звездочка — $p < 0,05$. По оси ординат — содержание ЛФГ, мкг фосфора на 1 мг белка. а — до ишемии, б — после ишемии, в — после реперфузии.

Фосфолипидный состав миокарда контрольных и диабетических крыс

Фосфолипиды	Контроль (n=8)	Диабет (n=7)	Контроль (n=8)	Диабет (n=7)
	мкг фосфора на 1 мг белка		% от общего количества фосфолипидов	
ФХ	2,248±0,101	2,214±0,085	41,62±1,38	43,26±1,67
ФЭ	1,725±0,096	1,541±0,122	31,87±0,96	29,14±1,24
СФ	0,191±0,024	0,288±0,041*	3,89±0,35	5,31±0,48**
ФС+ФИ	0,355±0,037	0,365±0,029	6,45±0,64	7,82±0,86
КЛ	0,893±0,098	0,664±0,081*	15,46±0,98	12,44±1,15*
ЛФХ	0,040±0,007	0,067±0,009**	0,55±0,26	1,02±0,15*
ЛФЭ	0,028±0,006	0,043±0,006*	0,42±0,12	0,72±0,10*
Общие	5,54±0,41	4,71±0,50		

Примечание. Здесь и на табл. 2 одна звездочка — $p < 0,05$, две — $p < 0,01$.

KCl — 4,7, K_2HPO_4 — 1,2, CaCl_2 — 3, MgSO_4 — 1,2, pH $7,35 \pm 0,05$, глюкоза — 5,5 (для перфузии сердца кролика) или 11 мМ (для перфузии сердца крысы) и лактат — 1 (для перфузии сердца кролика) в течение 25—30 мин, а потом остановлены кардиоплегическим раствором госпиталя Св. Томаса (состав, в ммоль: NaCl — 110, NaHCO_3 — 10, NaЭДТА — 0,5, KCl — 16, CaCl_2 — 1,2, MgCl_2 — 16, pH 7,8) в течение 3—5 мин. Ишемия была вызвана полным исключением протока в течение 60 мин. Была использована нормотермическая (37 °С) тотальная кардиоплегическая ишемия. За ишемией следовала реперфузия сначала кардиоплегическим раствором в течение 15 мин, а потом раствором Кребса—Хензелейта в течение 30 мин, при которой оценивалось постишемическое восстановление работы сердца.

Экстракция, разделение и количественный анализ фосфолипидов

Экстракцию фосфолипидов из гомогената и грубой фракции плазматических мембран миокарда проводили по методу Фолча и соавт. [12]. Экстрагированные фосфолипиды растворяли в 1 мл смеси, содержащей хлороформ — метанол в соотношении 2:1, и определяли общее содержание фосфора в этой пробе по методу Васковского и соавт. [46]. Разделение фосфолипидов проводили с помощью двухмерной тонкослойной хроматографии (ТСХ) на пластинках размером 10×10 см, покрытых 0,25 мм слоем силикагеля 60 (Kieselgel 60F₂₅₄, "Merck", ФРГ). На одну пластинку наносили 30—75 мкл раствора фосфолипидов в смеси хлороформ — метанол в соотношении 2:1, что соответствовало общему содержанию фосфора, равному 8—10 мкг. ТСХ в первом

направлении проводили в системе растворителей хлороформ — метанол — 25 % раствор гидроксида аммония в соотношении 65:35:8. Для ТСХ во втором направлении использовали систему растворителей хлороформ — метанол — уксусная кислота — вода в соотношении 75:60:10:8. Пятна, содержащие фосфолипиды, проявляли парами йода.

Количественное определение фосфора в пятнах, содержащих фосфолипиды, проводили с помощью микрометода, описанного Васковским и соавт. [46].

Определение других классов липидов проводили с помощью общеизвестных методов. Так, содержание холестерина определяли согласно методу Златкиса — Зака [3]. Для анализа общих липидов и триглицеридов были использованы наборы, выпускаемые фирмой «Lachema» (Чехословакия). Количество неэтерифицированных жирных кислот (НЭЖК) определяли по ранее описанному методу (под редакцией М. И. Прохоровой, 1982).

Концентрацию белка определяли по модифицированному методу Лоури, описанному Хартри [18], используя в качестве стандарта бычий сывороточный альбумин.

Статистический анализ. Статистическую обработку полученных данных проводили с помощью *t*-критерия Стьюдента. Результаты представлены как среднее ± средняя арифметическая ошибка. Значение $p < 0,05$ принималось как достоверное.

Результаты и обсуждение. В табл. 1 представлены абсолютные значения и процентные соотношения фосфолипидов в гомогенатах, выделенных из контрольных и диабетических сердец крыс. Следует отметить, что процентное распределение отдельных классов фосфолипидов миокарда, представленное в таблицах, хорошо совпадает с данными, полученными другими авторами [42, 43].

Экспериментальный диабет продолжительностью 1 мес у крыс вызывает изменения в абсолютных и относительных значениях отдельных классов фосфолипидов и ЛФГ. Особый интерес представляет значительное и достоверное увеличение концентрации лизофосфатидилхолина (ЛФХ) и лизофосфатидилэтаноламина (ЛФЭ) в диабетических сердцах. Так, содержание ЛФХ увеличивалось на 68 %, а фосфатидилэтаноламина (ФЭ) — на 54 % по сравнению с контролем (рис. 1). Наблюдалось также достоверное увеличение процентного содержания ЛФГ. В литературе практически отсутствуют данные о содержании ЛФГ в диабетических сердцах. Только в работе К. Окумура и соавт. [30] было показано, что экспериментальный диабет у крыс, вызванный

Таблица 2

Липидный состав сердца крысы в норме и при диабете

Липиды	Контроль (n=8)	Диабет (n=7)
Триглицериды, мг на 1 г белка	14,15±3,84	28,17±8,49*
Холестерин, мг на 1 г белка:		
общий	6,18±2,30	12,67±3,84*
свободный	3,02±1,13	5,28±1,62
этерифицированный	3,17±1,23	5,06±2,09
НЭЖК, ммоль на 1 г белка	12,45±2,78	36,62±11,19*
Фосфолипиды общие, мкг фосфора на 1 мг белка	5,54±0,41	4,71±0,50
Холестерин общий / фосфолипиды общие	1,10±0,28	2,17±0,35*

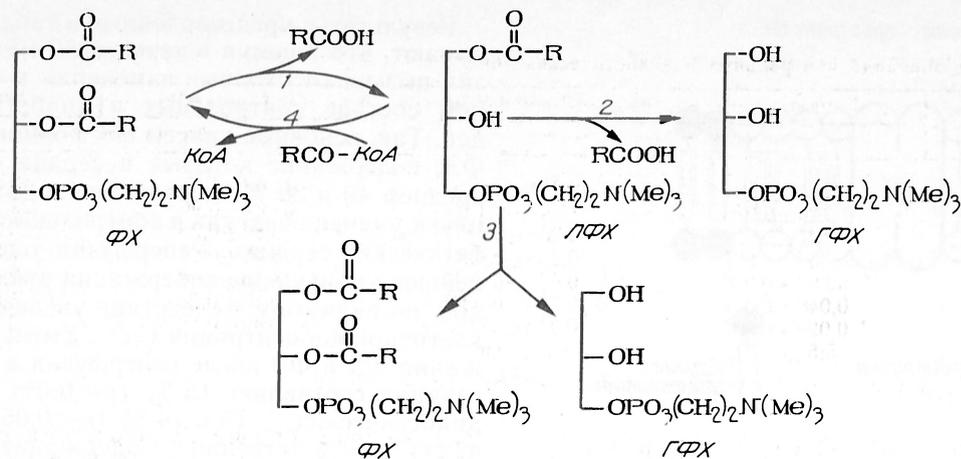


Рис. 3. Основные ферментативные пути метаболизма ЛФХ в миокарде.

Реакции катализируются следующими ферментами: 1 — фосфолипаза А₂ или А₁; 2 — лизофосфолипаза; 3 — лизофосфолипаза-трансацилаза; 4 — ацил-КоА: ЛФХ-ацилтрансацилаза [9]. ГФХ — глицерофосфорилхолин.

стрептозотоцином, приводит к повышению концентрации ЛФХ в сердце на 29 % через 4 нед после начала патологии. Результаты наших исследований демонстрируют достоверные изменения в содержании сфингомиелина (СФ) и кардиолипина (КЛ). Так, концентрация СФ в диабетических сердцах увеличилась на 51 % по сравнению с концентрацией в контроле. Диабет вызывал снижение уровня КЛ, специфичного для митохондрий фосфолипидов, на 26 % по сравнению с таковым в контроле (см. рис. 1). Кроме того, наблюдалось снижение, хотя и недостоверное, абсолютного содержания ФЭ в диабетических сердцах на 11 % по сравнению с аналогичным показателем в контроле. Каких-либо заметных изменений в концентрациях фосфатидилхолина (ФХ), фосфатидилсерина (ФС) и фосфатидилинозитола (ФИ) не наблюдалось (см. табл. 1). Изменение содержания отдельных фосфолипидов и ЛФГ отразилось на их общем содержании, которое, хотя и недостоверно, снизилось на 15 % по сравнению с таковым в контроле.

Аналогичные результаты исследования содержания фосфолипидов были получены для сердец диабетических кроликов. Наблюдалось увеличение концентрации ЛФГ и СФ и уменьшение содержания ФЭ и КЛ (данные не представлены).

Существующие к настоящему времени результаты исследований по количественному анализу основных классов фосфолипидов демонстрируют в разной степени изменения в составе фосфолипидов сердца и других органов в условиях экспериментального диабета. Так, было найдено, что диабет у крыс, вызванный аллоксаном, приводит к уменьшению концентрации ФЭ (на 14 %) и КЛ (на 7 %) при практически неизменном уровне ФХ, ФС и ФИ через 12 нед после начала диабета [17]. Степень гипергликемии и масса животных, показанные в этой работе, сравнимы с нашими данными. Анализ СФ и ЛФГ не проводился в обсуждаемой работе. Как видно, изменение содержания ФЭ и КЛ в диабетических сердцах согласуется с результатами, полученными нами. В другой работе диабет у крыс, вызванный стрептозотоцином, в течение 4 нед приводил также к уменьшению уровня КЛ (на 26 %) и ФЭ (на 10 %) и небольшому увеличению уровня (на 16 %) СФ по сравнению с аналогичными показателями в контроле при неизменном содержании ФХ [30]. В этом случае характер изменений также совпадает с нашими данными, хотя модель диабета, а также масса животных и уровень гипергликемии (более 600 мг%) отличались от наших. В литературе мы не встретили

Таблица 3

Влияние тотальной ишемии (продолжительностью 60 мин) и реперфузии на содержание (в мкг фосфора на 1 мг белка) фосфолипидов в контрольных и диабетических сердцах крыс

Фосфолипиды	Контрольные сердца			Диабетические сердца		
	до ишемии (n=8)	после ишемии (n=7)	после реперфузии (n=7)	до ишемии (n=7)	после ишемии (n=6)	после реперфузии (n=6)
ФХ	2,257±0,121	2,096±0,213	1,928±0,113 ⁺	2,196±0,118	1,995±0,124	1,860±0,141 ⁺
ФЭ	1,759±0,205	1,664±0,130	1,588±0,102	1,485±0,147	1,360±0,153*	1,278±0,164*
СФ	0,203±0,021	0,202±0,038	0,218±0,017	0,275±0,034*	0,253±0,029	0,264±0,030
ФС+ФИ	0,349±0,042	0,358±0,037	0,375±0,045	0,378±0,051	0,365±0,030	0,368±0,029
КЛ	0,857±0,107	0,759±0,074	0,731±0,102	0,571±0,089*	0,510±0,090*	0,494±0,055*
ЛФХ	0,037±0,009	0,063±0,011 ⁺	0,048±0,010	0,059±0,010*	0,074±0,014	0,067±0,012
ЛФЭ	0,025±0,006	0,044±0,004 ⁺⁺	0,036±0,006	0,038±0,004*	0,049±0,007 ⁺	0,043±0,004
Неидентифицированные	0,044±0,021	0,057±0,030	0,061±0,027	0,048±0,035	0,043±0,029	0,039±0,011
Общие	5,49±0,34	5,24±0,29	5,08±0,25	4,89±0,38	4,61±0,35	4,38±0,27*

Примечание. Здесь и в табл. 4 одна звездочка — $p < 0,05$, две — $p < 0,01$ (диабет относительно контроля); один крестик — $p < 0,05$, два — $p < 0,01$ (ишемическая и постишемическая группы относительно соответствующей предишемической группы).

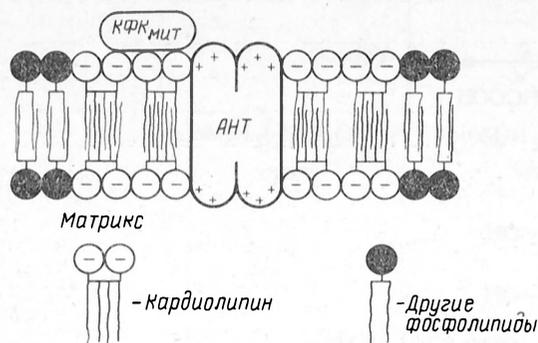


Рис. 4. Схематическое изображение структуры внутренней мембраны митохондрий, показывающее фосфолипидное окружение АТФ-АДФ-транслоказы [37].

АНТ — АТФ-АДФ-транслоказа, КФК_{МИТ} — митохондриальный изофермент креатинфосфокиназы.

больше работ, посвященных количественному анализу фосфолипидов сердца при экспериментальном диабете.

Диабет оказывал влияние также на содержание других классов липидов в сердце (табл. 2). Так, наблюдалось повышение концентрации триглицеридов (в 2 раза), общего содержания холестерина (в 2 раза) и НЭЖК (в 3 раза) в сердцах крыс при СД. Особенно важным являлось увеличение (в 2 раза) отношения общего содержания холестерина к общему содержанию фосфолипидов.

С целью сравнительного анализа полученных результатов с данными о фосфолипидном составе ишемического миокарда были проведены отдельные эксперименты на модели экспериментального диабета, осложненного тотальной ишемией продолжительностью 60 мин. Кардиоплегическая ишемия в течение 60 мин является транзиторной, т. е. при увеличении продолжительности ишемии более 60 мин не наблюдается постишемическое восстановление механической функции сердца. Мы решили использовать эту модель ишемии как модель глубокой ишемии, при реперфузии которой возможно лишь небольшое (для контрольных сердец — 28 %, для диабетических — 13 % [2]) восстановление работы сердца крысы. Выполнение этих экспериментов дало возможность сопоставить изменение уровня фосфолипидов со степенью постишемического восстановления сократительной функции контрольных и диабетических сердец.

Результаты, представленные в табл. 3 и 4, показывают, что ишемия в течение 60 мин и реперфузия вызывают сходные изменения в фосфолипидном составе контрольных и диабетических сердец. Так, основные классы фосфолипидов — ФХ и ФЭ, содержание которых в сердце составляет в среднем 40 и 30 % соответственно, имеют тенденцию к уменьшению как в контрольных, так и в диабетических сердцах. Реперфузия усиливает дальнейшее уменьшение содержания этих фосфолипидов, по-видимому, вследствие увеличения внутриклеточной концентрации Ca^{2+} . Уменьшение содержания ФХ и ФЭ после реперфузии в контрольных сердцах составляет 15 % ($p < 0,05$) и 10 %, а в диабетических — 15 и 14 % ($p < 0,05$ в обоих случаях) соответственно. Содержание КЛ также уменьшается в ходе ишемии и реперфузии. Если уровень данного фосфолипида в контрольных сердцах снижается на 11 и 15 % при ишемии и реперфузии соответственно, то в диабетических сердцах это снижение составляет 11 и 13 % для соответствующих групп. Несмотря на незначительное уменьшение содержания КЛ под действием ишемии и реперфузии, достоверная разница, наблюдаемая между контрольными и диабетическими сердцами до ишемии, сохранялась в ходе ишемии и реперфузии. Уровень СФ в контрольных сердцах оставался неизменным при ишемии и реперфузии, хотя в диабетических сердцах наблюдалась небольшая тенденция к уменьшению этого фосфолипида. В отличие от КЛ достоверная разница между контрольными и диабетическими сердцами по содержанию СФ, наблюдаемая в предышемической группе, была нарушена в ходе ишемии и реперфузии. Если уровень ФС и ФИ в контрольных сердцах имел тенденцию к увеличению при ишемии и реперфузии, то в диабетических сердцах содержание этих фосфолипидов имело тенденцию к уменьшению (см. табл. 3). Ишемия и реперфузия вызывали снижение общего уровня фосфолипидов в контрольных и диабетических сердцах. В группе после реперфузии наблюдалось достоверное различие между контролем и диабетом по общему содержанию фосфолипидов (контроль — $5,08 \pm 0,25$ мкг фосфора на 1 мг белка, диабет — $4,38 \pm 0,27$ мкг фосфора на 1 мг белка; $p < 0,05$).

Сравнительный анализ полученных данных показывает, что ишемия и реперфузия не влияют в одинаковой степени на уровень ЛФГ в контрольных и диабетических сердцах, хотя в обоих случаях наблюдается повышение их концентрации.

Таблица 4

Изменение фосфолипидного состава (в % от общего содержания фосфолипидов) контрольных и диабетических сердец крыс при тотальной ишемии (продолжительностью 60 мин) и реперфузии

Фосфолипиды	Контрольные сердца			Диабетические сердца		
	до ишемии (n=8)	после ишемии (n=7)	после реперфузии (n=7)	до ишемии (n=7)	после ишемии (n=6)	после реперфузии (n=6)
ФХ	40,84 ± 1,31	40,01 ± 1,23	39,27 ± 0,94	43,35 ± 0,78	43,28 ± 1,41	42,95 ± 1,13
ФЭ	31,93 ± 1,53	31,55 ± 0,74	31,18 ± 0,93	29,20 ± 1,08	29,34 ± 0,88	29,40 ± 0,63
СФ	3,85 ± 0,24	3,87 ± 0,63	4,27 ± 0,28	5,47 ± 0,53*	5,41 ± 0,49*	5,60 ± 0,35*
ФС+ФИ	6,28 ± 0,38	6,78 ± 0,50	7,39 ± 0,64	7,91 ± 0,38	7,94 ± 0,43	8,05 ± 0,31
КЛ	15,38 ± 1,42*	14,85 ± 1,20*	15,28 ± 0,85*	11,34 ± 1,39*	11,08 ± 1,05*	11,26 ± 0,97*
ЛФХ	0,67 ± 0,14	1,18 ± 0,20+	0,98 ± 0,17	1,19 ± 0,17*	1,57 ± 0,16+	1,50 ± 0,19*
ЛФЭ	0,43 ± 0,10	0,79 ± 0,13+	0,75 ± 0,23+	0,71 ± 0,14*	0,98 ± 0,18	0,98 ± 0,14
Неидентифицированные	0,62 ± 0,18	0,97 ± 0,32	0,88 ± 0,31	0,83 ± 0,29	0,80 ± 0,42	0,86 ± 0,31

Если ишемия и реперфузия вызывают увеличение содержания ЛФХ в контрольных сердцах соответственно на 70 % ($p < 0,05$) и 30 %, то в диабетических — на 25 и 14 % по сравнению с контролем. Нужно отметить, что увеличение концентрации ЛФХ в диабетических сердцах при ишемии и реперфузии увеличилось соответственно на 76 % ($p < 0,01$) и 44 %, а в диабетических — на 29 % ($p < 0,05$) и 13 % по сравнению с контролем. Как видно, концентрация ЛФГ в диабетических сердцах при ишемии возросла в меньшей степени, чем в контрольных сердцах (рис. 2). Если содержание ЛФХ и ЛФЭ в контрольных сердцах при ишемии увеличилось соответственно на 70 и 76 %, то в диабетических — на 25 и 29 % по сравнению с контролем. Интересно, что, несмотря на меньшую степень увеличения уровня ЛФГ в диабетических сердцах при ишемии, абсолютные значения этих метаболитов в последних были выше, чем в контрольных.

Таким образом, представленные результаты показывают, что экспериментальный диабет в течение 1 мес вызывал значительное и достоверное повышение содержания ЛФГ — токсичных веществ гидролиза фосфолипидов в сердце крысы. Высокий уровень ЛФГ также характерен для ишемических сердец, о чем свидетельствуют результаты экспериментов, проведенных на моделях региональной и тотальной ишемии [1]. Следует отметить, что диабет в отличие от ишемии вызывал резкие изменения в содержании фосфолипидов, в частности приводил к увеличению концентрации СФ и уменьшению уровня КЛ и ФЭ в сердце (см. рис. 2). Было отмечено, что тотальная транзиторная ишемия продолжительностью 60 мин вызывала заметные нарушения в фосфолипидном составе контрольных и диабетических сердец. При этом достоверная разница в абсолютных значениях фосфолипидов, наблюдаемая между контрольными и диабетическими сердцами до ишемии, сохранялась также после ишемии и реперфузии.

Какие механизмы могут объяснить нарушения фосфолипидного спектра сердца под действием СД? Одним из основных нарушений фосфолипидного состава диабетического сердца является увеличение содержания ЛФГ. Как уже отмечалось, ЛФГ вызывает ряд метаболических и функциональных нарушений в сердечных клетках, основными из которых являются ингибирование окислительного фосфорилирования в митохондриях [6], контрактура изолированных перфузируемых сердец [7], ингибирование активности таких мембранно-связанных ферментов, как Na^+ , K^+ -АТФаза [21], стимуляция аденилатциклазы [4], усиление входа Ca^{2+} в цитоплазму [40].

Существует несколько путей метаболизма ЛФГ, нарушение которых может привести к накоплению этих метаболитов [9, 10] (рис. 3). Первой ферментативной реакцией является гидролиз ФХ при участии фосфолипаз A_1 и A_2 , увеличение активности которых может привести к накоплению ЛФХ. В литературе отсутствуют данные, показывающие увеличение активности этих ферментов, хотя косвенно можно говорить о возможной активации фосфолипаз вследствие повышения внутриклеточной концентрации Ca^{2+} — активатора этих ферментов в клетках сердца диабетических животных. Второй причиной накопления ЛФХ в диа-

бетических сердцах может явиться ингибирование активности лизофосфолипазы, участвующей в превращении ЛФХ в глицерофосфорилхолин и жирную кислоту. Активность этого фермента в миокарде в несколько раз выше активности фосфолипазы [14]. Было показано, что свободные жирные кислоты, ацил-КоА и ацилкарнитин — метаболиты, которые накапливаются в диабетическом сердце, ингибируют активность цитозольной лизофосфолипазы [15]. Третьим ферментом метаболизма ЛФХ является лизофосфолипаза — трансацилаза, под действием которой образуется новая молекула ФХ и глицерофосфорилхолина из двух молекул ЛФХ. Было найдено, что пальмитоилкарнитин, концентрация которого увеличивается в диабетических сердцах, при низких концентрациях ингибирует активность лизофосфолипазы — трансацилазы [16].

Наконец, ЛФХ может накапливаться в результате ингибирования активности ацилтрансфераз — четвертого фермента метаболизма ЛФХ, участвующего в его реацилировании до ФХ [9]. Видно, что изменение активности одного или нескольких ферментов метаболизма ЛФХ может привести к его накоплению в сердце при диабете. Следует отметить, что для ишемического миокарда тоже характерны некоторые метаболические нарушения, которые, как и в случае диабета, могут изменить активность перечисленных выше ферментов и повысить содержание ЛФГ в сердце. Однако точный механизм накопления ЛФГ как в диабетическом, так и в ишемическом сердце не известен.

Увеличение содержания СФ и уменьшение уровня КЛ, по-видимому, происходят в результате нарушения процессов синтеза и (или) уменьшения этих фосфолипидов вследствие недостаточности инсулина. Эти изменения могут носить компенсаторный характер из-за уменьшения сократительной способности миокарда или быть причиной последнего. Другими словами, причинно-следственная взаимосвязь между нарушением фосфолипидного состава и уменьшением сократимости сердца в условиях диабета не выяснена.

Результаты, представленные нами ранее, продемонстрировали значительное снижение дыхательной функции митохондрий в сердцах диабетических животных, и при этом ингибирование активности АТФ—АДФ-транслоказы — фермента, участвующего в транспорте АТФ из матрикса митохондрий в цитоплазму, считалось одной из основных причин низкой скорости дыхания [2]. Активность АТФ—АДФ-транслоказы может быть нарушена в результате изменения липидного окружения фермента во внутренней мембране митохондрий. Данные, полученные в лаборатории Клингенберга и Сакса, свидетельствуют о том, что АТФ—АДФ-транслоказа находится в окружении КЛ-специфического для митохондрий фосфолипида, который играет большую роль в нормальном функционировании дыхательной цепи [5, 39]. При этом предполагается электростатическое взаимодействие отрицательно заряженных групп КЛ с АТФ—АДФ-транслоказой, которая в свою очередь функционально сопряжена с митохондриальной креатинкиназой (рис. 4). Было найдено, что каждая молекула АТФ—АДФ-транслоказы образует комплекс с шестью молекулами КЛ [5].

Исходя из этого, нарушение липидного окружения фермента может повлечь за собой изменение его активности. Результаты наших исследований демонстрируют достоверное уменьшение абсолютного и относительного содержания КЛ в сердце при СД. Снижение содержания КЛ в митохондриях диабетических животных, по-видимому, может играть определенную роль в нарушении активности АТФ--АДФ-транслоказы. Кроме того, ацил-КоА, концентрация которого увеличивается в сердцах диабетических животных [32], является также ингибитором этого фермента [36]. Было найдено, что ЛФГ, обладающие детергентоподобным эффектом, ингибируют процесс окислительного фосфорилирования в митохондриях. Известно, что ЛФГ являются амфифильными веществами, что дает возможность им взаимодействовать в одинаковой степени как с гидрофильными, так и с гидрофобными участками фосфолипидного бислоя различных мембран клетки. Неправильные, в отличие от фосфолипидов, формы этих метаболитов и амфифильность вызывают нарушение топографии мембран, образуя различные мицеллы внутри них [22].

ЛФГ влияют также на медленный ток Ca^{2+} через сарколемму [30] и активность Na^+ , K^+ -АТФазы [31], что, по-видимому, является причиной увеличения внутриклеточной концентрации Ca^{2+} под действием этих токсичных веществ [47]. Можно найти взаимосвязь между основными классами фосфолипидов, ФХ и ФЭ, и Ca^{2+} -насосом. Было показано, что активность Ca^{2+} -насоса может регулироваться процессом метилирования фосфолипида, который включает синтез ФХ и ФЭ с помощью специфических метилтрансфераз [44]. Было показано, что при СД процесс метилирования фосфолипидов в сердце ингибируется [13]. Исходя из этого, можно предположить возможность нарушения Ca^{2+} -насоса вследствие изменения фосфолипидного микроокружения Ca^{2+} -АТФазы в сарколемме, что в свою очередь может привести к Ca^{2+} -перегрузке клеток сердца при диабете. Транспорт Ca^{2+} может быть нарушен также в результате изменения отношения содержания холестерина к содержанию фосфолипида в сарколемме диабетических сердец. Коопером [8] было показано, что это соотношение является грубым доказательством текучести мембран. Увеличение соотношения холестерина и фосфолипидов в диабетическом миокарде (в 2 раза) в результате повышения концентрации первого, которое наблюдалось в наших исследованиях (см. табл. 2), может изменить текучесть сарколеммы и таким образом нарушить гидрофильность микроокружения белков, участвующих в транспорте Ca^{2+} . Изменение фосфолипидного состава может изменить транспорт Ca^{2+} не только через сарколемму, но и через мембрану митохондрий и саркоплазматического ретикулума. Было установлено нарушение транспорта Ca^{2+} в митохондриях и саркоплазматическом ретикулуме сердца при СД [19, 23]. Нельзя исключить также роль таких Ca^{2+} -связывающих белков, как кальмодулин, в нарушении кальциевого гомеостаза в кардиомиоцитах диабетического сердца. Было показано изменение концентрации кальмодулина в сердцах диабетических мышей [29].

Таким образом, СД вызывает серьезное нару-

шение в фосфолипидном составе миокарда, что в свою очередь может явиться одной из главных причин уменьшения сократительной способности сердца при данной патологии.

Авторы выражают благодарность сотрудникам научно-исследовательского отдела Национального института кардиологии (Венгрия) К. Вадас (K. Vadasz), Х. Хаваси (H. Havassy), Ж. Дарваш Петерне (Zs. Darvas Peterne) и И. Чес (I. Csosz) и сотруднице лаборатории молекулярной кардиологии НИИ кардиологии (Республика Азербайджан) И. В. Елюхиной за помощь при выполнении и оформлении данной работы.

ЛИТЕРАТУРА

1. Джавадов С. А., Преображенский А. И., Сакс В. А. // Биохимия.— 1986.— № 4.— С. 668—674.
2. Джавадов С. А., Джохаридзе Т. З., Джалишвили И. В. и др. // Там же.— 1992.— № 12.— С. 22—24.
3. Рубин В. И., Ларский Э. Г., Орлов Л. С. // Биохимические исследования в клинике.— Саратов, 1980.— С. 60—62.
4. Ahumada G. G., Bergmann S. R., Carlson E. et al. // Cardiovasc. Res.— 1979.— Vol. 13.— P. 377—382.
5. Beyer K., Klingenberg M. // Biochemistry (Wash.).— 1985.— Vol. 24.— P. 3826—3831.
6. Boime I., Smith E. E., Hunter E. E. Jr. // Arch. Biochem.— 1970.— Vol. 139.— P. 425—443.
7. Clarkson C. W., Ten Eick R. E. // Circulat. Res.— 1983.— Vol. 52.— P. 543—556.
8. Cooper R. A. // New Engl. J. Med.— 1977.— Vol. 297.— P. 371—377.
9. Corr P. B., Gross R. W., Sobel B. E. // Circulat. Res.— 1984.— Vol. 55.— P. 135—154.
10. Da Torre S. D., Creer M. H., Pogwizd S. M., Corr P. B. // J. molec. cell. Cardiol.— 1991.— Vol. 23.— P. 11—22.
11. Dhalla N. S., Pierce G. N., Innes I. R., Beamish R. E. // Canad. J. Cardiol.— 1985.— Vol. 1.— P. 263—284.
12. Folch J., Lees M., Sloane-Stanley G. H. // J. biol. Chem.— 1957.— Vol. 226.— P. 497—509.
13. Ganguly P. K., Rice K. M., Panagia V., Dhalla N. S. // Circulat. Res.— 1984.— Vol. 55.— P. 504—512.
14. Gross R. W., Sobel B. E. // J. biol. Chem.— 1982.— Vol. 257.— P. 6702—6708.
15. Gross R. W., Sobel B. E. // Ibid.— 1983.— Vol. 258.— P. 5221—5226.
16. Gross R. W., Drisdell R. C., Sobel B. E. // Ibid.— P. 15165—15172.
17. Gudbjarnason S., El-Hage A. N., Whitehurst V. E. et al. // J. molec. cell. Cardiol.— 1987.— Vol. 19.— P. 1141—1146.
18. Hartree E. F. // Analyt. Biochem.— 1972.— Vol. 48.— P. 422—427.
19. Imanaga I., Kamegawa Y., Kamei R., Kuroiwa M. // Diabetic Heart / Eds. M. Nagano, N. S. Dhalla.— New York, 1991.— P. 237—247.
20. Ingebretsen C. G., Moreau P., Hawelu-Johnson, Ingebretsen W. J. // Amer. J. Physiol.— 1980.— Vol. 239.— P. H614—H620.
21. Karli J. N., Karikas G. A., Hatzipavlou P. K. et al. // Life Sci.— 1979.— Vol. 24.— P. 1869—1876.
22. Katz A. M., Messineo F. C. // J. molec. cell. Cardiol.— 1982.— Vol. 14, Suppl. 3.— P. 119—122.
23. Lopaschuk G. D., Spafford M. // Circulat. Res.— 1989.— Vol. 65.— P. 378—387.
24. Makino N., Dhalla K. S., Eliban V., Dhalla N. S. // Amer. J. Physiol.— 1987.— Vol. 253.— P. E202—E207.
25. Malhotra A. // The Diabetic Heart // Eds. M. Nagano, N. S. Dhalla.— New York, 1991.— P. 281—290.
26. McMillin-Wood J., Taylor Wallick E., Schwartz A., Chang C. H. // Biochim. biophys. Acta.— 1977.— Vol. 486.— P. 331—340.
27. Miller T. B., Jaspers S. R. // The Diabetic Heart / Eds. M. Nagano, N. S. Dhalla.— New York, 1991.— P. 323—338.
28. Mochizuki I., Ishikawa S., Abe A. // Jap. Circulat. J.— 1984.— Vol. 48.— P. 255—265.
29. Morley J. E., Levine A. S., Brown D. M. // Biochem. biophys. Res. Commun.— 1982.— Vol. 108.— P. 1418—1423.
30. Okumura K., Akiyama N., Kondo J. et al. // The Diabetic Heart / Eds. M. Nagano, N. S. Dhalla.— New York, 1991.— P. 415—423.

31. Owens K., Kennett F. F., Weglicki W. B. // Amer. J. Physiol.—1982.— Vol. 242.— P. H456—H461.
32. Paulson D. J., Crass M. F. // Ibid.— Vol. 44.— P. 322—329.
33. Penpargkul S., Schaible T., Yipintsoi T., Scheuer J. // Circulat. Res.—1980.— Vol. 47.— P. 911—921.
34. Penpargkul S., Fein F., Sonnenblick E. H., Scheuer J. // J. molec. cell. Cardiol.—1981.— Vol. 13.— P. 303—309.
35. Pierce G. N., Dhalla N. S. // Amer. J. Physiol.—1985.— Vol. 248.— P. E170—E175.
36. Pollack P. S., Malhotra A., Fein F. S., Scheuer J. // Ibid.—1986.— Vol. 251.— P. H448—H454.
37. Reaven G. M., Chen Y.-D. I. // Amer. J. Med.—1988.— Vol. 85, Suppl. 5A.— P. 106—112.
38. Regan T. J. // The Diabetic Heart / Eds. M. Nagano, N. S. Dhalla.— New York, 1991.— P. 3—10.
39. Saks V. A., Khuchua Z. A., Kuznetsov A. V. // Biochim. biophys. Acta.—1987.— Vol. 891.— P. 138—144.
40. Sedlis S. P., Corr P. B., Sobel B. E., Ahumada G. G. // Amer. J. Physiol.—1983.— Vol. 244.— P. H32—H38.
41. Seymour A. M. L., Brosnan M. J. // The Diabetic Heart / Eds. M. Nagano, N. S. Dhalla.— New York, 1991.— P. 371—382.
42. Simon G., Rouser G. // Lipids.—1969.— Vol. 4.— P. 607—614.
43. Steenbergen G., Jennings R. B. // J. molec. cell. Cardiol.—1984.— Vol. 166.— P. 605—621.
44. Strittmatter W. J., Hirata F., Axelrod J. // Biochem. biophys. Res. Comm.—1979.— Vol. 88.— P. 147—153.
45. Tani M., Neely J. R. // Circulat. Res.—1988.— Vol. 62.— P. 931—940.
46. Vaskovsky V. E., Kostesky E. Y., Vasendin I. M. // J. Chromatogr.—1975.— Vol. 114.— P. 129—141.
47. Woodley S. L., Ikenouchi H., Barry W. H. // J. molec. cell. Cardiol.—1991.— Vol. 23.— P. 671—680.

Поступила 16.02.93

QUANTITATIVE ANALYSIS OF MYOCARDIAL PHOSPHOLIPID COMPOSITION IN EXPERIMENTAL DIABETES: IMPACT OF TOTAL ISCHEMIA.

S. A. Dzhabadov, A. A. Eiyubova, L. K. Mamedova, Ye. B. Gelfgat, G. Pogatsa

Institute of Cardiology, Ministry of Public Health of the Azerbaijan Republic, Baku, National Institute of Cardiology, Budapest.

Phospholipid composition was studied in the myocardium of rats and rabbits with alloxan diabetes developed after intravenous or intraperitoneal administration of alloxan and complicated by 60-min total ischemia. The diabetes developed within 4 weeks thereafter heart tissue was isolated and used for biochemical analyses. Total cardioplegic ischemia was simulated in the perfused heart after drastic interruption of perfusion. Composition of myocardial phospholipids was altered in alloxan diabetes: content of lysophosphoglycerides, lysophosphatidylcholine, lysophosphatidylethanolamine and of sphingomyelin was increased, while cardiolipin and phosphatidylethanolamine were decreased. In the diabetes-impaired heart tissue, a 2-fold increase was detected in the ratio of cholesterol/phospholipids, which corresponded to the viscosity of plasma membranes. Total ischemia within 60 min caused a further increase in the levels of lysophosphoglycerides in the diabetes-impaired tissue. Considerable differences in the content of phospholipids were maintained in control and diabetes-impaired heart tissues after ischemia and reperfusion; these differences were observed in the preischemic group. Thus, phospholipid composition was altered in the diabetes-impaired myocardia in presence and/or absence of ischemia.

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 1994

УДК 616.379-008.64-092.9-092:612.1191-07

Ю. А. Козлов, Н. П. Волкова,
А. Н. Байков, В. В. Новицкий

СОСТОЯНИЕ СИНТЕЗА НУКЛЕИНОВЫХ КИСЛОТ И СУММАРНЫХ БЕЛКОВ В ОРГАНАХ ГЕМОПОЭЗА У МЫШЕЙ С АЛЛОКСАНОВЫМ ДИАБЕТОМ

Сибирский медицинский университет, Томск

Являясь анаболическим гормоном широкого спектра действия, инсулин стимулирует синтез нуклеиновых кислот и белков во многих тканях и органах человека и млекопитающих [1, 12, 14], включая и клетки системы крови [7, 13, 19, 20]. Однако далеко не все из них в одинаковой мере чувствительны к этому гормону или его недостатку, сопровождающему развитие сахарного диабета. Известно, например, что синтез ДНК выражено у угнетается в тимусе диабетических животных и в значительно меньшей степени — в других гемопоэтических органах [6, 9, 15]. На тимусах мышей обнаружены рецепторы инсулина [9, 16], а его внутривенное введение крысам вызывает быстрое и значительное увеличение в зубной железе концентрации цГМФ — одного из возможных внутриклеточных посредников этого гормона [4].

Целью настоящего исследования являлась сравнительная оценка состояния синтеза нуклеиновых кислот (ДНК, РНК) и белков при экспериментальном сахарном диабете в основных органах гемопоэза, включая тимус, где сосредоточена основная масса Т-лимфоцитов.

Методика. Опыты проведены на 80 мышах-самцах линии ВАЛБ/с (питомник «Рассвет», Томск) массой 16—18 г. Половина из них были интактными. У мышей другой группы за 2—3 нед до экспериментов индуцировали аллоксановый диабет [6]. Группу диабетических животных составляли мыши, у которых концентрация сахара в крови, по данным, полученным унифицированным ортотолуидиновым методом, была не ниже 14 ммоль/л.

О состоянии синтеза нуклеиновых кислот и суммарных белков судили по включению в клеточные биополимеры меченых предшественников: либо метил-³Н-тимидина (мол. активность 900 ТБк/моль), либо 5-³Н-уридина (мол. активность 960 ТБк/моль), либо 1-¹⁴С-глицина (мол. активность 2,1 ТБк/моль). Последний был выбран как одна из инсулиночувствительных аминокислот, широко применяемая в исследованиях по влиянию инсулина на биосинтез белков [1]. Все меченые соединения были получены из ВО «Изотоп». Меченые предшественники вводили внутривентально в 0,2 мл изотонического раствора хлористого натрия за 1 ч до умерщвления животных. Меченые тимидин и уридин вводили в дозе 160 МБк/кг, меченый глицин — в дозе 40 МБк/кг. Мышей умерщвляли путем разрушения позвоночника в шейном отделе (при легком эфирном наркозе). У всех животных брали для исследования тимус, селезенку, илеоцекальные (брыжеечные) лимфоузлы и бедренную кость, из кото-

Исследуемые органы	Группа животных		p
	интактные	с аллоксановым диабетом	
	Синтез ДНК (включение ^3H -тимидина, расп/мин/ 10^6 клеток)		
Костный мозг	1 863±162	1 455±212	>0,05
Селезенка	1 967±308	1 628±146	>0,05
Лимфоузлы	865±112	584±115	>0,05
Тимус	486±61	179±16	<0,001
	Синтез ДНК (включение ^3H -тимидина, расп/мин/мг/белка)		
Костный мозг	14 662±1275	12 120±1766	>0,05
Селезенка	13 572±2125	10 859±974	>0,05
Лимфоузлы	4 887±633	3 650±719	>0,05
Тимус	2 270±285	895±80	<0,001
	Синтез РНК (включение ^3H -уридина, расп/мин/ 10^6 клеток)		
Костный мозг	1 840±160	1 600±180	>0,05
Селезенка	922±98	1 060±80	>0,05
Лимфоузлы	444±35	183±25	<0,001
Тимус	322±36	170±14	<0,01
	Синтез РНК (включение ^3H -уридина, расп/мин/мг белка)		
Костный мозг	14 481±1259	13 328±1499	>0,05
Селезенка	6 362±676	7 070±534	>0,05
Лимфоузлы	2 509±198	1 144±156	<0,001
Тимус	1 504±168	850±70	<0,01
	Синтез белков (включение ^{14}C -глицина, расп/мин/ 10^6 клеток)		
Костный мозг	127±11	98±9	>0,05
Селезенка	147±8	160±23	>0,05
Лимфоузлы	56±5	42±6	>0,05
Тимус	38±4	17±2	<0,001
	Синтез белков (включение ^{14}C -глицина, расп/мин/мг белка)		
Костный мозг	999±87	816±75	>0,05
Селезенка	1 014±55	1 067±153	>0,05
Лимфоузлы	316±28	262±38	>0,05
Тимус	177±19	85±11	<0,001

Примечание. p — вероятность ошибки при сравнении данных подопытных мышей с интактными. Число животных в каждом случае 8—15.

рой раствором Хенкса вымывали костный мозг, использованный для анализа. Более подробно методика подготовки проб кровяных клеток для радиометрии описана нами ранее [10]; она является модификацией микрометода, изложенного в работе [2]. Радиоактивность подготовленных проб измеряли на анализаторе «Бета-2» с эффективностью регистрации 50 % для ^3H и 90 % для ^{14}C . Конечный результат выражали в расп/мин на 10^6 ядерных клеток, а также на 1 мг клеточного белка, который определяли по методу Лоури [3].

Полученные данные обрабатывали методом вариационной статистики с использованием критерия Стьюдента.

Результаты и обсуждение. В результате проведенного исследования (см. таблицу) нами был обнаружен, на первый взгляд, парадоксальный факт: синтез белков (а также ДНК) в лимфоузлах диабетических мышей достоверно не отличался от нормы, в то время как синтез РНК, судя по включению в нодулярные лимфоциты ^3H -уридина, оказался существенно сниженным. Выявленный феномен мог быть связан с увеличением относительной доли В-лимфоцитов в лимфоузлах диабетических животных за счет атрофии тимусзависимых зон [15] и с низкой активностью уридинкиназы в В-лимфоцитах грызунов, что затрудняет использование этими клетками ^3H -уридина в качестве предшественника синтеза РНК [18].

В целом полученные результаты подтверждают ранее установленный с помощью радиоавтографического метода исследования факт выражен-

ного угнетения синтеза ДНК в тимусе диабетических животных [6—9, 15]. Так, если во всех остальных изученных органах гемопоэза отмечали лишь тенденцию к уменьшению включения ^3H -тимидина в клеточные нуклеопротеиды, то в тимусе оно было высокозначимым ($p < 0,001$) и составляло в среднем 36—39 % от нормы. Наряду с угнетением синтеза ДНК в тимусе диабетических мышей достоверно снижался также синтез РНК (в 1,8—1,9 раза) и белков (в 2,1—2,2 раза).

В совокупности эти данные указывают на то, что нарушения тимического лимфопоэза при недостаточности инсулина носят не только наиболее выраженный, но, по всей видимости, и всесторонний характер, касаясь как пролиферации указанных клеток, так и их дифференцировки, включающей синтез специфических клеточных РНК и белков, в том числе ответственных и за осуществление цитотоксической функции Т-лимфоцитов, которая наиболее выражено страдает при сахарном диабете [7, 17].

Указанные нарушения синтеза нуклеиновых кислот и белков в тимусе во многом объясняют и механизм аномалий, выявленных в лимфоидных клетках крови у диабетических животных: появление в циркуляции дегенеративных микроформ лимфоцитов [6, 7], снижение их сухой массы [5], укорочение времени жизни [8].

В заключение отметим, что сделанные нами выводы не зависели от того, в каком виде выражались конечные результаты исследования: оценивалось ли включение меченых предшественников на 1 млн ядерных клеток, как это принято в иммунологии [11], или на 1 мг клеточных белков

[21]. Очевидно, что оба эти способа равноценны, особенно при работе с небольшими количествами клеток, когда оценить включение меченого тимидина на 1 мг ДНК, а меченого уридина — на 1 мг РНК бывает крайне затруднительно.

ЛИТЕРАТУРА

1. Германюк Я. Л. Роль инсулина в биосинтезе нуклеотидов, нуклеиновых кислот и белков.— Киев, 1973.
2. Деглаф Т. А., Бродский В. Я., Гаузе Г. Г. Методы биологии развития.— М., 1974.— С. 451—453.
3. Дэвени Т., Гергей Я. Аминокислоты, пептиды и белки: Пер. с англ.— М., 1976.— С. 67—68.
4. Козлов Ю. А. // Механизмы патологических реакций.— Томск, 1981.— Т. 1.— С. 11—14.
5. Козлов Ю. А. // Медико-биологические аспекты нейро-гуморальной регуляции.— Томск, 1990.— Вып. 1.— С. 64—65.
6. Козлов Ю. А., Тимофеева Е. Е., Зингер М. Г. // Бюл. экспер. биол.— 1986.— № 4.— С. 407—409.
7. Козлов Ю. А., Лаврова В. С. // Успехи соврем. биол.— 1988.— Т. 38, Вып. 3.— С. 505—520.
8. Козлов Ю. А., Локтюшина Т. А. // Бюл. экспер. биол.— 1990.— № 10.— С. 404—406.
9. Козлов Ю. А., Локтюшина Т. А. // Пат. физиол.— 1992.— № 3.— С. 25—27.
10. Козлов Ю. А., Пleshko P. И., Шевцова Н. П. // Медико-биологические аспекты нейро-гуморальной регуляции.— Томск, 1990.— Вып. 1.— С. 62—63.
11. Лимфоциты: выделение, фракционирование и характеристика / Под ред. Дж. Б. Натвига, П. Перлманна, Х. Вигзеля: Пер. с англ.— М., 1980.
12. Мертвеев Н. П., Гордиенко О. Е. // Вопр. мед. химии.— 1976.— № 1.— С. 3—14.
13. Моренкова С. А. // Бюл. экспер. биол.— 1978.— № 4.— С. 419—421.
14. Ashford A. J., Pain V. M. // J. biol. Chem.— 1986.— Vol. 261, N 9.— P. 4066—4070.
15. Fabris N., Piantanelli L. // Clin. exp. Immunol.— 1977.— Vol. 28.— P. 315—325.
16. Goldfine I. D. // Endocrinology.— 1975.— Vol. 97, N 4.— P. 948—955.
17. Helderman J. H., Strom T. B., Dupuy-D'Angeac A. // Cell Immunol.— 1979.— Vol. 46, N 2.— P. 247—258.
18. Howard I. C., Hunt C. V., Gowans I. L. // J. exp. Med.— 1972.— Vol. 46, N 2.— P. 200—219.
19. Jones R. L., Peterson Ch. M. // Amer. J. Med.— 1981.— Vol. 70, N 2.— P. 339—352.
20. Necheles T. F. // Amer. J. Physiol.— 1962.— Vol. 203, N 4.— P. 693—696.
21. Temin H. M. // J. Cell Physiol.— 1969.— Vol. 74, N 1.— P. 9—16.

Поступила 15.11.92

SYNTHESIS OF NUCLEIC ACIDS AND TOTAL PROTEINS IN HEMOPOIETIC TISSUES OF MICE WITH ALLOXAN DIABETES.

Yu. A. Kozlov, N. P. Volkova, A. N. Baykov, V. V. Novitsky
Siberian Medical University, Tomsk.

Rates of ^3H -thymidine, ^3H -uridine and ^{14}C -glycine incorporation in nucleic acids and total proteins were studied in cells of bone marrow, spleen, thymus and ileocecal lymph nodes tissues of BALB/c mice with subacute alloxan diabetes (content of blood sugar was higher than 14 mmol/l). Synthesis of DNA, RNA and protein was not considerably inhibited in the thymus tissue of the impaired animals which may correlate with pronounced dysfunction of cytotoxic T lymphocytes typical for the disease.

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 1994

УДК 616.153.915-39-092:612.017.1]-02:614.876]-07

А. В. Васильев, М. А. Самсонов,
В. Б. Покровский, Г. Р. Покровская,
М. М. Левачев

ХАРАКТЕРИСТИКА СИСТЕМЫ ГУМОРАЛЬНОГО ИММУНИТЕТА И ПРОЦЕССОВ ПЕРЕКИСНОГО ОКИСЛЕНИЯ ЛИПИДОВ У ЛИЦ, ПРОЖИВАЮЩИХ НА ТЕРРИТОРИЯХ, ЗАГРЯЗНЕННЫХ РАДИОНУКЛИДАМИ

Институт питания РАМН, Москва

Известно, что иммунная система является весьма чувствительной к действию радиации, сопровождающемуся подавлением защитных функций организма [11]. При этом поражение иммунокомпетентных клеток играет важную роль в патогенезе радиационного повреждения, ассоциированного с развитием свободнорадикальных реакций, приводящих к накоплению продуктов перекисного окисления липидов (ПОЛ), что способствует нарушению проницаемости биомембраны, структурным модификациям белков и инактивации ряда ферментов [4]. В экспериментальных условиях прослеживалось и непосредственное иммуносупрессивное действие продуктов ПОЛ [18, 19]. В этой связи требует дальнейшего изучения вопрос об инициальной причине поражения иммунокомпетентных клеток: нарушение иммунного ответа происходит в результате непосредственного влияния свободных радикалов, образование которых индуцировано радиацией, либо в результате иного опосредованного воздействия?

После аварии на Чернобыльской АЭС сформировалась значительная популяция населения, проживающая на территориях, загрязненных долгоживущими радионуклидами. Ранее выполненные работы в области радиобиологии посвящены в основном исследованию действия высоких однократных доз радиации и применению соответственно радиопротекторов однократного использования, непригодных при длительном приеме ввиду их высокой токсичности [3]. В настоящее время актуальными являются изучение влияния малых доз ионизирующего излучения на состояние иммунной системы и процессов ПОЛ и разработка методических подходов, направленных на повышение радиорезистентности организма. Наиболее перспективным представляется использование различных алиментарных факторов, которые обладают выраженными антиоксидантными, иммуномодулирующими и адаптогенными свойствами и которые можно длительно и безопасно применять [16].

Методика. Были проведены специальные исследования и наблюдения в клинике лечебного питания за 33 больными гипертонической болезнью (ГБ) II стадии (15 мужчин и 17 женщин) в возрасте 34—59 лет. 25 больных являлись жителями г. Новозыбков Брянской области России — территории, загрязненной радионуклидами в результате аварии на Чернобыльской АЭС; 8 больных ГБ II стадии проживали в Москве и не имели контакта с источниками

Таблица 1

Характеристика системы гуморального иммунитета и процессов ПОЛ у больных ГБ, проживающих на территории, загрязненной радионуклидами

Исследуемые показатели	Больные ГБ, проживающие на территории, загрязненной радионуклидами	Больные ГБ, проживающие в Москве (контрольная группа)
ДК, E ₂₃₂ на 1 мл плазмы	0,80±0,03	0,76±0,03
МДА, мкмоль/л	4,31±0,12	4,14±0,03
ПРЭ, %	1,48±0,18	1,61±0,15
IgA, мг %	242±24	265±35
IgM, мг %	233±29	204±49
IgG, мг %	1923±205*	1330±166
C3, мг %	168±9,1*	135±5
C4, мг %	43±3,9*	32±2,9

Примечание. Звездочка — $p < 0,05$.

ионизирующего излучения (контрольная группа). Все обследованные в течение 4 нед получали редуцированный по калорийности вариант диеты Ач, содержащий 95 г белка, 90 г жира, в том числе 30 г растительного, 181 г углеводов, при энергетической ценности рациона 1900 ккал. Радиопротекторный эффект диеты обеспечивался за счет увеличения квоты серосодержащих аминокислот (до 7 г/сут) и аминокислот — предшественников биогенных аминов — триптофана и гистидина (до 6,3 г/сут), экзогенных антиоксидантов (витаминов А и Е), комплексонов — пищевых волокон (до 40 г/сут) и солей кальция (до 1,2 г/сут). В этой диете 29 г растительного масла заменяли на аналогичное количество масла «Эйконол» (производство НПП «Тринита», Москва), содержащего 25 % полиненасыщенных жирных кислот (ПНЖК) семейства ω-3 с добавлением 12,5 мг α-токоферола (ТФ) — диета Ачм. Таким образом, содержание витамина Е в различных вариантах диет было одинаковым и составляло 24,5 мг/сут. При поступлении больных в клинику и через 3 нед после лечения из крови пациентов выделяли эритроциты и определяли жирнокислотный состав их мембран в условиях, описанных ранее [8]. О процессах ПОЛ судили по содержанию моноового диальдегида (МДА) [9] и диеновых конъюгатов (ДК) [2] в плазме крови и устойчивости эритроцитов к гемолизу при действии перекиси водорода [12]. Состояние системы гуморального иммунитета оценивали по содержанию иммуноглобулинов (Ig) классов А, М, G и компонентов комплемента C3, C4 в сыворотке крови. Исследования проводили на иммунохимическом анализаторе ICS-II («Beckman», США) с использованием стандартных наборов антител. Биохимические исследования проводили с использованием клинического анализатора «Spectrum» («Abbott», США) по стандартной программе.

Результаты и обсуждение. В результате проведенных исследований было констатировано отсутствие выраженной интенсификации процессов ПОЛ у больных ГБ, подвергшихся радиационному воздействию. Определяемый у них уровень первичных (ДК) и вторичных (МДА) продуктов ПОЛ достоверно не отличался от показателей у больных ГБ, проживающих в Москве. Устойчивость эритроцитов к гемолизу при дейст-

вии перекиси водорода (перекисная резистентность эритроцитов — ПРЭ) также была сходной у обеих групп больных ГБ и не выходила за пределы нормальных значений (табл. 1). В то же время в экспериментальных и клинических исследованиях было показано увеличение концентрации продуктов ПОЛ в различных органах и тканях при действии малых доз ионизирующего излучения [1, 5, 15]. Однако следует подчеркнуть, что в выполненных клинических работах контингент обследуемых существенно отличался от выборки больных ГБ в нашей работе по мощности полученной лучевой нагрузки и продолжительности контакта с источниками радиации. Полученная доза внешнего излучения составляла у ликвидаторов последствий аварии на Чернобыльской АЭС порядка 250 мЭв [1, 15], что в 3,5 раза превышало дозу облучения, полученную жителями г. Новозыбков за 1986—1991 гг., — приблизительно 70 мЭв [6]. Следует также подчеркнуть длительное (шестилетнее) проживание больных ГБ — жителей г. Новозыбков — на загрязненных территориях, что нельзя сравнить с кратковременным (до 2 мес) контактом ликвидаторов с источниками радиации. Анализируя наши данные, мы выявили незначительное повышение содержания продуктов ПОЛ в плазме. Это, по-видимому, может быть обусловлено компенсаторной активацией антиоксидательной системы в клеточных мембранах, препятствующей элиминации избытка липидных перекисей в системный кровоток [15]. Исследование состояния гуморального иммунитета показало более значительные изменения у больных ГБ, подвергшихся действию малых доз ионизирующего излучения, по сравнению с контрольной группой больных. Полученные результаты оказались несколько неожиданными, поскольку имеются экспериментальные и клинические данные, свидетельствующие об отсутствии каких-либо значительных альтераций гуморального иммунитета в отдаленные сроки после острого облучения [7, 10]. Нами было выявлено достоверное повышение уровня IgG и фракций комплемента C3 и C4 по сравнению с контрольной группой, причем содержание в сыворотке крови IgG и C4 превышало норму (см. табл. 1).

В результате лечения диетой Ач отмечалась значительная положительная динамика клинико-биохимических показателей. В частности, выявлялось снижение содержания общего холестерина, общего и прямого билирубина сыворотки крови. Артериальное давление снизилось в среднем со 173/101 до 131/82 мм рт. ст. Положительная динамика в клинической картине сопровождалась благоприятными изменениями показателей гуморального иммунитета и ПОЛ. Отмечено достоверное снижение уровня ДК и МДА, практически достигающее значений контрольной группы больных. Под влиянием диетотерапии наблюдались положительные изменения и показателей гуморального иммунитета в виде нормализации уровня IgG, снижения содержания IgA, IgM и C4 (табл. 2).

В последнее десятилетие при лечении больных, страдающих заболеваниями, сопровождающимися нарушением липидного обмена, с успехом используют различные источники ПНЖК семейства ω-3, которые оказывают заметное гипо-

Характеристика системы гуморального иммунитета и процессов ПОЛ у больных ГБ, проживающих на территории, загрязненной радионуклидами, после диетотерапии

Исследуемые показатели	Диета Ач	Диета Ачм	Диета Ач (контрольная группа)
ДК, E ₂₃₂ на 1 мл плазмы	0,80±0,05	0,81±0,01	0,76±0,03
МДА, мкмоль/л	0,68±0,05*	0,72±0,02**	0,63±0,03***
ПРЭ, %	4,27±0,15	4,37±0,12	4,14±0,03
	4,0±0,06*	4,3±0,09	3,92±0,02***
	1,38±0,10	1,69±0,20	1,61±0,15
IgA, мг %	1,31±0,11	1,62±0,29	1,65±0,17
	249±28	233±30	265±35
	244±30	257±36	262±35
IgM, мг %	253±37	210±29	204±49
	247±49	240±46	215±44
IgG, мг %	1903±205	1957±195	1330±166
	1657±165	2031±203	1487±195
C3, мг %	171±11	163±10	135±5
	145±19	150±15	126±7
C4, мг %	45,4±4,1	41,9±5	32±2,9
	43±4,6	42,1±5,2	31,9±3

Примечание. В числителе — показатель до лечения, в знаменателе — после лечения. Одна звездочка — $p < 0,05$, две — $p < 0,01$, три — $p < 0,001$.

липидемическое, антиагрегационное и гипотензивное действие [23]. При этом активно обсуждается возможность модулирования иммунного ответа при манипулировании составом ПНЖК в диетах [22]. Показателем степени влияния жирнокислотного состава рациона на липиды тканей может служить состав жирных кислот мембран эритроцитов [13]. Использование мембранных липидов как модели в подобных исследованиях обосновано тем, что на уровне мембран реализуется специфическая функция ПНЖК, состав и соотношение которых определяются диетой. Включение в диету Ач, как показали наши исследования, 20 мл масла «Эйконол», содержащего 25 % ПНЖК семейства ω -3, приводило к достоверному снижению содержания линолевой кислоты (семейство ω -6) и существенному увеличению содержания ПНЖК семейства ω -3 (эйкозапентаеновая — ЭПК и докозагексаеновая — ДКГ — кислоты) в мембранах эритроцитов. Обращает на себя внимание некоторое снижение уровня арахидоиновой кислоты — АрК (семейство ω -6), в результате чего соотношение АрК/ЭПК снизилось с 8,51 до 2,13, а соотношение суммы ПНЖК ω -6 к сумме ПНЖК ω -3 — с 4,73 до 3,72, что может служить субстратной основой для изменения синтеза простагландинов первой и второй серий — производных ПНЖК семейства ω -6 и третьей серии — метаболитов ЭПК.

Наблюдаемое нами одновременное повышение сывороточной концентрации IgG, IgA и IgM (на 10,3, 14,3 и 3,4 % соответственно) при обогащении диеты ПНЖК семейства ω -3 в отличие от некоторого подавления продукции иммуноглобулинов указанных типов, отмеченного при применении диеты Ач, может быть обусловлено блокированием иммуносупрессивных эффектов простагландинов E₁ и E₂, которые синтезируются из ПНЖК семейства ω -6 (см. табл. 2). Известно, что простагландины E₁ и E₂ подавляют функцию Т- и В-лимфоцитов *in vitro*, расцениваемую по антиген- или митогенстимули-

рованному blastogenesis, продукции лимфокинов и образованию антител плазматическими клетками [19]. В свою очередь было показано стимулирующее влияние индометацина, блокирующего синтез эйкозаноидов, на митогениндуцированный blastogenesis лимфоцитов [19] и образование антител [25]. Точные механизмы, посредством которых простагландины оказывают иммуносупрессивное действие, остаются не вполне понятными. Предполагают, что простагландины серии E₁ и E₂ опосредуют свои негативные эффекты на иммунокомпетентные клетки через активацию цАМФ в Т- и В-лимфоцитах и ингибирование продукции интерлейкинов [17, 24].

Одним из неблагоприятных эффектов, ограничивающих применение ПНЖК семейства ω -3 в терапевтической практике, является возможная интенсификация процессов ПОЛ при увеличении ненасыщенности жирных кислот клеточных мембран. Опубликованы работы, в которых прослеживалось увеличение восприимчивости плазматических и мембранных липидов к атакам свободных радикалов в условиях применения диет, обогащенных ДГК и ЭПК [21]. В то же время было показано, что добавление достаточного количества ТФ препятствует повышению ПОЛ даже при увеличении квоты ПНЖК семейства ω -3 до 12 г/сут [20]. В проведенном нами исследовании обогащение диеты больных ГБ, подвергшихся радиационному воздействию, 5 г/сут ПНЖК семейства ω -3 не приводило к интенсификации процессов ПОЛ. Концентрация ДК достоверно снижалась на 15 %. Уровень гемолиза эритроцитов продолжал оставаться низким и не отличался от показателей контрольной группы больных. Вместе с тем обращает на себя внимание отсутствие изменения уровня вторичного продукта ПОЛ — МДА — при включении в диету больных ПНЖК семейства ω -3, в то время как у больных, получавших диету Ач, прослеживалось отчетливое снижение его концентрации (см. табл. 2).

Полученные результаты позволяют констатировать некоторую напряженность процессов ПОЛ

при добавлении ПНЖК семейства ω -3 в состав диеты у больных ГБ, подвергшихся радиационному воздействию. Необходимо указать на факты, свидетельствующие о непосредственной активации ПОЛ у больных ГБ при обострении заболевания [14]. Ввиду этого целесообразно для стабилизации процессов ПОЛ у данной категории больных при применении диет, обогащенных ПНЖК семейства ω -3, включать ТФ в дозах, несколько превышающих физиологические (5—7 мг ТФ на 1 г ПНЖК семейства ω =3).

На основании полученных результатов можно сделать заключение о наличии у больных ГБ, проживающих на территориях, загрязненных долгоживущими радионуклидами, определенных изменений в системе гуморального иммунитета. Вместе с тем выявленные изменения, по-видимому, не связаны непосредственно с интенсивностью свободнорадикальных процессов, о чем судили по незначительному накоплению продуктов ПОЛ. Применение специальной адаптогенной диеты Ач способствовало благоприятным изменениям клинико-биохимических показателей больных. Использование источников ПНЖК семейства ω -3 в составе диеты давало заметный иммуномодулирующий эффект, что обуславливает целесообразность применения такой диеты в комплексной терапии больных, подвергшихся воздействию ионизирующего излучения.

ЛИТЕРАТУРА

1. Абрамова Л. П., Ефремова О. В. // Конференция «Итоги оценки медицинских последствий аварии на Чернобыльской АЭС»: Тезисы докладов.— Киев, 1991.— С. 6—7.
2. Андреева Л. И., Кожемякина Л. А., Тишкин А. А. // Лаб. дело.— 1988.— № 11.— С. 41—44.
3. Барабой В. А. // Радиобиология.— 1990.— Т. 30, № 4.— С. 435—439.
4. Владимиров Ю. И., Арчаков А. И. Перекисное окисление липидов в биологических мембранах.— М., 1972.
5. Гацко Г. Г., Маргуль А. М., Шаблинская О. В., Вальхина В. П. // Радиобиология.— 1990.— Т. 30, № 3.— С. 413—415.
6. Ильин Л. А., Баланов М. И., Булдаков А. А. и др. // Мед. радиол.— 1989.— № 11.— С. 59—81.
7. Кириллова Е. Н., Манько В. М., Муксинова К. Н. // Иммунология.— 1986.— № 2.— С. 38—41.
8. Корф И. И., Цагикян Т. А., Мецнеркова В. А. и др. // Вопр. мед. химии.— 1989.— № 4.— С. 81—84.
9. Косухин А. Б., Ахметова Б. С. // Лаб. дело.— 1987.— № 5.— С. 335—347.
10. Мельников О. Ф., Самбур М. Б., Заболотный О. И. // Конференция «Итоги оценки медицинских последствий аварии на Чернобыльской АЭС»: Тезисы докладов.— Киев, 1991.— С. 146—147.
11. Москалев Ю. И. Отдаленные последствия ионизирующих излучений.— М., 1991.— С. 146—150.
12. Покровский А. А., Абрамов А. С. // Вопр. питания.— 1964.— № 6.— С. 44—49.
13. Покровский А. А., Левачев М. М., Львович Н. А. и др. // Там же.— 1977.— № 3.— С. 12—17.
14. Сирин А. А., Кобозев Г. Г., Кулагин Ю. И. и др. // Вопр. мед. химии.— 1991.— № 2.— С. 26—28.
15. Тищенко Р. С., Валиулина Д. С. // Современные проблемы профессиональной патологии.— М., 1989.— С. 123—129.
16. Шарманов А. Т. // Вопр. питания.— 1990.— № 1.— С. 4—11.
17. Bourue H. R., Lichtenstein L. M., Melon K. L. et al. // Science.— 1974.— Vol. 184.— P. 19—28.
18. Goldyne M. E., Stabo J. D. // Critical Reviews in Immunology / Ed. M. Z. Atassi.— Boca Raton, Florida, 1981.— P. 189—223.
19. Goodman M. L., Wiegler W. O. // J. Immunol.— 1980.— Vol. 125.— P. 593.
20. Haglund O., Luostarinen R., Wallin R. et al. // J. Nutr.— 1991.— Vol. 121.— P. 165—169.

21. Hu M.-I., Frankel E. N., Lebovitz B. E., Tappel A. L. // Ibid.— 1989.— Vol. 119.— P. 1574—1582.
22. Hwang D. // FASEB J.— 1989.— Vol. 3.— P. 2052—2061.
23. Kinsella J. E., Lokesh B. R., Stone R. A. // Amer. J. clin. Nutr.— 1990.— Vol. 52.— P. 1—28.
24. Rappoport R. S., Dodge G. R. // J. exp. Med.— 1982.— Vol. 155.— P. 943—948.
25. Webb D. R., Osheroff P. L. // Proc. nat. Acad. Sci. USA.— 1976.— Vol. 73.— P. 1300—1304.

Поступила 28.04.93

THE SYSTEM OF HUMORAL IMMUNITY AND LIPID PEROXIDATION IN PERSONS LIVING IN RADIONUCLIDE-CONTAMINATED AREAS.

A. V. Vasilyev, M. A. Samsonov, V. B. Pokrovsky, G. R. Pokrovskaya, M. M. Levachev

Institute of Nutrition, Russian Academy of Medical Sciences, Moscow.

Among 33 patients with Stage II hypertension, 25 persons were inhabitants of the Russian radionuclide-contaminated areas and 8 patients had no prior contacts with ionizing radiation (control). All the patients examined were maintained within 4 weeks on a diet, radioprotective effect of which was realized due to the elevated content of sulfur containing amino acids, antioxidants and complexones. In the patients who lived in the radionuclide-contaminated areas, a moderate activation of lipid peroxidation was detected simultaneously with marked alterations in the humoral component of the immunity system, which involved a considerable increase in the levels of IgG and complements C₃ and C₄. A decrease in content of malonic dialdehyde and diene conjugates as well as normalization of IgG and decrease in content of IgA, IgM and C₃ were observed in blood plasma of the patients on diet. Supplementation of ω ₃ polyunsaturated fatty acids (ω ₃-PUFA), 5 g/day and α -tocopherol, 12.5 mg/day, to the diet elevated the serum concentrations of all Ig classes, which suggests the presence of an immunomodulating effect of ω ₃-PUFA. Moreover, the content of malonic dialdehyde was not increased in blood plasma if 3-PUFA was used. Hence, increased α -tocopherol levels should be used in the treatment of these patients with ω ₃-PUFA (up to 5-7 mg per g PUFA) in order to stabilize lipid peroxidation.

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 1994

УДК 616.153.922-008.61-02:613.2]-092.9-02:612.014.482-07

А. А. Чиркин, П. Ю. Коневалова,
И. Н. Гребенников, В. А. Куликов,
Г. В. Филипенко

ДЕЙСТВИЕ ПОЛИНЕНАСЫЩЕННОГО ФОСФАТИДИЛХОЛИНА НА АКТИВНОСТЬ АНТИОКСИДАНТНЫХ И ЛИПОЛИТИЧЕСКИХ ФЕРМЕНТОВ ПРИ АЛИМЕНТАРНОЙ ГИПЕРХОЛЕСТЕРИНЕМИИ У ОБЛУЧЕННЫХ КРЫС

Витебский медицинский институт, Республиканский липидный лечебно-диагностический и консультативный центр, Витебск

Комплекс радиационно-экологических и стрессовых факторов, действующих в постчернобыльском периоде, может привести к ускоренному развитию атеросклероза. После однократного γ -облучения крыс было зарегистрировано развитие радиационно-индуцированной дислипидотеинемии [14]. Полиненасыщенный фосфатидилхолин (РРС, препарат из сои) уменьшал проявления такой дислипидотеинемии [12].

Целью настоящей работы было исследование действия препарата РРС на процессы перекисного окисления липидов, активность лизосомальных липолитических ферментов в печени и состоянии

Действие препарата РРС на показатели обмена липидов в печени крыс, получивших холестеринную диету

Показатели	Без облучения				0,5 Гр	
	контроль	диета	диета+РРС	контроль	диета	
Холестерин, ммоль/л	1,72±0,10	22,8±1,14*	21,8±2,42*	1,82±0,08	28,5±1,36*	
Триацилглицерины, ммоль/л	10,4±0,91	44,6±3,04*	24,1±1,84***	9,50±1,29	49,5±6,23*	
Диеновые конъюгаты, ммоль/л	6,5±0,11	19,6±0,58*	7,2±0,39**	6,60±0,38	28,0±0,55*	
МДА, ммоль/л	16,8±0,46	14,7±0,56	15,3±0,44	14,9±0,42	21,0±0,74*	
Супероксиддисмутаза, усл. ед. на 1 мг белка	56,0±1,34	72,3±1,4*	73,4±16,7	42,7±1,40	38,2±0,53*	
Глутатионпероксидаза, ммоль на 1 мг белка в 1 мин	240±8,00	228±8,6	156±9,10***	233±14,2	270±11,6*	
Кислая липаза, мкмоль на 1 мг белка в 1 мин	0,88±0,04	1,14±0,07*	1,09±0,03*	0,90±0,04	0,94±0,07	
Холестеролэстераза, мкмоль на 1 мг белка в 1 мин	123±2,82	75,7±5,07*	117±13,7**	122±4,61	87,4±11,9*	
Фосфолипаза A ₂ , мкмоль на 1 мг белка в 1 мин	4,00±0,09	5,12±0,41*	4,72±0,19*	4,00±0,20	5,01±0,54*	

Примечание. Здесь и в табл. 2: одна звездочка — достоверное отличие по отношению к контролю, две — достоверное отличие по отношению к группе крыс, получавших холестеринную диету.

Продолжение

Показатели	5,0 Гр			
	диета+РРС	контроль	диета	диета+РРС
Холестерин, ммоль/л	19,4±0,90***	1,72±0,16	17,7±1,30*	17,4±1,30*
Триацилглицерины, ммоль/л	32,2±2,55***	10,2±1,24	34,0±2,50*	22,8±1,68***
Диеновые конъюгаты, ммоль/л	16,9±0,27***	5,90±0,27	17,5±0,82*	11,3±0,64***
МДА, ммоль/л	22,9±0,90*	18,5±0,70	32,6±0,67*	21,3±0,78**
Супероксиддисмутаза, усл. ед. на 1 мг белка	45,0±1,80**	32,8±1,30	41,5±1,20*	40,0±1,60*
Глутатионпероксидаза, ммоль на 1 мг белка в 1 мин	223±13,5**	308±6,30	244±13,1*	227±11,4*
Кислая липаза мкмоль на 1 мг белка в 1 мин	0,88±0,04	0,88±0,03	1,06±0,09*	1,09±0,03*
Холестеролэстераза, мкмоль на 1 мг белка в 1 мин	74,2±5,57*	122±3,03	92,2±10,5*	90,4±6,52*
Фосфолипаза A ₂ , мкмоль на 1 мг белка в 1 мин	5,06±0,45*	4,09±0,33	5,39±0,29*	5,89±0,23*

липидтранспортной системы в сыворотке крови при алиментарной гиперхолестеринемии у облученных крыс.

Методика. Опыты поставлены на 72 безлинейных белых крысах-самцах со средней массой 180 г. Все животные были разделены на 9 одинаковых групп по 8 крыс каждая. Внешнее облучение животных производили на гамма-установке УГУ-420 с мощностью дозы $2,7 \cdot 10^{-4}$ Гр/с и фокусным расстоянием 3 м в дозах 0,5 и 5,0 Гр. Алиментарную гиперхолестеринемию воспроизводили на 10—30-е сутки после облучения с помощью диеты, содержащей 3,5 % холестерина, 0,2 % метилтиоурацила и 20 % прогретого подсолнечного масла от количества в стандартном брикетированном рационе [3]. Биохимическое исследование в печени и сыворотке крови крыс проводили через 30 сут после облучения. Животные контрольных групп получали стандартный брикетированный рацион. В печени крыс определяли содержание холестерина, белков и триацилглицеринов, используя наборы фирмы «Лаксма» (Чехия). Содержание этих веществ выражали в миллиграммах на 1 г свежей ткани. Содержание диеновых конъюгатов определяли спектрофотометрическим методом [5], а об уровне малонового диальдегида (МДА) судили по количеству тиобарбитуратпозитивных веществ [8] и выражали в наномолях на 1 г свежей ткани. В гомогенатах печени крыс определяли активность супероксиддисмутазы (КФ 1.15.1.1) и вы-

ражали в условных единицах на 1 мг белка [6], а также активность глутатионпероксидазы (КФ 1.11.1.9) и выражали в наномолях на 1 мг белка в 1 мин [7]. Кроме того, определяли активность лизосомальных ферментов печени:

активность кислой липазы (КФ 3.1.1.3), субстрат β -нафтилкаприлат («Сигма», США); активность кислой холестеролэстеразы (КФ 1.1.1.13), субстрат холестерол-(1-¹⁴C)-олеат («Амершам», Великобритания); кислой фосфолипазы A₂ (КФ 3.1.1.4), синтезированный субстрат 1-ацил-2 (1-¹⁴C)-олеилглицеро-3-Sn-фосфорилхолин [9]. Активность лизосомальных ферментов выражали в микромолях на 1 г белка в 1 мин. В сыворотке крови определяли содержание общего холестерина, холестерина липопротеинов высокой плотности (ЛПВП), ЛП очень низкой плотности (ЛПОНП), ЛП низкой плотности (ЛПНП) (в миллимолях на 1 л) и активность ЛХАТ (КФ 2.3.1.43) по методам, описанным ранее [4, 11]. Фракционную активность ЛХАТ (ЛХАТ-%) выражали в процентах, а молярную активность ЛХАТ (ЛХАТ-М) — в мкмоль/л/ч. Для определения постгепариновой липолитической активности сыворотки крови крысам за 15 мин до декапитации внутривенно вводили гепарин в дозе 350 ЕД/кг («Гидеон Рихтер», Венгрия). Общую постгепариновую активность (ПГЛА) определяли, используя глицерол-3-(1-¹⁴C)-олеат («Амершам», Великобритания), а активность печеночной триглицерол-

Действие препарата РРС на показатели липидтранспортной системы сыворотки крови крыс, получавших холестериную диету

Показатели	Без облучения			0,5 Гр	
	контроль	диета	диета+РРС	контроль	диета
Холестерин, ммоль/л:					
общий	2,03±0,03	7,51±0,56*	7,94±0,39*	2,24±0,12	7,15±0,22*
ЛПВП	1,13±0,03	0,79±0,05*	1,21±0,09**	0,91±0,11	0,77±0,08
ЛПОНП	0,57±0,04	0,45±0,02*	0,43±0,02*	0,58±0,04	0,43±0,02*
ЛПНП	0,32±0,05	6,27±0,55*	6,29±0,36*	0,92±0,06	5,96±0,32*
ЛХАТ-%	7,30±0,66	1,74±0,41*	1,04±0,19*	61,4±2,32	6,86±0,42*
ЛХАТ-М	42,3±2,99	24,7±5,67*	35,2±8,78*	61,4±3,37	82,6±3,20*
ПГЛА, мкмоль/мл	199±17,9	143±18,1*	212±21,9**	207±19,5	132±3,38*
П-ТГЛ, мкмоль/мл	78,8±6,70	17,8±4,68*	39,7±5,61***	66,2±10,9	12,7±1,37*

Продолжение

Показатели	0,5 Гр		5,0 Гр	
	диета+РРС	контроль	диета	диета+РРС
Холестерин, ммоль/л:				
общий	5,52±1,19***	216±0,06	5,35±0,37*	5,50±0,26
ЛПВП	0,90±0,02**	0,95±0,08	1,09±0,12	1,13±0,06
ЛПОНП	0,40±0,03*	0,61±0,01	0,36±0,02*	0,37±0,02*
ЛПНП	4,22±0,17***	0,63±0,13	3,90±0,29*	4,01±0,24*
ЛХАТ-%	8,02±0,76*	7,50±0,68	5,13±0,71*	9,20±0,57**
ЛХАТ-М	101±13,3*	44,3±5,41	79,2±9,21*	131±7,71***
ПГЛА, мкмоль/мл	123±10,6*	183±10,8	129±23,3*	240±41,2**
П-ТГЛ, мкмоль/мл	20,0±3,52*	63,2±7,81	14,9±1,99*	28,5±5,10**

липазы (П-ТГЛ, КФ 3.1.1.32) измеряли в условиях ингибирования липопротеинлипазы [10, 15]. Активность ферментов липолизической трансформации липопротеинов выражали в микромолях на 1 л сыворотки крови. Полученный цифровой материал обрабатывали статистически по Стьюденту—Фишеру.

Результаты и обсуждение. Включение холестерина в диету необлученных крыс привело к накоплению холестерина и триацилглицеринов в печени (табл. 1). При этом синхронно повышались содержание диеновых конъюгатов и активность супероксиддисмутазы. Биохимической картине развивающегося стеатоза печени соответствовало уменьшение активности холестеролэстеразы и повышение активности кислой липазы и фосфолипазы А₂.

Однократное внешнее γ -облучение крыс в дозах 0,25—5,0 Гр вызывает транзиторную радиационно-индуцированную дислипидотеинемию на 10—30-е сутки после облучения [14]. Спустя месяц в печени облученных крыс нормализовались изучаемые показатели обмена липидов, за исключением активности супероксиддисмутазы. Холестериновая диета в период развития радиационно-индуцированной дислипидотеинемии вызвала более глубокие изменения изучаемых показателей обмена липидов в печени. Прежде всего обращает на себя внимание более выраженное накопление диеновых конъюгатов в печени крыс, облученных в дозе 0,5 Гр, что, вероятно, является следствием уменьшения активности супероксиддисмутазы. Холестериновая диета у этих крыс привела к достоверному повышению содержания МДА и параллельному повышению активности глутатионпероксидазы. Следовательно, можно предположить, что холестеринная диета в период развития радиационно-индуцированной дислипидотеинемии дополнительно усиливает процессы перекисного окисления липидов на фоне относительного

истощения антиоксидантной ферментативной защиты на ранних этапах и компенсаторной активации антиоксидантной ферментативной защиты на поздних этапах свободнорадикального окисления липидов. Холестериновая диета у крыс, облученных в сублетальной дозе 5,0 Гр, дополнительно вызвала более выраженное накопление МДА и снижение активности не только супероксиддисмутазы, но и глутатионпероксидазы. Следовательно, у этих животных развивается недостаточность ферментных систем антиоксидантной защиты, что и ведет к накоплению ранних и поздних продуктов перекисного окисления липидов. По сравнению с необлученными животными у крыс, облученных в дозе 0,5 Гр и содержащихся на холестеринной диете, обнаружено более высокое содержание холестерина в печени. При сублетальной дозе облучения крыс такого эффекта не выявлено, поскольку эти животные были менее активными и потребляли меньшее количество корма, обогащенного холестерином.

Полученные результаты не противоречат данным литературы о том, что холестеринная диета на фоне гипотиреодного состояния у крыс вызывает гиперхолестеринемия, накопление нейтральных липидов и холестерина в виде эфиров холестерина в печени [3, 16]. При этом в печени повышается активность комплекса лизосомальных эндопептидаз и фосфолипаз А₁ и А₂. Активность кислой липазы существенно не изменяется, а активность холестеролэстеразы может повышаться или снижаться в зависимости от условий опыта [1, 2, 9]. Известно, что активность кислой холестеролэстеразы в печени снижена при гипотиреодных состояниях [21]. Активность ЛХАТ и П-ТГЛ при алиментарной гиперхолестеринемии на фоне гипотиреоза уменьшается за счет снижения секреции ферментов в кровь гепатоцитами [18, 19].

Известно, что эссенциальные фосфолипиды (препарат РРС) в дозах 280—2800 мг/кг пре-

пятствуют развитию экспериментального атеросклероза у крыс [20]. Предполагают, что этот эффект связан с антиоксидантным действием полиненасыщенного фосфатидилхолина, его влиянием на процессы прямого и обратного транспорта холестерина, активность липолитических ферментов в печени и сыворотке крови [13]. В наших экспериментах препарат РРС, вводимый интрагастрально во время содержания крыс на холестеринной диете, у необлученных крыс препятствовал накоплению диеновых конъюгатов и триацилглицеринов, а также снижению активности холестеролэстеразы в печени. У животных, предварительно облученных в дозе 0,5 Гр, этот препарат достоверно снижал также накопление холестерина в печени и нормализовывал активность супероксиддисмутазы и глутатионпероксидазы. При сублетальной дозе облучения препарат обеспечивал снижение содержания диеновых конъюгатов, МДА и триацилглицеринов. Таким образом, препарат РРС, примененный совместно с холестеринной диетой, у всех групп животных оказывал различной степени гепатопротекторное действие, заключающееся в ограничении процессов перекисного окисления липидов и меньшем накоплении триацилглицеринов в печени. Поскольку препарат РРС не оказывал влияния на активность липолитических ферментов в печени облученных крыс, закономерное снижение содержания триацилглицеринов в печени могло быть связано с функционированием липидтранспортной системы в кровеносном русле.

Установлено, что холестеринная диета у необлученных крыс привела к гиперхолестеринемии за счет увеличения уровня холестерина ЛПНП и уменьшения количества холестерина ЛПВП (табл. 2). При этом активность ЛХАТ и ферментов липолитической трансформации липопротеинов была снижена.

У животных контрольных групп к 30-м суткам после внешнего γ -облучения были выявлены некоторые отличия в показателях липидтранспортной системы по сравнению с итактными крысами (повышенное содержание холестерина ЛПНП при обеих дозах, повышенная активность ЛХАТ при дозе облучения 0,5 Гр). Холестеринная диета у облученных животных в период развития радиационно-индуцированной дислипидотеинемии вызвала гиперхолестеринемии. У животных, предварительно облученных в дозе 5,0 Гр, содержание холестерина в сыворотке крови было ниже, чем у крыс, облученных в дозе 0,5 Гр, или у необлученных животных. Это, вероятно, связано с меньшим потреблением корма, обогащенного холестерином. Особенностью развития алиментарной гиперхолестеринемии у облученных животных было отсутствие достоверных изменений количества холестерина ЛПВП. В отличие от необлученных крыс холестеринная диета у предварительно облученных крыс привела к снижению фракционной активности ЛХАТ и повышению молярной активности фермента. При этом активность ферментов липолитической трансформации липопротеинов была снижена. Можно предположить, что при алиментарной гиперхолестеринемии у облученных крыс изменяется изоферментный спектр ЛХАТ и в большей степени функционирует изофермент β -ЛХАТ, использующий в качестве субстрата апо-В-содержащие липопротеины [4, 11].

Препарат РРС у необлученных крыс, содержащихся на холестеринной диете, препятствовал изменению содержания холестерина ЛПВП и активности ферментов липолитической трансформации липопротеинов, но не влиял на уровень общего холестерина в сыворотке крови [17]. У крыс, предварительно облученных в дозе 0,5 Гр и содержащихся на холестеринной диете, препарат РРС способствовал сохранению содержания холестерина ЛПВП на исходном уровне и уменьшал выраженность гиперхолестеринемии за счет снижения содержания холестерина ЛПНП. При сублетальной дозе облучения препарат РРС не оказывал влияния на уровень алиментарной гиперхолестеринемии, но способствовал стимуляции ЛХАТ-реакции и активации ферментов липолитической трансформации липопротеинов.

Таким образом, холестеринная диета (независимо от предшествующего облучения крыс) вызывает увеличение содержания холестерина, триацилглицеринов, диеновых конъюгатов и активности фосфолипазы A_2 в печени, общего холестерина и холестерина ЛПНП в сыворотке крови, а также снижение активности холестеролэстеразы в печени, фракционной активности ЛХАТ, активности ферментов липолитической трансформации липопротеинов и содержания холестерина ЛПОНП в сыворотке крови. Холестеринная диета на фоне предварительного облучения крыс (0,5 и 5,0 Гр) не вызывает снижения уровня холестерина ЛПВП, повышает содержание МДА и молярную активность ЛХАТ в сыворотке крови. В зависимости от дозы предварительного облучения крыс холестеринная диета приводит к разнонаправленным сдвигам в активности супероксиддисмутазы, глутатионпероксидазы и кислой липазы печени. Препарат РРС снижает содержание триацилглицеринов и диеновых конъюгатов во всех группах животных с алиментарной гиперхолестеринемией. У необлученных животных препарат РРС препятствует изменениям содержания холестерина ЛПВП, а также активности холестеролэстеразы в печени и ферментов липолитической трансформации липопротеинов в сыворотке крови. У крыс, облученных в дозе 0,5 Гр, препарат РРС значительно снижает уровень холестерина в печени и сыворотке крови и оказывает нормализующее влияние на уровень холестерина ЛПВП, активность супероксиддисмутазы и глутатионпероксидазы печени. При сублетальной дозе облучения (5,0 Гр) препарат РРС препятствует изменениям содержания МДА и активности ферментов липолитической трансформации липопротеинов, но достоверно повышает активность ЛХАТ в сыворотке крови.

ЛИТЕРАТУРА

1. Васильев А. В., Погожева А. В., Пономарева Л. Г. и др. // Пат. физиол.— 1986.— № 3.— С. 47—50.
2. Звягина О. П., Нестерин М. Ф. // Вопр. питания.— 1980.— № 1.— С. 52—54.
3. Климов А. Н., Рыженков В. Е. Экспериментальное изучение гиполлипидемических и антиатерогенных средств: Метод. рекомендации.— М., 1988.
4. Коневалова Н. Ю., Чиркина И. А., Чиркин А. А. // Вопр. мед. химии.— 1989.— № 2.— С. 37—42.
5. Костюк В. А., Потапович А. И., Лунец Е. Ф. // Там же.— 1984.— № 4.— С. 125—127.
6. Матюшин Б. Н., Логинов А. С., Ткачев В. Д. // Лаб. дело.— 1991.— № 7.— С. 16—19.

7. Пересленина Н. А. // Там же.— 1989.— № 11.— С. 20—23.
8. Стальная И. Д., Гаришвили Т. Г. // Современные методы в биохимии.— М., 1977.— С. 66—68.
9. Табагари С. И., Феофилактова С. П., Варсанович Е. А. и др. // Вопр. мед. химии.— 1990.— № 6.— С. 32—34.
10. Творогова М. Г., Кантарджян И. Г., Пеговская А. В., Титов В. П. // Лаб. дело.— 1982.— № 4.— С. 22—26.
11. Чиркин А. А., Коневалова Н. Ю. // Вопр. мед. химии.— 1987.— № 6.— С. 124—128.
12. Чиркин А. А., Янушевский Д. С., Воронов Г. Г. и др. // Изв. АН Белоруси. Сер. биол. наук.— 1992.— № 3—4.— С. 50—55.
13. Шумахер Р., Гундерман К., Шнайдер Е. «Эссенциальные» фосфолипиды в лечении атеросклероза.— Л., 1989.— С. 4—20.
14. Янушевский Д. С., Коневалова Н. Ю., Житкевич А. В. и др. // Изв. АН Белоруси. Сер. биол. наук.— 1992.— № 3—4.— С. 46—50.
15. Baginsky M. L., Brown W. V. // J. Lipid Res.— 1979.— Vol. 20.— P. 548—556.
16. Bochenek W., Rodgers J. B. // Biochim. biophys. Acta.— 1978.— Vol. 528.— P. 1—16.
17. Knudman J. T., Beynen A. C., Katan M. B. // Amer. J. clin. Nutr.— 1989.— Vol. 49.— P. 266—268.
18. Murase T., Yamada N., Uchimira H. // Metabolism.— 1983.— Vol. 32.— P. 146—150.
19. Ridgway N. D., Dolphin P. J. // J. Lipid Res.— 1985.— Vol. 26.— P. 1300—1313.
20. Samochowiec L., Kadlubowska D., Rozewicka L. // Atherosclerosis.— 1976.— Vol. 23.— P. 305—317.
21. Severson D. L., Fletcher Th. // Biochim. biophys. Acta.— 1981.— Vol. 675.— P. 256—264.

Поступила 28.04.93

EFFECT OF POLYUNSATURATED PHOSPHATIDYLCHOLINE ON THE ACTIVITY OF ANTIOXIDATIVE AND LIPOLYTIC ENZYMES IN IRRADIATED RATS WITH ALIMENTARY HYPERCHOLESTEROLEMIA.

A. A. Chirkin, N. Yu. Konevalova, I. N. Grebennikov, V. A. Kulikov, G. V. Filipenko

Medical Institute, Republican Lipid Medico-Diagnostic Consulting Centre, Vitebsk.

A high-cholesterol diet containing 3.5 % cholesterol, 0.2 % methyl thiouracil and 20 % of heated sunflower-seed oil caused an increase in the content of cholesterol, triacylglycerols, diene conjugates and in the activity of phospholipase A₂ in rat liver and of serum total cholesterol and cholesterol of low density lipoproteins, and a decrease in the activity of hepatic cholesterol esterase, in the fractional activity of lecithin:cholesterol acetyl transferase (LCAT), in the activity of the enzymes involved in the lipolytic transformation of lipoproteins and in the serum levels of very low density lipoprotein cholesterol. The content of malonic dialdehyde in liver tissue and molar activity of LCAT in blood serum were increased after preirradiation (0.5 and 5.0 Gy) of rats kept on the cholesterol diet. The preparation of polyunsaturated phosphatidylcholine was shown to decrease the content of triacylglycerols and diene conjugates in liver tissue of rats with alimentary hypercholesterolemia. In rats irradiated in a dose of 0.5 Gy the phosphatidylcholine preparation decreased the content of cholesterol in liver tissue and blood serum, exhibited the normalizing effect on the content of cholesterol of high density lipoproteins, on the activity of superoxide dismutase and glutathione peroxidase; in a dose of 5.0 Gy this phosphatidylcholine preparation normalized the content of malonic dialdehyde, activity of the enzymes involved in lipolytic transformation of lipoproteins and increased the LCAT activity.

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 1994

УДК 616.152.32-008.931:577.152.3111-02.615.849.11-092.9-07

О. П. Матышевская, Е. А. Слатвинская, Н. Е. Кучеренко

ФОСФОЛИПАЗА А₂ В БИОХИМИЧЕСКИХ МЕХАНИЗМАХ РЕАКЦИИ ЛИМФОЦИТОВ СЕЛЕЗЕНКИ НА РЕНТГЕНОВСКОЕ ОБЛУЧЕНИЕ ЖИВОТНЫХ

Киевский университет им. Тараса Шевченко, Институт молекулярной биологии и генетики АН Украины, Киев

Развитие функциональных дефектов иммунокомпетентных клеток — одно из основных проявлений действия на организм ионизирующей радиации в дозах, не приводящих к выраженной лучевой болезни, но вызывающих реакцию со стороны иммунной системы организма. Поскольку реализация функций лимфоцитов во многом определяется состоянием их клеточной поверхности, большое внимание уделяется изучению пострадиационной патологии мембран. Высокая радиочувствительность лимфоцитов позволяет предположить, что многие специфические свойства мембран изменяются вскоре после лучевого воздействия в дозах до 1 Гр. Так, в период 6 ч после облучения суспензии выявляются значительное обеднение мембранной поверхности лимфоцитов селезенки углеводами, утрата специфических рецепторов на поверхности тимоцитов, что предшествует массовой пикнотизации ядер [1, 5]. В большинстве случаев взаимосвязь между первичными изменениями поверхности мембран клеток и нарушением рецепторных функций лимфоцитов изучали при облучении в культуре клеток, меньше исследований проведено в условиях облучения целого организма.

На уровне плазматической мембраны лимфоцитов происходит не только рецепция различных лигандов, но и включение цепи биохимических реакций внутри клетки. Передача активационного сигнала с клеточной поверхности сопряжена с активацией фосфолипазы (ФЛ) А₂ — фермента, освобождающего из состава фосфолипидов арахидоновую кислоту [8, 12]. С другой стороны, активация фосфолипидного гидролиза имеет место и при действии ионизирующей радиации. При этом

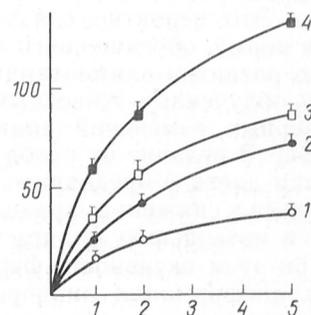


Рис. 1. Зависимость активности ФЛ А₂ от времени преинкубации лимфоцитов селезенки с митогенами.

1 — КонА; 2 — ФГА; 3 — ЛПС; 4 — кальцийный ионофор А23187. По оси абсцисс — время преинкубации, мин; по оси ординат — активность, % от контроля.

наблюдается накопление гидроперекисей жирных кислот и изменение спектра полярных метаболитов арахидоновой кислоты [3, 13]. В связи с тем что патология мембранорецепторных взаимодействий лимфоцитов в условиях облучения целого организма нуждается в дальнейшем исследовании, представляет интерес изучение активности ФЛ А2 лимфоцитов селезенки и влияния на нее митогенных лигандов в норме и в ранний постлучевой период.

Методика. В опытах использовали крыс линии Вистар массой 130—150 г. Фракцию лимфоцитов селезенки получали центрифугированием клеточной суспензии в градиенте плотности фикоколл — верографин [6]. Клетки (10^7 /мл) преинкубировали при 37 °С в среде 199 с добавлением 10 мкг/мл митогенов — конканавалина А (КонА), фитогемагглютинина (ФГА), липополисахарида (ЛПС), А23187 («Sigma», США) и без такового. Преинкубацию останавливали в указанное время путем осаждения клеток и замены среды. Надосадок после разрушения клеток в гипосмотической среде использовали для определения ферментной активности. Активность ФЛ А2 определяли по освобождению из 2- 14 С-арахидоилфосфатидилэтаноламина арахидоновой кислоты, экстрагируемой по методу [11]. Реакцию проводили в течение 10 мин при 37 °С в среде, содержащей 50 мМ трис-НСl-буфер рН 8,0, 5мМ СаСl₂, 5 мкг сывороточного альбумина, 0,08 мМ дезоксихолата натрия, 30 мкг белка ферментного препарата, 16 мкМ субстрата (0,03 мкКи).

Для изучения освобождения арахидоната из мембранных фосфолипидов лимфоциты предварительно инкубировали с С 14 -арахидонатом (1 мкКи) в среде 199 в течение 90 мин при 37 °С. Затем клетки инкубировали указанное время с добавлением А23187 и без такового. Реакцию останавливали добавлением холодного 10 мМ КN₂PO₄ рН 7,4 с 0,2 % бычьим сывороточным альбумином и центрифугированием. Освобождение арахидоната оценивали по степени радиоактивности супернатанта. Радиоактивность супернатанта подсчитывали на β -спектрометре «Delta» (США).

Животных облучали на установке РУМ-17 при условиях: мощность поглощенной дозы излучения 245 сГр/мин, фильтры 0,5 мм (Al+Cu), напряжение на трубке 200 кВ, сила тока 5 мА, кожно-фокусное расстояние 50 см.

Результаты и обсуждение. Активность ФЛ А2 в лимфоцитах селезенки крыс составляет $0,32 \pm 0,03$ нмоль 14 С-арахидоната в 1 мин на 1 мг белка и повышается после 5-минутной преинкубации клеток с КонА, ФГА, ЛПС и А23187 (рис. 1). Известно, что эти неспецифические стимуляторы различной природы способны инициировать активацию лимфоцитов в такой же степени, как и связывание антигена с рецептором, вовлекая в процесс активации значительное число клеток в популяции лимфоцитов и проявляя эффект в течение первых минут после воздействия [7, 8]. Как видно из рис. 1, величина активирующего действия митогенов на фермент различна. Эффект КонА наименьший и достоверно выражен лишь через 5 мин после начала инкубации. Другой Т-клеточный митоген, ФГА, в этот период оказывает более выраженное действие на ФЛ А2. Наиболее выраженное действие оказывает В-кле-

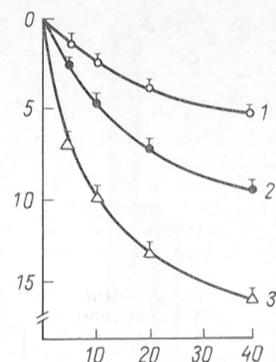


Рис. 2. Влияние митогенов на освобождение арахидоновой кислоты в лимфоцитах селезенки.

1 — контроль; 2 — ЛПС; 3 — кальциевый ионофор А23187. По оси абсцисс — время инкубации клеток, мин; по оси ординат — освобождение 14 С-арахидоновой кислоты, %.

точный активатор ЛПС, которое достоверно проявляется уже через 1 мин после добавления в среду. Возможно, модельные системы с использованием ЛПС более приближены к условиям реального иммуногенеза.

Выявленная различная степень стимулирующего действия митогенов на активность фермента может быть связана с гетерогенностью субпопуляционного состава лимфоцитов селезенки и их специфичностью к рецепторам, связанным с определенными молекулами ферментов на поверхности мембраны. Максимальный эффект на активность ФЛ А2 оказывает кальциевый ионофор А23187. Введение его в среду инкубации в концентрации 0,5 мкМ вызывает повышение активности фермента на 150 % (см. рис. 1).

Эксперименты по изучению активности ФЛ А2 с использованием экзогенного субстрата были дополнены в модельных опытах с использованием интактных лимфоцитов, предварительно инкубированных с 14 С-арахидонатом. Такая модель благодаря специфическому включению метки в мембранные фосфолипиды позволяет измерить освобождение меченого арахидоната в условиях, приближенных к *in vivo*. Уровень свободной жирной кислоты в лимфоцитах селезенки в норме очень низок и составляет лишь 4 % от общего количества включенного в фосфолипиды 14 С-арахидоната (рис. 2). Такой уровень определяется балансом между освобождением арахидоната из состава фосфолипидов при их гидролизе ФЛ и реэтерификацией в липидный комплекс с помощью ацилтрансферазы, обладающей высоким сродством к лизоформам фосфолипидов [10].

Введение в среду инкубации ЛПС и А23187 сопровождается повышением освобождения арахидоната через 30 мин после начала инкубации до уровня 9 и 18 % соответственно (см. рис. 2). Это свидетельствует о сдвиге равновесной концентрации свободного арахидоната в лимфоцитах при действии указанных лигандов в сторону повышения за счет активации эндогенного фосфолипазного гидролиза, осуществляемого ФЛ А2, что совпадает с данными, полученными при изучении активности фермента с использованием экзогенного субстрата.

Таким образом, катализируемый ФЛ А2 гидролиз фосфолипидов с освобождением арахидоната в лимфоцитах селезенки может регулироваться

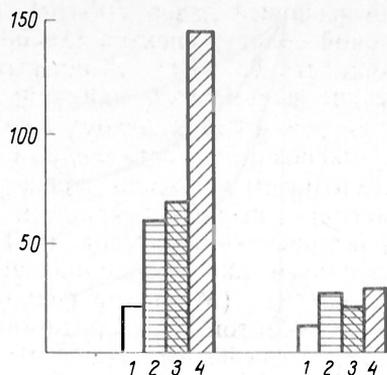


Рис. 3. Активность ФЛ А2 после преинкубации лимфоцитов селезенки с митогенами через 6 ч после облучения крыс в дозе 0,5 Гр (а) и 1 Гр (б).

1 — КнА; 2 — ФГА; 3 — ЛПС; 4 — кальциевый ионофор А23187. По оси ординат — активность, % от контроля.

исследуемыми лигандами и быть одним из ранних биохимических превращений при формировании активационного сигнала. Способность КонА и ФГА повышать уровень арахидоновой кислоты и ее метаболитов — простагландинов E_2 и F_2 — наряду с повышением включения 3H -тимидина показана также на лимфоцитах селезенки и тимocyтах мышей [8, 9].

ФЛ А2 требует для проявления оптимальной активности наличия в инкубационной среде ионов кальция в миллимолярных концентрациях. Обнаруженный нами максимальный активирующий эффект А23187 на процесс освобождения арахидоната может быть связан с тем, что ионофор создает оптимальную для фермента концентрацию внутриклеточного кальция и обеспечивает непосредственное взаимодействие фермента с активирующим ионом. Не исключено также, что ионофор действует на весь пул лимфоцитов селезенки независимо от их субпопуляционной принадлежности. Действие лектинов и ЛПС на фермент скорее всего опосредовано включением других регуляторных механизмов.

Активность ФЛ А2 изучали через 6 и 12 ч после облучения животных в дозе 0,5 Гр и через 6 ч после облучения в дозе 1 Гр. В этот период количественный состав популяции лимфоцитов селезенки остается постоянным [2], не изменяется при таких условиях облучения и соотношение Т- и В-лимфоцитов [4]. Как видно из таблицы, активность ФЛ А2 в постлучевой период повышается. Эти изменения коррелируют с повышением уровня свободного арахидоната из мембранных фосфолипидов в лимфоцитах селезенки. Степень изме-

Показатели фосфолипидного гидролиза в лимфоцитах селезенки в ранний постлучевой период

Доза облучения, Гр	Время после облучения, ч	Активность ФЛ А2, нмоль/мин на 1 мг белка	Освобождение арахидоната, %
Контроль		0,32±0,03	4,5±0,4
0,5	6	0,41±0,04	5,3±0,6
0,5	12	0,49±0,05*	9,2±0,2*
1,0	6	0,55±0,03*	13,7±0,6*

Примечание. Звездочка — $p < 0,05$ по сравнению с контролем.

нения обоих параметров зависит от дозы и времени после облучения. Если при действии ионизирующего излучения в дозе 0,5 Гр статистически достоверная активация фосфолипидного гидролиза с освобождением арахидоната наблюдается через 12 ч, то при воздействии в дозе 1 Гр активация проявляется уже через 6 ч.

Как показано нами ранее, в период до 12 ч после облучения животных, предшествующий снижению численности лимфоцитов селезенки, наблюдается повышение в клетках концентрации свободного цитозольного Ca^{2+} и на более поздних сроках — продукта перекисного окисления липидов — малонового диальдегида [2]. Очевидно, недостаточная эффективность ферментов антиокислительной системы в купировании патологической реакции объясняется тем, что они не могут предотвратить повышение концентрации Ca^{2+} — активатора ФЛ А2 — и катализируемый ферментом усиленный гидролиз фосфолипидов.

Как показали эксперименты, проведенные через 6 ч после облучения животных в дозе 0,5 Гр, добавление в среду инкубации лимфоцитов А23187 дает эффект, сравнимый с таковым в контроле. Стимулирующее действие ЛПС и лектинов на фермент снижается (рис. 3). В наибольшей степени снижается активирующее действие ЛПС, что может быть связано с большей радиочувствительностью В-клеток. Однако в целом специфичность активирующего эффекта лигандов в ряду А23187 > ЛПС > ФГА > КонА сохраняется.

Через 6 ч после облучения животных в дозе 1 Гр способность ЛПС и лектинов активировать ФЛ А2 снижается в еще большей степени, добавление кальциевого ионофора также не вызывает существенного прироста ферментативной активности, специфичность действия примененных лигандов теряется (см. рис. 3).

Таким образом, активность ФЛ лимфоцитов селезенки в этот предшествующий постлучевой гибели клеток период не только повышена, но и не контролируется кальцием и рецепторным взаимодействием с мембранными лигандами. Это указывает на возможную роль фермента в дезинтеграции мембранного матрикса, развитию патологии рецепторного взаимодействия и последующей деградации лимфоидных клеток. Повышенный уровень свободной арахидоновой кислоты может способствовать также усиленному синтезу простагландинов и лейкотриенов, играющих определенную роль в интерфазной гибели клеток [3]. Полученные данные способствуют пониманию биохимических механизмов нарушения иммунного ответа при антигенной стимуляции лимфоцитов селезенки в ранний период после действия ионизирующей радиации.

ЛИТЕРАТУРА

1. Жербин Е. А., Чухловин А. // Цитология. — 1984. — № 8. — С. 73—76.
2. Кучеренко Н. Е., Матышевская О. П., Остапченко Л. И. и др. // Радиобиология. — 1991. — Т. 31, № 5. — С. 739—742.
3. Романцев Е. Ф., Жуланова З. И., Приишников Е. Н. и др. // Там же. — 1986. — Т. 26, № 5. — С. 579—589.
4. Ярилин Л. А., Подушкина Э. Ф. // Там же. — 1982. — Т. 22, № 4. — С. 455—461.
5. Anderson R. E., Standefer I. C., Scaletly I. V. // Cell Immunol. — 1987. — Vol. 33. — P. 45—61.

6. *Boyum A.* // Scand. J. clin. Lab. Invest.— 1968.— Suppl. 97.— P. 28.
7. *Gordon M., Jacob W., Cheung R.* // J. Immunol.— 1985.— Vol. 135, N 5.— P. 167—186.
8. *Hirata F., Matsuda K., Nolsu Y.* et al. // Proc. nat. Acad. Sci. USA.— 1984.— Vol. 81, N 13.— P. 4714—4721.
9. *Hirata F., Toyoshimata S., Axelrod J.* et al. // Ibid.— 1980.— Vol. 77, N 2.— P. 862—865.
10. *Irvine R.* // Biochem. J.— 1982.— Vol. 204, N 1.— P. 3—15.
11. *Katsumata M., Gupta C., Goldman A.* // Analyt. Biochem.— 1986.— Vol. 154, N 3.— P. 676—681.
12. *Nel A., Woolen M., Galbrai R.* // Clin. Immunopath.— 1987.— Vol. 44, N 2.— P. 167—186.
13. *Wollers H., Tilburg C., Koninds A.* // Int. J. Radiat. Biol.— 1987.— Vol. 51.— P. 619—628.

Поступила 16.02.93

PHOSPHOLIPASE A₂ IN BIOCHEMICAL RESPONSES OF SPLENIC LYMPHOCYTES TO X-RAY IRRADIATION.

O. P. Matyshevskaya, E. A. Slatvinskaya, N. E. Kucherenko

Taras Shevchenko University; Institute of Molecular Biology and Genetics, Ukrainian Academy of Sciences, Kiev.

Preincubation of rat splenic lymphocytes with nonspecific mitogens and calcium ionophore A23187 led to the activity of phospholipase A₂ which hydrolyzed arachidonoyl phospholipids and to increased cellular levels of free arachidonic acid. The effect of some substances was decreased as follows: A23187 > lipopolysaccharide > phytohemagglutinin > concanavalin A. Dose-dependent activation of phospholipid hydrolysis and arachidonic acid release were observed within 6-12 hrs after X-ray irradiation of animals in doses of 0.5 and 1.0 Gy. The involvement of phospholipase A₂ in deterioration of receptor interactions occurring during transmission of an activation signal in splenic lymphocytes in the early postirradiation period is discussed.

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 1994

УДК 615.153.915-391-02:615.849.191.07

*Т. Н. Зырянова, В. М. Лаврова,
И. А. Канапацкая, А. Т. Пикулев*

ВЛИЯНИЕ НИЗКОЭНЕРГЕТИЧЕСКОГО ЛАЗЕРНОГО ИЗЛУЧЕНИЯ НА ИНТЕНСИВНОСТЬ ПЕРЕКИСНОГО ОКИСЛЕНИЯ ЛИПИДОВ

Белорусский университет, Минск

В связи с интенсивным применением лазерной техники в медицине и биологии действие низкоэнергетического лазерного излучения на организм стало предметом всестороннего изучения [7—10]. Имеются данные о физиологических, морфологических, гистологических, биохимических изменениях в органах и тканях экспериментальных животных в условиях воздействия лазерного излучения [8, 9, 12—14]. Однако исследование процессов перекисного окисления липидов (ПОЛ) в условиях воздействия на животный организм лазерного излучения практически не проводилось, в то же время хорошо известно, что процессы ПОЛ участвуют в реализации различного рода воздействий на организм [2, 4].

Целью настоящей работы явилось изучение начальных и конечных продуктов ПОЛ в эритроцитах, плазме крови, митохондриях печени белых крыс, подвергнутых воздействию низкоэнергетического лазерного излучения.

Методика. Исследования проведены на безлинейных белых крысах массой 150—200 г. В качестве источника лазерного излучения использо-

вали гелий-неоновый лазер ЛГ-75-1, генерирующий в красной области спектра ($\lambda=632,8$ нм, выходная мощность 25 мВт). Животных фиксировали в станке и теменную или эпигастральную область подвергали однократному лазерному воздействию. Экспозиции составляли 1, 10, 20 и 30 мин. Контролем служили фиксированные в станке животные, не подвергавшиеся облучению.

Для характеристики процессов ПОЛ исследовали содержание и кинетику образования малонового диальдегида (МДА) по реакции с 2-тиобарбитуровой кислотой [11]. Среда инкубации содержала 0,05 М фосфатный буфер pH 7,4, 0,02 М NaCl, 0,1 мМ FeSO₄, 1 мМ аскорбат. Инкубацию проводили при 37 °С, пробы для измерения МДА отбирали через 5, 10, 15 мин инкубации. Содержание первичных продуктов ПОЛ — диеновых конъюгатов (ДК) — определяли по методу [6], количество МДА — по методу [1], активность цинк-медьсодержащей супероксиддисмутазы (СОД; КФ 1.15.1.1) — по методу [5].

Результаты и обсуждение. При облучении эпигастральной области содержание ДК в митохондриях печени при воздействии лазерного света в течение 1 и 30 мин составило соответственно 46 и 172 % от такового у интактных животных. Статистически значимых изменений уровня МДА в печени крыс не обнаружено, однако имела место тенденция к накоплению этого продукта при всех экспозициях.

В эритроцитах и плазме изменения в накоплении МДА имели разную направленность, зависящую от экспозиции лазерного света. Так, при 1 и 10 мин экспозиции в эритроцитах обнаружено незначительное накопление МДА, а в плазме крови уровень этого продукта снижался. При 20- и 30-минутном облучении имела место противоположная направленность.

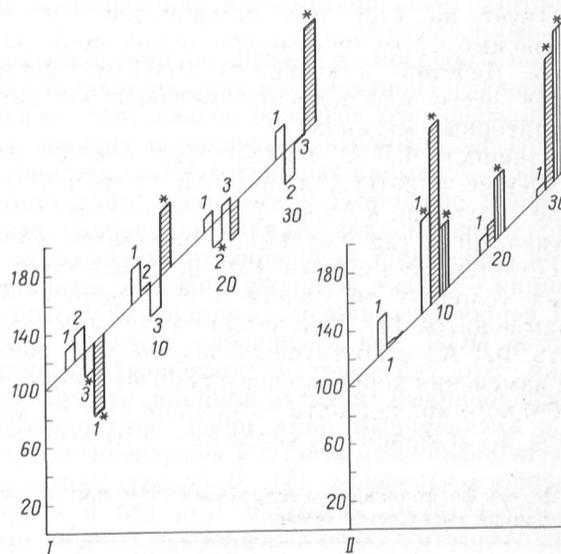


Рис. 1. Уровень продуктов ПОЛ и активность СОД в тканях крыс в условиях воздействия различных экспозиций низкоэнергетического лазерного излучения на эпигастральную и теменную области.

По оси абсцисс — экспозиция лазерного света, мин; по оси ординат — уровень продуктов ПОЛ, % к контролю. Здесь и на рис. 2: 1 — облучение эпигастральной области, II — облучение теменной области. Светлые столбики — содержание МДА: 1 — в митохондриях печени, 2 — в эритроцитах, 3 — в плазме крови; столбики с косой штриховкой — содержание ДК; столбики с вертикальной штриховкой — активность СОД. Звездочка — статистически достоверные изменения.

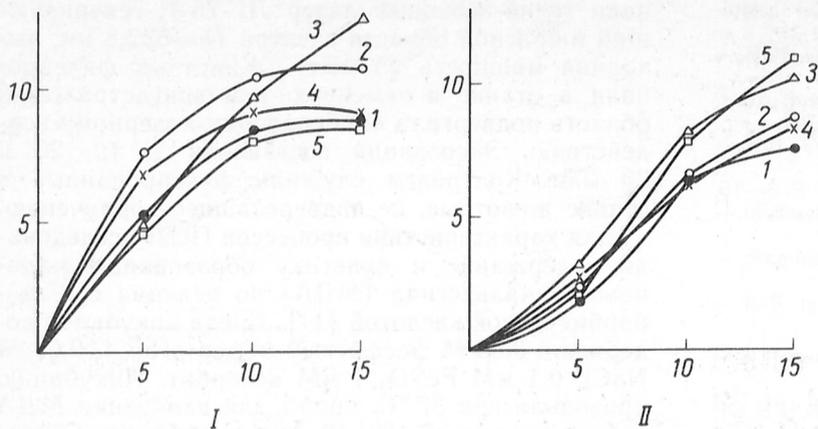


Рис. 2. Кинетика накопления МДА в митохондриях печени крыс при лазерном воздействии в ходе Fe^{2+} -и аскорбатзависимого ПОЛ.

По оси абсцисс — время инкубации при 37 °С, мин; по оси ординат — концентрация МДА, нмоль на 1 мг белка. 1 — контроль; 2 — облучение 1 мин; 3 — облучение 10 мин; 4 — облучение 20 мин; 5 — облучение 30 мин.

Результаты исследований, характеризующих состояние ПОЛ при облучении теменной области, представлены на рис. 1. Показано, что уровень ДК и МДА в печени повышался при всех исследованных экспозициях, причем достоверно для ДК при 10 и 30 мин облучения, а для МДА при 10 мин воздействия.

В экспериментах *in vitro* было проведено определение интенсивности образования МДА в процессе инкубации митохондрий интактных и облученных животных в системе, содержащей Fe^{2+} и аскорбат. При облучении как эпигастральной, так и теменной области отмечено повышение аскорбатзависимого переокисления липидов. Наиболее выражено образование МДА увеличивалось в митохондриях печени при 10 мин облучения теменной и эпигастральной областей и 30 мин экспозиции лазерного света на теменную область (рис. 2). Следует отметить, что, несмотря на различную интенсивность выявленных изменений, форма кривых накопления МДА у облученных животных была практически одинаковой с контрольными крысами.

Таким образом, в опытах по определению интенсивности спонтанного и индуцированного ПОЛ установлено, что лазерное воздействие вызывает качественно сходные изменения в системе ПОЛ печени крыс, выражающиеся в незначительном накоплении первичных и вторичных продуктов перекисидации липидов. Анализ полученных результатов показывает нелинейность зависимости экспозиция—эффект, волнообразность ответной реакции, непропорциональность изменений уровня продуктов ПОЛ при увеличении времени воздействия. Это указывает на косвенный вторичный, опосредованный характер влияния, что согласуется с высказанным нами ранее предположением о неспецифичности действия низкоэнергетического лазерного излучения [8]. В пользу этого также свидетельствуют данные о том, что в условиях низкоэнергетического лазерного излучения происходит повышение уровня катехоламинов в крови и тканях, аутоокисление которых сопровождается генерацией радикалов супероксида, способных инициировать реакции липоперекисления [7].

В плане трактовки полученного экспериментального материала следует отметить, что деструктивная роль продуктов ПОЛ проявляется в случае их значительного накопления и ослабления антиоксидантной системы организма. Полученные нами данные свидетельствуют о том, что

активность СОД — основного фермента, осуществляющего дезактивацию активных продуктов свободнорадикального окисления липидов, повышалась при всех исследованных экспозициях (см. рис. 1). Необходимо также указать на данные литературы об участии липо- и гидроперекисей в биосинтезе биологически активных соединений, необходимых для репаративных процессов [3]. Таким образом, обнаруженную нами незначительную активацию ПОЛ следует рассматривать как благоприятный процесс, универсальную реакцию организма на физиологическое воздействие. Эффект лазерного облучения оказался генерализованным, поскольку обнаружены изменения уровня продуктов ПОЛ и в печени, и в крови независимо от локализации воздействия.

ЛИТЕРАТУРА

1. Гончаренко М. С., Латинова А. М. // Лаб. дело.— 1985.— № 1.— С. 60—61.
2. Городовникова Е. И., Майсурадзе В. И., Гудзь Т. И., Платонов А. Г. // Науч. докл. высш. школы. Биол. науки.— 1987.— № 7.— С. 41—45.
3. Давлетшина Л. И., Дмитриев Л. Ф., Иванов И. И. // Там же.— 1984.— № 9.— С. 25—30.
4. Демчук М. Л., Левченко Л. И., Промыслов М. М. // Нейрохимия.— 1990.— Т. 9.— С. 108—110.
5. Костюк В. А., Потапович А. И., Ковалева Ж. В. // Вопр. мед. химии.— 1990.— № 2.— С. 88—91.
6. Костюк В. А., Потапович А. И., Лунец Е. Ф. // Там же.— 1984.— № 4.— С. 125—127.
7. Кошелев В. К. Лазер в лечении ран.— Саратов, 1980.— С. 40—42.
8. Пикулев А. Т., Джугурян Н. А., Зырянова Т. Н., Лаврова В. М. // Радиобиология.— 1984.— Т. 34, № 1.— С. 29—34.
9. Самойлов Н. Г. // Успехи соврем. биол.— 1990.— Т. 109, № 2.— С. 302—310.
10. Стадник В. Я., Гамален Н. Ф. // Экспер. онкол.— 1989.— № 1.— С. 12—17.
11. Стальная И. Д., Гаришвили Т. Г. // Современные методы в биохимии.— М., 1977.— С. 66—69.
12. Hermann K., Liebetruhl T. // Med. aktuell.— 1987.— Bd 13, N 8.— S. 372—374.
13. Lubart R., Rochkind S. // Laser Optoelectron Medicine.— Berlin, 1988.— P. 763—765.
14. Saperia D., Glassberg E., Lyons R. F. et al. // Biochem. biophys. Res. Commun.— 1986.— Vol. 138, N 3.— P. 1123—1128.

Поступила 24.02.91

EFFECT OF LOW-ENERGY LASER RADIATION ON LIPID PEROXIDATION.

T. N. Zyryanova, V. M. Lavrova, I. A. Kanapatskaya, A. T. Pikulev

Byelorussian University, Minsk.

Local effect of low-energy laser radiation was shown to alter the rate of lipid peroxidation in rat liver tissue which was manifested as a weak accumulation of primary and secondary lipid peroxidation products. The laser radiation effect proved to be generalized as the content of lipid peroxidation products was similarly altered both in liver tissue and in blood regardless of the radiation site.

© И. М. РОСЛЫЙ, 1994

УДК 615.356:577.164.184.015.2.07

И. М. Рослый

АНТИОКСИДАНТНАЯ АКТИВНОСТЬ СЫВОРОТКИ КРОВИ И ФЕРМЕНТЕМИЯ ПРИ МЕНИНГОКОККОВОЙ ИНФЕКЦИИ У ДЕТЕЙ И ВЗРОСЛЫХ

Центральный НИИ эпидемиологии Государственного комитета санэпиднадзора, Москва

Ухудшение клинического состояния больных при менингококковой инфекции (МИ) сопровождается значительной гиперферментемией [1, 2]. Усиливающийся цитолиз в тяжелых случаях приводит к полиорганной недостаточности, которая является причиной летальных исходов [5]. Одним из механизмов цитолиза является перекисное окисление липидов (ПОЛ). Как было установлено нами ранее [3, 4], МИ сопровождается усилением ПОЛ с выбросом в кровь аспаратаминотрансферазы (АСТ), который зависел от состояния антиоксидантной активности (АОА) сыворотки, а точнее от соотношения церулоплазмин/трансферрин.

Для клинического течения МИ у детей характерно в большей степени развитие интоксикационного синдрома, а не органических нарушений, и, помимо этого, у них реже встречается гиперферментемия, в первую очередь по АСТ. С учетом маркерной роли АСТ как индикатора ПОЛ и состояния АОА сыворотки [3] представляло несомненный интерес сравнение указанных параметров сходных клинических форм МИ у детей и у взрослых.

Методика. Исследовали сыворотку крови 45 взрослых (в возрасте от 20 до 65 лет) на 1—3, 5, 7, 10, 15, 20-е сутки и 35 детей (в возрасте от 8 мес до 12 лет), больных смешанной формой МИ, на 1—3, 5, 7-е сутки. В сыворотке

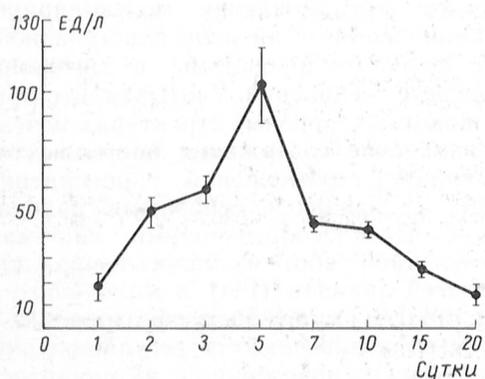


Рис. 1. Динамика активности АСТ у взрослых больных с МИ.

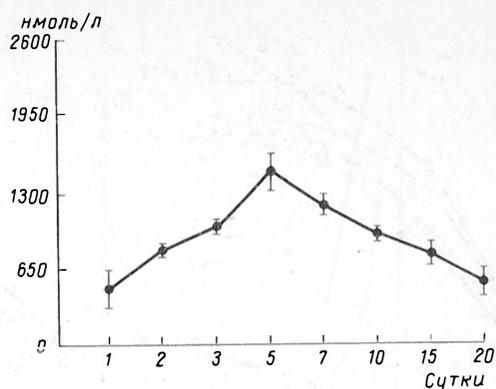


Рис. 2. Динамика содержания МДА в сыворотке крови у взрослых больных с МИ.

крови определяли АСТ, малоновый диальдегид (МДА), церулоплазмин и трансферрин, как описано ранее [3].

Результаты и обсуждение. Как видно из рис. 1 и 2, динамика активности АСТ в сыворотке крови взрослых совпадает с динамикой накопления вторичных продуктов ПОЛ и максимумы активности АСТ и уровня МДА приходятся на 5-е сутки заболевания. Накоплению вторичных продуктов предшествует появление более ранних промежуточных продуктов, каковыми являются диеновые и триеновые конъюгаты [6]. Выброс АСТ обычно отмечался при достижении уровня МДА выше 1560 ± 237 нмоль/л и происходил на фоне резкого снижения коэффициента церулоплазмин/трансферрин (за счет снижения уровня церулоплазмина и нарастания содержания трансферрина) к этому сроку [3], что является характерной особенностью смешанной формы МИ. Тяжесть состояния больных в этот период определяется разными причинами (пневмония, отек мозга, кардиопатия), однако наиболее важным моментом является восстановление кровообращения (реперфузия) в тканях после завершения тромбогеморрагических явлений. Именно к этому сроку усиливается оксигенация тканей, что, несомненно, должно усиливать процессы ПОЛ. Поэтому усиление выхода АСТ в кровь у больных является и признаком улучшения гемодинамической ситуации.

Исследование содержания МДА и АСТ в сыворотке крови детей не выявило коррелятивной

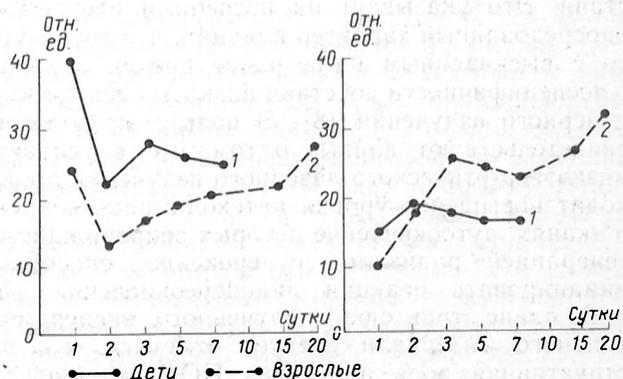


Рис. 3. Динамика содержания церулоплазмина (а) и трансферрина (б) у детей (1) и взрослых (2).

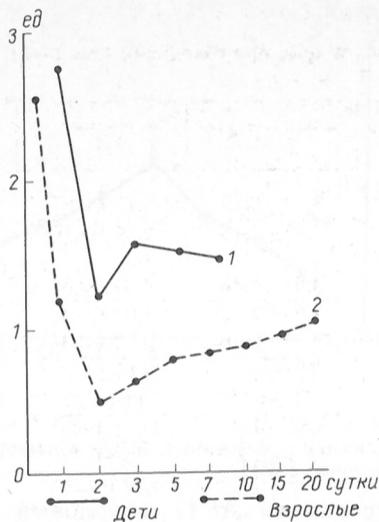


Рис. 4. Динамика коэффициента церулоплазмин/трансферрин у детей (1) и взрослых (2).

зависимости между ними в отличие от такового у взрослых. В течение всего периода уровень АСТ практически не выходил за пределы нормы, а пиковый выброс МДА приходился на 2-е сутки и составлял 1072 ± 329 нмоль/л, постепенно снижаясь к 5-м суткам до 418 ± 51 нмоль/л. В контрольной группе детей он составил 203 ± 24 нмоль/л. Первичные продукты ПОЛ появлялись на 1-е сутки, постепенно снижаясь в последующем.

Таким образом, динамика ПОЛ у детей и взрослых совпадает, но основные процессы выброса продуктов ПОЛ у детей наблюдаются ранее и заканчиваются почти в 4 раза быстрее. При этом признаков цитолиза не наблюдается.

Анализ динамики церулоплазмينا как представителя антиоксидантной системы организма и трансферрина как представителя прооксидантной системы показал, что если у взрослых (рис. 3) уровень трансферрина постоянно растет и достигает $30,3 \pm 2,5$ отн. ед., то у детей он не превышает уровня $17,6 \pm 3,9$ отн. ед. Кроме того, у взрослых уровень церулоплазмينا на 5-е сутки уменьшается до $10,9 \pm 1,8$ отн. ед. и лишь к 20-м суткам увеличивается до $28,5 \pm 3,5$ отн. ед., в то время как у детей содержание церулоплазмينا хотя и уменьшается до $21 \pm 2,4$ отн. ед. на 2-е сутки, но далее остается на уровне 24--25 отн. ед. Уровень церулоплазмينا в контрольной группе детей составил $12,1 \pm 1,3$ отн. ед., а трансферрина — $6,3 \pm 0,8$ отн. ед. Вдвое меньший уровень трансферрина и соответственно вдвое больший уровень церулоплазмينا могут обеспечивать более стабильную защиту для детского организма от ПОЛ. Динамика и уровень коэффициента церулоплазмин/трансферрин (рис. 4) также подтверждают эту мысль.

Дети в отличие от взрослых имеют иное состояние АОА сыворотки, что, возможно, и является объяснением некоторых особенностей их клинического статуса. Так, в отличие от взрослых они быстрее и легче переносят смешанную форму (но не шок!) МИ. Для них в большей степени характерно развитие интоксикационного синдрома, а не органических поражений, обязательных для клиники взрослых.

ЛИТЕРАТУРА

1. Радзивил Г. Г., Рослый И. М. // Тер. арх.— 1988.— № 2.— С. 59—65.
2. Радзивил Г. Г., Рослый И. М. // Там же.— № 11.— С. 53—57.
3. Ромм А. Р., Рослый И. М., Козлов А. В. и др. // Бюл. exper. биол.— 1988.— № 6.— С. 672—675.
4. Рослый И. М., Ромм А. Р., Козлов А. В. и др. // Там же.— 1987.— № 6.— С. 672—675.
5. Рослый И. М. // Сов. мед.— 1989.— № 12.— С. 100—104.
6. Рослый И. М., Ромм А. Р., Козлов А. В., Азизова О. А. // Пат. физиол.— 1990.— № 4.— С. 40—41.

Поступила 17.03.93

SERUM ANTIOXIDATIVE ACTIVITY AND ENZYMOPTAHY IN THE SERUM OF CHILDREN AND ADULTS SUFFERING FROM MENINGOCOCCAL INFECTION.

I. M. Rosly

Central Institute of Epidemiology, Russian State Committee of Sanitary-Epidemiological Service, Moscow.

Aspartate transaminase activity (AST) was measured in the serum of children and adults suffering from generalized meningococcal infection. Activation of AST is only rarely detected in children, which is associated with higher protection from lipid peroxidation. The ratio between antioxidants and prooxidants was higher in children than in adults.

© А. М. ЭФЕНДИЕВ, Б. Ф. КЕРИМОВ, 1994

УДК 616.831-008.939.15-391-02:612.391]-07

А. М. Эфендиев, Б. Ф. Керимов

ВЛИЯНИЕ ГОЛОДАНИЯ НА ЛИПОПЕРОКСИДАЦИЮ В СИНАПТОСОМАЛЬНОЙ И МИТОХОНДРИАЛЬНОЙ ФРАКЦИЯХ РАЗНЫХ СТРУКТУР МОЗГА

Азербайджанский медицинский университет им. Н. Нариманова, Баку

Согласно имеющимся данным [5, 6, 17], голодание у животных способствует «переключению режима работы» нейрогуморальных и метаболических регуляторных систем энергетического и пластического процессов на эндогенный тип питания. При физиологических условиях в отдельных метаболических путях механизма обеспечения этих процессов в различных тканях организма, и в частности в нервных образованиях, генерируются [9, 11, 12] высокорекреационноспособные свободные радикалы (в результате одновалентного восстановления молекулярного O_2 , функционирования ксантиндегидрогеназной/оксидазной ферментной системы в митохондриях) и перекисные соединения. Учитывая, что при голодании животных в разных структурах мозга имеет место изменение содержания биогенных аминов [4], глицина, соотношения гипоксантин/ксантин [6], являющихся основными радикалогенными и перекисьюобразующими системами, в представленной работе изучалось содержание гидроперекисей липидов (ГП) и малонового диальдегида (МДА) в нервных образованиях, предпочтительно вовлеченных в регуляцию пищевого мотивационного поведения, и их синаптосомальной и митохондриальной фракциях.

Методика. Опыты проводили на 250 безлинейных крысах-самцах массой 0,17—0,21 кг.

Накопление ГП (в отн. ед.) и МДА (в нмоль на 1 мг белка) в разных отделах мозга крыс при голодании ($n=6-7$)

Группа животных	Продолговатый мозг	Средний мозг	Гипоталамус	Лимбическая кора	Сенсомоторная кора	Орбитальная кора
Контроль	$2,83 \pm 0,17$	$2,74 \pm 0,18$	$3,42 \pm 0,25$	$3,63 \pm 0,19$	$3,71 \pm 0,27$	$3,85 \pm 0,27$
	$2,24 \pm 0,15$	$2,11 \pm 0,13$	$2,65 \pm 0,17$	$2,75 \pm 0,18$	$2,82 \pm 0,16$	$2,72 \pm 0,16$
Срок голодания, сут:						
1	$2,67 \pm 0,21$	$2,63 \pm 0,17$	$3,81 \pm 0,23$	$3,87 \pm 0,35$	$4,04 \pm 0,37$	$4,11 \pm 0,35$
	$2,43 \pm 0,19$	$2,08 \pm 0,18$	$2,57 \pm 0,13$	$2,90 \pm 0,23$	$2,93 \pm 0,22$	$2,92 \pm 0,15$
2	$2,72 \pm 0,18$	$2,77 \pm 0,22$	$3,71 \pm 0,27$	$3,92 \pm 0,26$	$3,83 \pm 0,34$	$3,94 \pm 0,32$
	$2,54 \pm 0,16$	$2,23 \pm 0,17$	$2,88 \pm 0,19$	$2,97 \pm 0,19$	$2,85 \pm 0,21$	$2,82 \pm 0,28$
3	$3,05 \pm 0,20$	$3,10 \pm 0,23$	$4,23 \pm 0,24^*$	$4,78 \pm 0,32^*$	$5,14 \pm 0,31^{**}$	$5,00 \pm 0,35^*$
	$2,60 \pm 0,17$	$2,56 \pm 0,19$	$3,64 \pm 0,23^*$	$3,36 \pm 0,16^*$	$3,65 \pm 0,28^*$	$3,45 \pm 0,26^*$
5	$3,55 \pm 0,23^*$	$3,40 \pm 0,11^*$	$5,01 \pm 0,24^{**}$	$4,93 \pm 0,38^*$	$5,36 \pm 0,42^{**}$	$5,44 \pm 0,28^{**}$
	$3,08 \pm 0,22^*$	$2,94 \pm 0,28^*$	$3,87 \pm 0,28^{**}$	$3,82 \pm 0,37^*$	$3,82 \pm 0,24^{**}$	$3,63 \pm 0,27^*$
7	$3,86 \pm 0,32^*$	$3,92 \pm 0,27^{**}$	$5,48 \pm 0,31^{***}$	$5,65 \pm 0,43^{**}$	$6,64 \pm 0,31^{***}$	$6,27 \pm 0,37^{***}$
	$3,62 \pm 0,25^{***}$	$3,37 \pm 0,23^{***}$	$3,92 \pm 0,35^{**}$	$3,97 \pm 0,25^{**}$	$4,02 \pm 0,21^{***}$	$4,19 \pm 0,36^{**}$

Примечание. Здесь и в табл. 2: в числителе — содержание ГП, в знаменателе — содержание МДА; одна звездочка — $p < 0,05$, две — $p < 0,01$, три — $p < 0,001$ относительно контроля.

Животных разделили на 6 групп: 1-я группа — контрольные животные, которые находились на свободном пищевом и питьевом режимах. Животные 2, 3, 4, 5 и 6-й групп голодали в течение 1, 2, 3, 5 и 7 сут соответственно и находились на обычном питьевом режиме. После декапитации контрольных и голодающих крыс головной мозг быстро извлекали на холоду, отмывали от крови и выделяли различные структуры мозга: продолговатый и средний мозг, гипоталамус, лимбическую, сенсомоторную и орбитальную области коры. Фракцию неочищенных синапсом и митохондрий мозга получали путем дифференциального центрифугирования в ступенчатом градиенте плотности сахарозы [13]. Об интенсивности перекисного окисления липидов (ПОЛ) судили по изменению содержания ГП и МДА, определяемого по методу [7]. Общий белок определяли по методу [15]. Проводили статистическую обработку полученных данных.

Результаты и обсуждение. Полученные результаты показывают, что на 1—2-е сутки голодания в гомогенате исследованных структур и их синапсомальной и митохондриальной фракциях содержание основных продуктов ПОЛ существенно не изменялось (табл. 1 и 2). Видимо, в начальный период голодания комплекс антиоксидантных систем в нервных тканях, включающих некоторые ферменты (глутатионпероксидаза, глутатионредуктаза, каталаза, супероксиддисмутаза) и низкомолекулярные антиоксиданты (α -токоферол, глутатион, цистеин), эффективно контролируют интенсивность процесса ПОЛ. В пользу этого предположения говорит установленная нами [1] активация глутатионпероксидазы в гипоталамусе и корковых образованиях мозга на 1—2-е сутки голодания. Функциональная роль этого фермента заключается в том, что, разрушая токсичные гидроперекиси и защищая мембранные и немембранные компоненты клеток от вредного воздействия самих перекисей, глутатионпероксидаза тем самым предотвращает возможность их дальнейшего распада на свободные радикалы [14].

Начиная с 3-х суток голодания во всех изученных структурах мозга и их субфракциях

наблюдалась активация ПОЛ, особенно выраженная в гипоталамусе и корковых образованиях, которая интенсифицировалась до 7-х суток голодания. Из результатов видно, что на 3-е сутки голодания в продолговатом и среднем мозгу и его субфракциях по сравнению с корковыми образованиями накопилось значительно меньше продуктов ПОЛ, что, видимо, связано с активным вовлечением белковых SH-групп в процесс детоксикации ГП и МДА. Об этом свидетельствует выявленное нами [2] достоверное снижение содержания белковых SH-групп только в гомогенате продолговатого и среднего мозга на 3-и сутки голодания. В ходе длительного голодания в этих структурах мозга процент накопления МДА значительно превышал таковой ГП, в то время как в корковых образованиях наблюдалась обратная картина, связанная, по всей вероятности, с разными соотношениями анти- и прооксидантов и механизмами генерации ГП и МДА в исследованных образованиях. Максимальное повышение содержания ГП выявлено в сенсомоторной коре (на 78,9 %; $p < 0,001$) и ее митохондриальной (на 90,1 %; $p < 0,001$) и синапсомальной (на 81,4 %; $p < 0,001$) фракциях, а МДА — в продолговатом (на 61,6 %; $p < 0,001$) и среднем (на 59,7 %; $p < 0,001$) мозгу на 7-е сутки голодания животных. Следует упомянуть, что при гипоксических и гипероксических воздействиях на организм сильная активация ПОЛ также была обнаружена в сенсомоторной коре [3]. Результаты исследований показали, что интенсификация ПОЛ в митохондриях исследованных структур более выражена, чем в синапсомальных фракциях. Это связано, по-видимому, с тем, что при голодании ограничивается поступление субстратов окисления в митохондрии и, следовательно, количество молекулярного O_2 , утилизирующегося по оксигеназному пути восстановления (в физиологических условиях оно составляет 2 % от всего поступающего O_2), может увеличиваться по мере интенсификации ПОЛ. Согласно данным литературы [5, 16, 17], при длительном голодании животных в морфологически и функционально гетерогенных отделах мозга происходят существенные изменения физио-

Накопление ГП (в отн. ед.) и МДА (в нмоль на 1 мг белка) в митохондриях и синапсоммах различных отделов мозга крыс при голодании ($n=6-7$)

Группа животных	Продолговатый мозг		Средний мозг		Гипоталамус	
	митохондрии	синапсомы	митохондрии	синапсомы	митохондрии	синапсомы
Контроль	$1,82 \pm 0,15$	$1,51 \pm 0,12$	$1,73 \pm 0,13$	$1,48 \pm 0,11$	$1,66 \pm 0,12$	$2,16 \pm 0,15$
Срок голодания, сут:	$1,77 \pm 0,12$	$1,83 \pm 0,14$	$1,70 \pm 0,12$	$1,72 \pm 0,14$	$1,43 \pm 0,10$	$1,71 \pm 0,18$
2	$1,95 \pm 0,17$	$1,64 \pm 0,16$	$1,65 \pm 0,17$	$1,37 \pm 0,11$	$2,04 \pm 0,15$	$2,31 \pm 0,13$
	$1,79 \pm 0,15$	$1,75 \pm 0,13$	$1,78 \pm 0,16$	$1,68 \pm 0,15$	$1,52 \pm 0,13$	$1,78 \pm 0,14$
3	$1,75 \pm 0,19$	$1,56 \pm 0,15$	$1,82 \pm 0,15$	$1,53 \pm 0,16$	$1,78 \pm 0,14$	$2,38 \pm 0,17$
	$1,98 \pm 0,14$	$2,16 \pm 0,18$	$1,94 \pm 0,18$	$1,67 \pm 0,17$	$1,67 \pm 0,15$	$1,92 \pm 0,15$
5	$2,12 \pm 0,18$	$1,83 \pm 0,14$	$2,18 \pm 0,14^*$	$1,80 \pm 0,13$	$2,33 \pm 0,18^*$	$2,59 \pm 0,12^*$
	$2,27 \pm 0,17^*$	$2,20 \pm 0,17$	$2,27 \pm 0,12^{**}$	$2,17 \pm 0,13^*$	$2,01 \pm 0,17^*$	$2,37 \pm 0,18^*$
7	$2,33 \pm 0,15^*$	$1,97 \pm 0,14^*$	$2,28 \pm 0,13^*$	$1,91 \pm 0,16^*$	$2,68 \pm 0,16^{***}$	$3,21 \pm 0,24^{**}$
	$2,63 \pm 0,18^{**}$	$2,70 \pm 0,15^{**}$	$2,45 \pm 0,14^{**}$	$2,57 \pm 0,16^{**}$	$2,15 \pm 0,17^{**}$	$2,76 \pm 0,16^{***}$
	$2,58 \pm 0,21^*$	$2,24 \pm 0,18^{**}$	$2,55 \pm 0,17^{**}$	$2,30 \pm 0,14^{***}$	$2,87 \pm 0,17^{***}$	$3,60 \pm 0,1^{***}$
	$3,05 \pm 0,19^{***}$	$3,12 \pm 0,21^{***}$	$2,81 \pm 0,18^{***}$	$2,93 \pm 0,15^{***}$	$2,18 \pm 0,16^{**}$	$2,85 \pm 0,2^{***}$

Продолжение

Группа животных	Лямбическая кора		Сенсомоторная кора		Орбитальная кора	
	митохондрии	синапсомы	митохондрии	синапсомы	митохондрии	синапсомы
Контроль	$1,75 \pm 0,12$	$2,35 \pm 0,16$	$1,85 \pm 0,15$	$2,23 \pm 0,17$	$1,91 \pm 0,14$	$2,43 \pm 0,17$
Срок голодания, сут:	$1,40 \pm 0,11$	$1,64 \pm 0,15$	$1,48 \pm 0,13$	$1,62 \pm 0,13$	$1,42 \pm 0,11$	$1,58 \pm 0,12$
1	$2,18 \pm 0,17$	$2,48 \pm 0,15$	$1,97 \pm 0,18$	$2,36 \pm 0,15$	$2,12 \pm 0,17$	$2,42 \pm 0,18$
	$1,48 \pm 0,12$	$1,73 \pm 0,12$	$1,45 \pm 0,12$	$1,67 \pm 0,14$	$1,54 \pm 0,12$	$1,51 \pm 0,14$
2	$1,94 \pm 0,14$	$2,64 \pm 0,13$	$2,03 \pm 0,14$	$2,52 \pm 0,16$	$2,05 \pm 0,17$	$2,64 \pm 0,14$
	$1,58 \pm 0,12$	$1,71 \pm 0,14$	$1,54 \pm 0,09$	$1,74 \pm 0,14$	$1,56 \pm 0,17$	$1,73 \pm 0,16$
3	$2,41 \pm 0,16^{**}$	$3,07 \pm 0,15^{**}$	$2,62 \pm 0,15^{**}$	$3,09 \pm 0,16^{**}$	$2,66 \pm 0,18^{**}$	$3,19 \pm 0,21^*$
	$1,78 \pm 0,11^*$	$2,07 \pm 0,12^*$	$2,02 \pm 0,18^*$	$2,18 \pm 0,17^*$	$1,91 \pm 0,16^*$	$2,07 \pm 0,18^*$
5	$2,51 \pm 0,18^{**}$	$3,18 \pm 0,17^{**}$	$2,82 \pm 0,26^{**}$	$3,27 \pm 0,19^{**}$	$2,88 \pm 0,28^*$	$3,56 \pm 0,17^{***}$
	$2,03 \pm 0,16^{**}$	$2,35 \pm 0,16^{**}$	$2,08 \pm 0,17^*$	$2,37 \pm 0,18^{**}$	$1,93 \pm 0,15^*$	$2,20 \pm 0,15^*$
7	$2,93 \pm 0,17^{***}$	$3,73 \pm 0,16^{***}$	$3,82 \pm 0,26^{***}$	$4,27 \pm 0,19^{***}$	$3,32 \pm 0,21^{***}$	$4,07 \pm 0,25^{***}$
	$2,08 \pm 0,18^{**}$	$2,60 \pm 0,18^{**}$	$2,20 \pm 0,16^{**}$	$2,43 \pm 0,22^{**}$	$2,32 \pm 0,21^{***}$	$2,62 \pm 0,17^{***}$

логического, биохимического и морфоцитохимического характера. В механизме возникновения разнообразных нарушений структур и функции нервных клеток при голодании определенную роль могут играть свободнорадикальные метаболиты ($O_2^{\cdot-}$, NO^{\cdot} , липидные радикалы и др.), а также первичные и вторичные продукты ПОЛ. Известно, что вышеуказанные соединения изменяют подвижность липопротеинового комплекса мембранных образований [10], ферментативную активность Na^+ , K^+ -АТФазы и связанных с ней трансмембранных переносов ионов Na^+ , K^+ [8], повреждают структуры ДНК и белков [11], окисляют SH-группы белков и низкомолекулярных соединений [18].

Таким образом, на основании проведенных исследований можно заключить, что в 1—2-е сутки голодания в исследованных структурах мозга не происходит существенных изменений в содержании основных продуктов ПОЛ. Однако при длительном голодании (5-е и 7-е сутки) в корковых и подкорковых образованиях интенсифицируются процессы ПОЛ, видимо, в результате подавления системы антиоксидантной защиты [1], что приводит к накоплению в них в избыточном количестве МДА и ГП. Можно предположить, что в механизме повреждения структурных и

функциональных компонентов нервных клеток, имеющих место при длительном голодании, существенная роль принадлежит активации ПОЛ.

ЛИТЕРАТУРА

1. Алиев С. А., Керимов Б. Ф. // Азербайджанская респ. биохимическая конф., 1-я: Тезисы докладов.— Баку, 1990.— С. 24.
2. Аскеров Ф. Б., Керимов Б. Ф., Алиев С. А., Гасанова М. А. // Изв. АН Азерб. ССР.— 1988.— № 12.— С. 93—98.
3. Джафаров А. И., Магомедов И. М., Бабаев Х. Ф., Ахмедова Г. Ш. // Бюл. exper. биол.— 1989.— № 3.— С. 305—307.
4. Кравец С. В. // Физиол. журн.— 1985.— Т. 31, № 4.— С. 468—472.
5. Чагарели Э. Г. // Труды ин-та эксперим. морфологии АН Груз. ССР.— 1963.— Т. 11.— С. 51—59.
6. Agarwal K. N., Prasad C., Taneja V. // Ann. Nutr. Metab.— 1981.— Vol. 25, N 4.— P. 228—233.
7. Asakawa T., Matsushita S. // Lipids.— 1980.— Vol. 15, № 3.— P. 137—140.
8. Augustin W., Golberich F., Wiswedel I. et al. // FEBS Lett.— 1979.— Vol. 107.— P. 151—154.
9. Bets A. L. // J. Neurochem.— 1985.— Vol. 44.— P. 574—579.
10. Dobrelsov G. E., Borschevskaya T. A., Petrov V. A., Vladimirov Y. A. // FEBS Lett.— 1977.— Vol. 84.— P. 125—128.
11. Feher J., Cosmos G., Vereckei A. Free Radical Reactions in Medicine.— Berlin, 1987.
12. Forman H. J., Boveris A. // Free Radicals in Biology / Ed. W. A. Pryor.— New York, 1985.— Vol. 5.— P. 65—90.

13. Hajos F. // Brain Res.— 1985.— Vol. 93, N 3.— P. 485—489.
 14. Halliwell B., Gutteridge J. M. C. // Lancet.— 1984.— Vol. 1.— P. 1369—1397.
 15. Lowry O. H., Rosebrough N. J., Farr A. L., Randall R. J. // J. biol. Chem.— 1951.— Vol. 193.— P. 265—275.
 16. Norwin D., Wyrwika-Bray G. A. // Basic Mechanisms and Clinical Implications.— New York, 1976.— P. 250.
 17. Owen D. E., Morgan A. F., Kemp H. G. et al. // J. clin. Invest.— 1967.— Vol. 67, № 10.— P. 1589—1597.
 18. Tappel A. L. // Fed. Proc.— 1973.— Vol. 32.— P. 1870—1874.

Поступила 15.12.91

EFFECT OF STARVATION ON THE RATE OF LIPOPEROXIDATION IN SYNAPTOSOMAL AND MITOCHONDRIAL FRACTIONS OF VARIOUS BRAIN STRUCTURES.

A. M. Efendiev, B. F. Kerimov

N. Narimanov Azerbaijan Medical University, Baku.

Content of lipid hydroperoxides (LHP) and malonic dialdehyde (MDA) was measured in homogenates of rat brain cortex (limbic, sensorimotor and orbital cortex) and subcortex brain structures (hypothalamus, medulla oblongata, and midbrain) and in their synaptosomal and mitochondrial fractions within various periods of starvation 1, 2, 3, 5 and 7 days. Lipid peroxidation was shown to intensify distinctly in the brain regions studied especially in the sensorimotor cortex only after relatively long-term starvation during 5-7 days. The rate of lipid peroxidation was considerably higher in mitochondrial fractions of these brain structures studied than in the synaptosomes; high contents of LHP and MDA was found in mitochondria. Activation of lipid peroxidation appears to be distinctly responsible for impairment of the structure and functional components of nervous cells occurring during long-term starvation.

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 1994

УДК 616.13-004.6-07:616.153.1:577.152.311

М. А. Соловьева, И. Н. Горбачева,
 Г. А. Вихорева, Л. С. Гальбрайт,
 В. Е. Рыженков

ВЛИЯНИЕ СУЛЬФАТОВ ХИТОЗАНА НА АКТИВНОСТЬ ЛИПОПРОТЕИНАЗ

Институт экспериментальной медицины РАМН, Санкт-Петербург, Текстильный институт, Москва

Имеются данные о тормозящем действии гепарина на развитие атеросклеротических поражений аорты в эксперименте [10, 14, 20]. Было показано также, что внутривенное введение гепарина защищает эндотелиальные клетки сосудов от повреждающего действия свободными радикалами [6, 8]. Кроме того, гепарин предотвращает адгезию тромбоцитов к эндотелию [7], ингибирует проникновение в артериальную стенку холестерина (ХС) [21]. Одной из существенных сторон действия гепарина является повышение активности фермента липопротеинлипазы (ЛП-липазы), основная функция которой состоит в гидролизе триацилглицеридов (ТГ), содержащихся в атерогенных липопротеинах (ЛП) [12]. Эти свойства гепарина весьма ценны при некоторых нарушениях липидного обмена и атеросклерозе [6]. Однако выраженное антикоагулянтное действие гепарина, его быстрая инактивация, а также необходимость постоянного контроля за возможностью возникновения осложнений типа

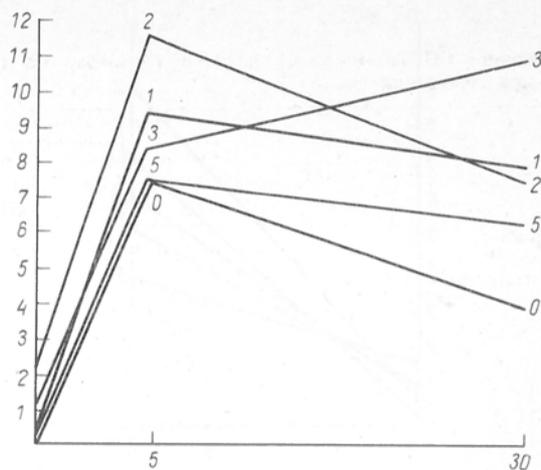


Рис. 1. Липолитическая активность сыворотки крови кроликов при введении гепарина внутривенно в дозе 1,5 мг/кг.

По оси абсцисс — время после введения, мин; по оси ординат — активность, мкмоль неэстерифицированных жирных кислот на 1 мл за 1 ч. 0 — контроль (введение перорально дистиллированной воды); 1 — введение гепарина перорально в дозе 50 мг/кг в течение 4 дней; 2, 3, 5 — введение CX-2, CX-3 и CX-5 в дозе 50 мг/кг в течение 4 дней.

остеопороза и тромбоцитопении при длительном использовании осложняют его широкое применение. В связи с этим повысился интерес к изысканию аналогов гепарина, лишенных его побочных эффектов.

В данной работе проведено сравнительное экспериментальное изучение эффективности отечественных сульфатов хитозана (СХ) во влиянии на общую липолитическую активность крови. Исследованные вещества получены сульфатированием хитозана хлорсульфоновой кислотой в среде органического растворителя [2].

Методика. Опыты проведены на 50 кроликах-самцах массой 3—3,5 кг, которым вводили внутривенно изученные СХ и гепарин в дозе 1,5 мг/кг однократно. Кровь получали через 5—7 мин после введения веществ и определяли общую липолитическую активность сыворотки крови по методу [19] с модификацией [3]. В другой серии опытов СХ и гепарин вводили перорально в дозе 50 мг/кг в течение 4 дней. В контрольной группе животным вводили равный объем растворителя. Затем через 5 и 30 мин после введения гепарина внутривенно в дозе 100 ЕД/кг получали постгепариновую сыворотку и определяли липолитическую активность. Полученные результаты обрабатывали методом вариационной статистики [1].

Результаты и обсуждение. Особенности химического состава изученных образцов СХ приведены в таблице.

Характеристики химического состава исследованных образцов СХ

Название препарата	Содержание серы, %	Содержание групп на 1 моль			Молекулярная масса · 10 ³ D
		O=SO ₃ Na	N=SO ₃ Na	N=COCH ₃	
Гепарин	12,5	0,75	0,50	0,0	15—25
CX-2	14,2	1,04	0,30	0,1	120
CX-3	13,3	1,00	0,20	0,1	60
CX-4	13,0	1,00	0,16	0,1	20
CX-5	11,7	1,18	0,00	0,8	20

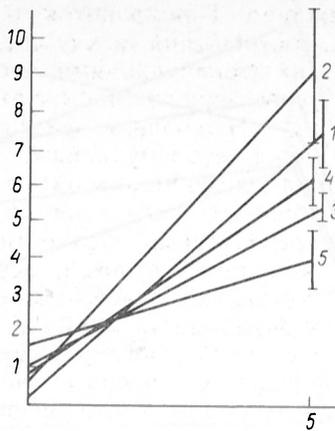


Рис. 2. Липолитическая активность постгепариновой сыворотки крови кроликов при введении гепарина (1) и СХ перорально в дозе 50 мг/кг в течение 4 дней.

4 — СХ-4. Остальные обозначения те же, что на рис. 1.

Как показали результаты (рис. 1), при внутривенном введении изученных СХ наблюдается активация липолитических ферментов. Из исследованных соединений наиболее активным был СХ-2 с мол. м. $120 \cdot 10^3$ D и степенью сульфатирования 1,34, который активировал ЛП-липазу более выражено, чем гепарин. Активность других веществ составляла 50—80 % от таковой гепарина. При этом в ряду СХ-3, СХ-4, СХ-5 с одинаковой суммарной степенью сульфатирования (~1,2 наименьшей активностью обладал СХ-5, содержащий N-ацетильные группы и не имеющий в своем составе N-сульфатных и свободных аминогрупп. Из двух СХ с одинаковыми функциональными группами несколько большую активность показал СХ-4 с меньшей молекулярной массой. Полученные результаты в определенной степени согласуются с данными литературы. Так, при изучении влияния различных производных хитозана, имеющих в своем составе N-ацетильные, O-карбокисильные, O, N-сульфатные группы, на липопротеинлипазную активность сыворотки крови кролика было показано, что увеличение молекулярной массы приводит к снижению этой активности. Однако одно из производных с большой молекулярной массой ($245 \cdot 10^3$ D), но имеющее в своем составе N-сульфатную группу, проявило активность, равную 70 % от активности гепарина [9]. Отмечено также, что наиболее активным был препарат, содержащий 14,1 % серы, а производные хитозана с содержанием серы от 8,9 до 12,2 % были недостаточно активными в стимуляции активности ЛП-липазы. Сопоставляя эти результаты с полученными нами данными, можно видеть, что для проявления активности этой группы веществ важна не только суммарная степень сульфатирования, но и наличие сульфатированных аминогрупп. Изученные нами соединения содержат от 20—35 % таких групп, что, очевидно, достаточно для активации фермента; при этом повышение активности соединений возможно при увеличении суммарной степени сульфатирования, так как при этом увеличивается содержание N-сульфатных групп. В то же время имеющиеся данные не позволяют сделать однозначный вывод о том,

как влияет измененная молекулярная масса СХ в интервале $(20—120) \cdot 10^3$ D на их активность.

В следующей серии опытов было изучено влияние СХ, вводимых животным перорально в дозе 50 мг/кг в течение 4 дней, на общую липолитическую активность постгепариновой плазмы крови. Полученные данные (рис. 2) показали, что и пероральное введение кроликам СХ сопровождается отчетливой стимуляцией ЛП-липазы. Так, если пероральное введение гепарина усиливает действие гепарина, введенного внутривенно, на 30 %, то при пероральном введении соединения СХ-2 липолитическая активность постгепариновой сыворотки возрастает на 60 %, а при введении СХ-3 — на 15 %. Следует отметить, что в норме максимум липолитической активности наблюдается через 5—7 мин после введения гепарина внутривенно, а через 30 мин она снижается почти в 2 раза [4]. При введении изученных нами СХ уровень липолитической активности сыворотки крови через 30 мин после внутривенного введения гепарина снизился незначительно, а при введении СХ-3 даже повысился в 1,5 раза. Таким образом, изученные новые СХ, введенные перорально, пролонгировали действие гепарина. В данной серии опытов наиболее активными оказались вещества с мол. м. $(60—120) \cdot 10^3$ D и степенью сульфатирования 1,2—1,35. На основании полученных результатов можно сделать заключение, что изученные СХ являются эффективными активаторами липолитических ферментов.

Гепариноидные вещества, такие, как низкомолекулярный гепарин, глюкуронилгликозаминогликансульфат, пентозанполисульфат и др., способны активировать ЛП-липазу, но их активность значительно ниже, чем у гепарина [5, 11, 13, 16—18]. Лишь хондроитинполисульфат (мол. м. $6 \cdot 10^3$ D, содержание серы 15 %), примененный в эксперименте в дозе 1 мг/кг внутривенно, проявил активность, сравнимую с действием гепарина [18, 22]. При пероральном введении хондроитинполисульфат повышал активность ЛП-липазы в плазме крови крыс в дозе 1 г/кг, а в дозе 100 мг/кг был неэффективен [18]. В клинике у больных атеросклерозом этот препарат снизил уровень ХС на 10—20 % и ТГ на 30 %; при этом значительно улучшилась ЭКГ, увеличилось время тромбообразования [15].

Выявленное в наших опытах увеличение общей липолитической активности сыворотки крови после введения СХ перорально и внутривенно позволяет считать их перспективными для возможного использования в клинике с целью профилактики и лечения атеросклероза.

ЛИТЕРАТУРА

1. Бельский М. Л. Элементы количественной оценки фармакологического эффекта.— Л., 1963.
2. Горбачева И. П., Скорикова Е. Е., Вихорева Г. А. и др. // Высокомолекул. соединения.— 1991.— № 9.— С. 17—19.
3. Солитернова И. Б., Пикуньчева Н. Г. // Вопр. мед. химии.— 1979.— № 2.— С. 204—209.
4. Солитернова И. Б., Пикуньчева Н. Г. // Там же.— 1982.— № 1.— С. 202—206.
5. Barrocliffe T. W., Gray E., Merton R. E. et al. // Thromb. Haemostas.— 1986.— Vol. 56.— P. 202—206.
6. Engelberg M. D. // Amer. Heart J.— 1980.— Vol. 99.— P. 359—372.

7. Essien E. M., Kinlough-Ralbone R., Moore S., Mustard Y. E. // *Thromb. Diathes. haemorr.* (Stuttg.).— 1975.— Bd 34.— S. 600—608.
8. Hiebert L. M., Li-min Liu // *Atherosclerosis*.— 1990.— Vol. 83.— P. 47—51.
9. Hirano S., Kinugawa J. // *Carbohydr. Res.*— 1986.— Vol. 150.— P. 295—297.
10. Horlick L., Duff L. G. // *Arch. Path.*— 1954.— Vol. 57.— P. 417—419.
11. Jagues L. B. // *Pharmacol. Rev.*— 1980.— Vol. 31.— P. 99—166.
12. Korn E. D. // *Meth. biochem. Anal.*— 1959.— Vol. 7.— P. 145—192.
13. Mejchart J. M., Erbe E. E., Eddy W. P. // et al. // *Atherosclerosis*.— 1986.— Vol. 62.— P. 151—158.
14. Meng H. C., Davis W. S. // *Arch. Path.*— 1955.— Vol. 60.— P. 276—280.
15. Nakazawa K., Murata K. // *International Symposium on Drugs Affecting Lipid Metabolism*, 5-th.— Milan, 1974.— P. 74—75.
16. Olivercon T., Begtsson G., Marklind S. E. et al. // *Fed. Proc.*— 1977.— Vol. 36.— P. 60—65.
17. Oriente P., Postaglione L. et al. // *Drugs Affecting Lipid Metabolism*.— Milan, 1980.— P. 30—36.
18. Radhakrishnamurthy B., Charma C. et al. // *Atherosclerosis*.— 1986.— Vol. 60.— P. 141—149.
19. Riley S. E., Robinson D. S. // *Biochim. biophys. Acta.*— 1974.— Vol. 369.— P. 371—386.
20. Seuter F. // *Z. Kardiol.*— 1989.— Bd 78, Suppl. 6.— S. 117—119.
21. Shang Xueyuan, Huang Wenxing // *Ahandong Yike Daxue Xiebao*.— 1987.— Vol. 25.— P. 29—33.
22. Yosuka S., Tobiume K., Tsubara E. et al. // *Tokushina J. exp. Med.*— 1974.— Vol. 21.— P. 25—35.

Поступила 26.05.92

EFFECT OF CHITOSAN SULFATES ON LIPOPROTEIN LIPASE ACTIVITY.

M. A. Solovyeva, I. N. Gorbacheva, G. A. Vikhoreva, L. S. Galbraich, V. E. Ryzhnikov

Institute of Experimental Medicine, Russian Academy of Medical Sciences, St. Petersburg; Institute of Textile, Moscow.

Effect of commercially available preparations of chitosan sulfate on the total lipolytic activity was studied in rabbit blood. Chitosan sulfates, administered per os or intravenously, proved to be highly effective activators of lipolytic enzymes. The most distinct efficiency exhibited preparations with molecular mass of $60 \cdot 120 \cdot 10^4$ and the rate of sulfatation 1.20-1.35. After administration of the chitosan sulfates into hyperlipidemic rats a decrease in blood plasma VLDL and increased HDL content were observed.

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 1994

УДК 616.341-018.73-008.6-092:612.017.1]-07

И. Р. Бияшева, М. А. Алдиярова,
Т. И. Лоранская, В. В. Пустовойтов,
А. В. Васильев

СИСТЕМА МЕСТНОГО ГУМОРАЛЬНОГО ИММУНИТЕТА У БОЛЬНЫХ С СИНДРОМОМ НАРУШЕННОГО ВСАСЫВАНИЯ

Институт питания РАМН, Москва

Иммунные механизмы слизистой оболочки тонкой кишки составляют важную часть реакции организма на паразитарные, бактериальные и вирусные инфекции, индуцирующие аллергические и аутоиммунные повреждения. Локальные поражения тонкой кишки, возникающие в связи с постгастрорезекционным синдромом, проявляются изменениями функциональных свойств иммунокомпетентных клеток, выраженными в изменении общего числа и функциональных свойств фаго-

цитов, содержания Т-лимфоцитов в периферической крови, соотношения между числом Т- и В-лимфоцитов и их субпопуляциями, опосредующие хелперную, супрессорную и цитотоксическую функции [2, 5]. Нарушения физиологического соотношения между субпопуляциями лимфоцитов в тонкой кишке под действием антигенов, происходящие в мембране, сопровождаются активацией связанных с рецепторами ферментных систем, изменением липидного матрикса, перемещением ионов, воздействующих на клеточный метаболизм, повышением проницаемости мембран клеток. Изменяется активность лизосомальных гидролаз, циклаз, регулирующих уровень циклических нуклеотидов, определяющих соотношение пролиферативных и дифференцировочных процессов [8].

В то же время значительно меньше сведений о состоянии местного гуморального иммунитета при синдроме нарушенного всасывания (СВН), развивающегося как следствие резекции желудка или тонкой кишки и обусловленного выраженностью локального воспалительного процесса, состоянием анастомоза. Целью настоящей работы явилось сравнительное исследование содержания ряда белковых компонентов сыворотки и местного желудочного и дуоденального содержимого у больных, перенесших резекцию желудка.

Методика. Под наблюдением находилось 12 больных в возрасте до 55 лет, перенесших резекцию антрального отдела желудка, с признаками хронического энтерита, анастомозита, гастрита культи желудка. Исследования проводили на базе гастроэнтерологического отделения клиники лечебного питания Института питания РАМН. Контрольную группу составили больные с признаками хронического гастрита, не подвергавшиеся оперативному вмешательству. Диагноз устанавливали на основании данных анамнеза и результатов общепринятых лабораторных, рентгенологических, эндоскопических исследований.

Сыворотку для исследований получали из крови, взятой из локтевой вены натощак, путем центрифугирования при 3000 об/мин в течение 10 мин. Содержимое культи желудка и двенадцатиперстной кишки получали гибким зондом натощак, еюнальные смывы — также с помощью зонда во время эндоскопического исследования с использованием физиологического раствора, центрифугировали при 2000 об/мин в течение 10 мин. Супернатант исследовали на иммунохимическом анализаторе ICS-II фирмы «Beckman» методом кинетической нефелометрии с использованием набора стандартных антител. Иммунная реакция происходила в присутствии фосфатного буфера при взаимодействии равных объемов (1:2, в мкл) сыворотки крови (содержимого) и раствора стандартного антитела.

Результаты и обсуждение. Исходя из поставленной цели нами было исследовано содержание IgA, IgM, IgG, C3, C4 компонентов комплемента, пропердинового фактора В, кислого гликопротеина, α_1 -антитрипсина (α_1 -АТ), трансферрина и церулоплазмينا (см. таблицу). Следует отметить, что концентрации сывороточных функциональных белков у больных, перенесших резекцию желудка, практически не от-

Характеристика белкового состава сыворотки крови, тощакового содержимого желудка и дуоденального содержимого у больных с синдромом нарушенного всасывания

Исследуемый показатель, мг/100 мл	Контрольная группа (15)	Больные с резекцией желудка (12)	Отличия от нормы, %
Сыворотка:			
кислый гликопротеин	58,5±4,7	53,2±4,1	-8
α ₂ -макроглобулин	179,1±12,4	178,2±8,2	-0,06
α ₁ -АТ	113,5±10,5	128,5±5,9	+13
церулоплазмин	31,5±1,0	28,7±1,9	-9
трансферрин	307,5±11,5	392,3±40,7	+28
гантоглобин	101,0±10,6	117,4±10,3	+17
СЗ	143,2±8,1	120,6±7,2	-16
IgA	232,1±18,7	222,6±28,0	-4
IgG	1328±126	1245±54	-6
IgM	167,2±22,5	176,2±20,0	+5
пропердиновый фактор В	50,9±2,1	25,9±1,5	-49
альбумин	48,7±1,2	51,3±1,6	+5
Тощаковое содержимое желудка:			
кислый гликопротеин	0,220±0,023	0,443±0,160	+101
α ₂ -макроглобулин	—	—	—
α ₁ -АТ	1,157±0,256	2,271±1,025	+96
церулоплазмин	0,084±0,012	0,308±0,135	+267
трансферрин	0,154±0,031	0,214±0,051	+39
гантоглобин	—	—	—
СЗ	0,459±0,068	1,02±0,193	+122
IgA	3,880±1,588	5,876±2,30	+151
IgG	2,466±0,690	9,57±5,09	+288
IgM	1,664±0,271	1,319±0,378	-21
пропердиновый фактор В	0,276±0,028	0,251±0,042	-9
альбумин	0,211±0,059	0,526±0,144	+149
Дуоденальное содержимое:			
кислый гликопротеин	0,253±0,052	0,437±0,201	+73
α ₂ -макроглобулин	—	—	—
α ₁ -АТ	0,770±0,085	1,116±0,25	+45
церулоплазмин	0,115±0,02	0,094±0,011	-18
трансферрин	0,151±0,031	0,163±0,04	+8
гантоглобин	—	—	—
СЗ	0,533±0,088	0,700±0,094	+31
IgA	1,394±0,341	2,133±0,774	+53
IgG	1,001±0,086	4,716±1,974	+371
IgM	1,226±0,223	1,099±0,246	-10
пропердиновый фактор В	0,288±0,025	1,971±0,727*	+584
альбумин	0,069±0,024	0,338±0,085*	+390

Примечание. Звездочка — $p < 0,05$. В скобках — число обследованных.

личались от контроля. В то же время отмечалось резкое (по сравнению с нормой) увеличение концентрации IgA и IgG в тощаковом содержимом желудка на 51 и 188 % и тонкой кишки — на 53 и 371 % соответственно. Помимо этого, выявлена и местная активация системы комплемента, выражающаяся в повышении уровня СЗ комплемента в содержимом желудка и тонкой кишки на 122 и 31 % соответственно. Активация факторов местного иммунитета при развитии (СНВ) как следствия постгастрорезекционных расстройств преимущественно за счет IgG связана, по-видимому, с мобилизацией активности противобактериальных и противовирусных антител [3, 4]. Активация факторов комплемента объясняется, очевидно, биологической способностью IgG фиксировать комплемент при вторичном иммунном ответе. Следует отметить, что одним из отличительных показателей при данной патологии явилось повышение в содержимом желудка и двенадцатиперстной кишки уровня α₁-АТ на 96 и 45 % соответственно. Процесс взаимодействия молекулы IgG с рецепторами антигена сопровождается активацией лизосомальных ферментов и увеличением интенсивности фагоцитоза [6]. α₁-АТ, являясь ингибитором протеиназ, индуцирует локальный воспалительный процесс в зоне анастомоза, а также усиление образования IgA- и IgG-содержащих

иммунных комплексов [1, 7]. Повышение содержания антител группы IgA при СНВ обусловлено также действием экзогенных антигенов и способствует выведению их в интактной форме. Таким образом, иммунные реакции, опосредованные IgA и IgG, с участием лимфоцитов и макрофагов имеют патогенетическое значение при развитии СНВ.

Достоверное увеличение содержания альбумина и пропердинового фактора В в дуоденальном содержимом, по-видимому, является следствием послеоперационного анастомозита, восстановительно-некротических процессов, инфильтрации стромы, функциональных расстройств.

Иммунологическая перестройка организма больных, перенесших резекцию желудка, выражающаяся в активации факторов местного гуморального иммунитета в зоне послеоперационного анастомоза, по всей вероятности, связана с индукцией изменений стромы тонкой кишки воспалительного характера, повышением ее чувствительности к воздействию повреждающих агентов. Поскольку при исследовании функциональных белковых показателей сыворотки крови больных нами не было обнаружено достоверных различий в их содержании, что, по-видимому, обусловлено компенсаторной мобилизацией, направленной на сохранение белкового гомеостаза, роль исследования содержимого же-

лудочно-кишечного тракта приобретает особую значимость. Полученные результаты свидетельствуют о целесообразности исследования различных функциональных белковых показателей гастродуоденального содержимого, что может служить одной из основ дифференцированного подхода к оценке генеза заболевания, клинического состояния больных, страдающих СНВ, активности воспалительного процесса в зоне послеоперационного анастомоза.

ЛИТЕРАТУРА

1. Клиническая оценка лабораторных тестов / Под ред. Н. У. Тица.— М., 1986.
2. Логинов А. С., Царегородцева Т. М., Зотина М. М. Иммунная система и болезни органов пищеварения.— М., 1986.
3. Малов Ю. С. // Врач. дело.— 1990.— № 1.— С. 19—22.
4. Островский А. Б., Николаева О. В., Исакова В. Н. // Тер. арх.— 1988.— № 12.— С. 70—71.
5. Nossal G. J. // Amer. J. Anat.— 1984.— Vol. 170, N 3.— P. 253—259.
6. Odeggard S., Borkie B., Skagen D. et al. // Scand. J. Gastroent.— 1986.— Vol. 21, N 10.— P. 1257—1264.
7. Pongraew P., Sehlep F.-P., Vudlvivai N. et al. // Nutr. Res.— 1988.— Vol. 8, N 11.— P. 1213—1221.
8. Wu K. C., Mahida Y. R., Priddle J. D. et al. // Clin. exp. Immunol.— 1989.— Vol. 78, N 1.— P. 37—41.

Поступила 05.06.93

THE SYSTEM OF LOCAL HUMORAL IMMUNITY IN PATIENTS WITH MALABSORPTION SYNDROME.

[I. R. Biyasheva], M. Aldiyarova, T. I. Loranskaya, V. V. Pustovoirov, A. V. Vasiljev

Institute of Nutrition, Russian Academy of Medical Sciences, Moscow.

Content of IgA, IgG, IgM, C₃ and C₄ components of complement, properdin factor B, acid glycoprotein, α₁-antitrypsin, transferrin and ceruloplasmin were studied using immunochemical procedures in blood serum, gastric and duodenal contents of healthy persons and of patients after stomach resection. In patients with symptoms of malabsorption concentration of IgA and IgG was drastically increased in gastric and duodenal contents by 51% and 188%, respectively, and by 53% and 371%, respectively. Local activation of the complement system was also observed, which involved an increase of C₃ component in stomach and small intestine by 122% and 31%, respectively. As a result of postoperative anastomosis content of albumin and the properdin factor B was distinctly increased in the duodenum. The data obtained suggest that studies of various functional proteins in gastric and duodenal contents are recommended for evaluation of a disease genesis as well as for diagnosis of acute local inflammation.

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 1994

УДК 616.342-002.44 + 616.12-008.331.1 + 616.127-005.41-07:616-008.93:577.161/.169

В. М. Коденцова, О. А. Вржесинская,
Л. А. Харитончик, В. Б. Спиричев

ОБМЕН ВИТАМИНОВ ГРУППЫ В ПРИ ЯЗВЕННОЙ БОЛЕЗНИ ДВЕНАДАТИПЕРСТНОЙ КИШКИ, ГИПЕРТОНИЧЕСКОЙ БОЛЕЗНИ И ИШЕМИЧЕСКОЙ БОЛЕЗНИ СЕРДЦА

Институт питания РАМН, Москва

Нарушение обмена витаминов сопровождается ряд заболеваний (сахарный диабет, сердечно-сосудистые заболевания) и отягощает их течение

[7, 8, 12]. Исследованию особенностей обмена витаминов при различных заболеваниях посвящены многочисленные работы [8, 12]. Как правило, эти исследования основаны на сопоставлении величины экскреции витаминов и их содержания в крови у здоровых и больных людей, получающих одинаковый рацион в течение 3—4 нед [8]. Существенный недостаток этих исследований заключается в том, что часто не учитываются исходная обеспеченность данным витамином, а также взаимовлияние витаминов, проявляющееся, например, в том, что экскреция 4-пиродоксиловой кислоты (4-ПК) может снижаться не только вследствие алиментарного дефицита витамина В₆, но и, как показано в нашей лаборатории, при недостаточности рибофлавина [3]. Кроме того, зачастую используются неспецифические аналитические методы, что в значительной мере затрудняет трактовку получаемых результатов.

В нашей работе по характеристике обмена витаминов группы В у больных язвенной болезнью двенадцатиперстной кишки, гипертонической болезнью II степени и ишемической болезнью сердца (ИБС) были использованы два приема: способ, основанный на исследовании кривых зависимости экскреции витамина от его содержания в крови [13], и изучение зависимости этих показателей от содержания соответствующего витамина в рационе. При этом предполагалось на основании сравнения кривых зависимости экскреции рибофлавина, 4-ПК, 1-метилникотинамида (1-МНА) и тиаминотриамина от концентрации соответствующих витаминов и их коферментных форм в плазме крови, полученных у больных и здоровых взрослых с различной обеспеченностью витамином В₂, оценить особенности обмена витаминов группы В при данных заболеваниях. Указанные подходы, примененные нами ранее при обследовании больных сахарным диабетом, позволяют исключить влияние различной исходной витаминной обеспеченности и выявить особенности обмена, непосредственно обусловленные тем или иным патологическим процессом.

Методика. Было обследовано 35 здоровых людей, 17 больных язвенной болезнью двенадцатиперстной кишки, 20 больных гипертонической болезнью II степени и 10 больных ИБС в возрасте от 18 до 50 лет. Обследование проводили дважды. Первое обследование проводили через 1 нед после поступления в клинику лечебного питания Института питания РАМН. В течение 3 нед между первым и вторым обследованием больные язвенной болезнью и ИБС ежедневно получали по 2 драже поливитаминного препарата «Ундевит» (что обеспечивало дополнительное поступление 4 мг тиаминотриамина, 4 мг рибофлавина, 6 мг пиридоксина и 20 мг никотинамида) или по 1 таблетке витамина и 1 таблетке с минералами комплексного препарата «Дуовит» (1 мг тиаминотриамина, 1,2 мг рибофлавина, 2 мг пиридоксина, 13 мг никотинамида).

Больные гипертонией на фоне рациона клиники и здоровые добровольцы на фоне обычного питания в домашних условиях в течение 4 нед ежедневно получали по 80 г булочки «Здоровье», обогащенной витаминами (в мг на 100 г): тиамин

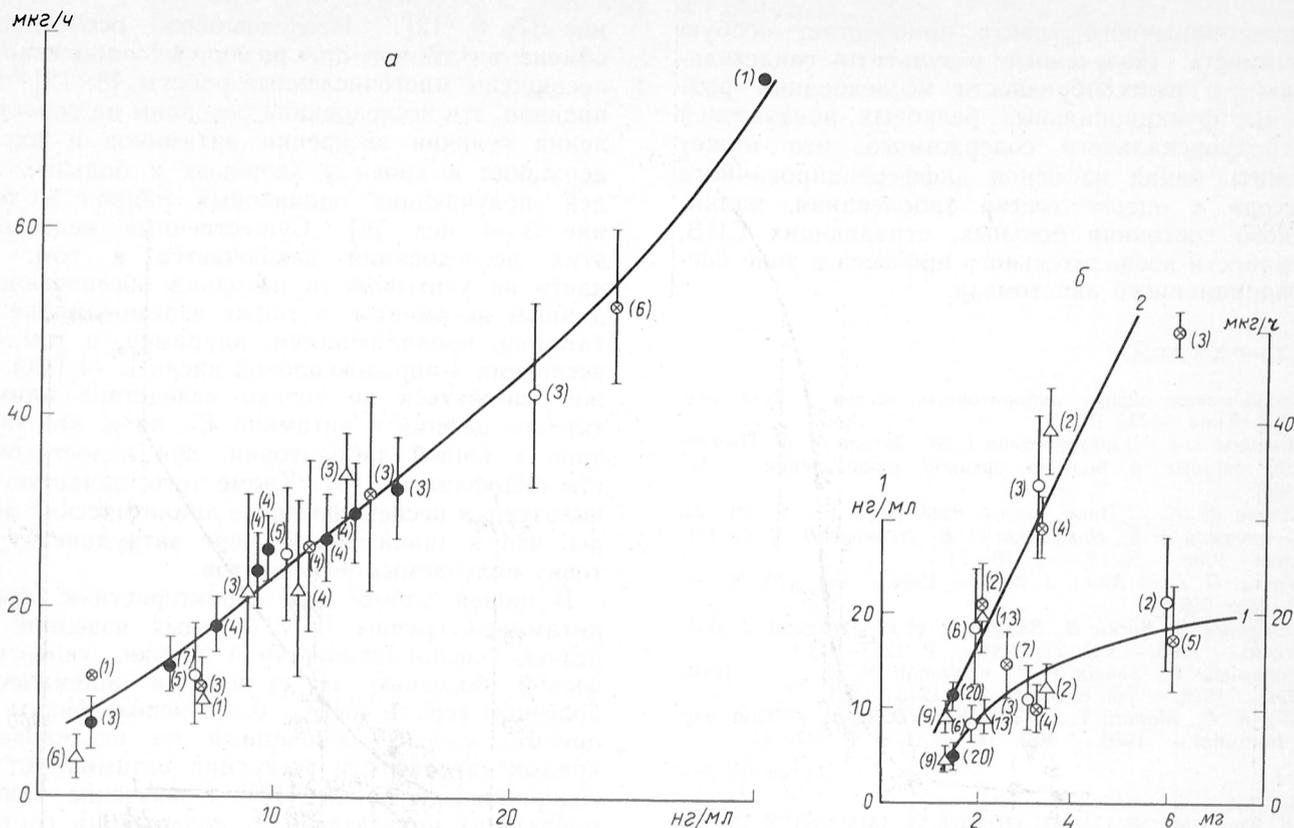


Рис. 1. Зависимость между показателями обеспеченности организма витамином В₂.

a — часовой экскреции рибофлавина (в мкг/ч) от его концентрации в плазме (в нг/мл); *б* — концентрации в плазме (в нг/мл, кривая 1) и экскреции с мочой (в мкг/ч, кривая 2) от содержания рибофлавина (в мг) в рационе. Здесь и на рис. 2—4 в скобках рядом с точкой указано число обследованных; темные точки — здоровые, светлые — больные язвенной болезнью, светлые с крестиком — больные ИБС, треугольники — больные гипертонической болезнью.

и рибофлавии — 0,29, ниацин — 1,46, пиридоксин — 0,7, β-каротин — 0,56, 200 мл напитка «Абрикос», содержащего (в мг на 100 г) витамин С — 25 и β-каротин — 0,35, 25 г бутербродного сливочного масла, обогащенного витамином А (0,25 мг).

Обеспеченность витаминами оценивали по их экскреции с мочой, собранной за 1 ч натощак, и концентрации этих витаминов в плазме.

Содержание рибофлавина в моче и плазме крови определяли титрованием рибофлавинсвязывающим апопротеином [4, 5], 4-ПК — с помощью высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ) [1], 1-МНА — флуоресцентным методом [6], тиамина — тиохромным методом [9]. Концентрацию пиридоксальных коферментов в плазме крови измеряли методом ВЭЖХ [15], содержание окисленных никотинамидных коферментов в эритроцитах крови — флуоресцентным методом [6]. Во всех флуоресцентных методах использовали соответствующий внутренний стандарт. Интенсивность флуоресценции измеряли на спектрофлуориметре «Perkin Elmer MPF-43A».

Активность транскетолазы эритроцитов и величину ТДФ-эффекта в качестве показателей обеспеченности обследуемых тиаминном определяли после предварительной интактивации трансальдолазы [14].

Коэффициент ранговой корреляции между содержанием витаминов в крови и экскрецией их с мочой рассчитывали по Спирмену [2].

Содержание витаминов в рационах рассчитывали с использованием таблиц химического состава пищевых продуктов [11].

Результаты и обсуждение. Для анализа полученных данных близкие по величине значения концентрации рибофлавина в плазме объединяли в группы и для каждой образованной группы рассчитывали среднее значение экскреции этого витамина. Как следует из рис. 1, *a*, через всю совокупность экспериментальных точек для больных и здоровых людей может быть проведена одна кривая. Это можно рассматривать как свидетельство в пользу того, что метаболизм витамина В₂ при рассматриваемых заболеваниях не отличается от такового у здоровых людей. Статистически значимые величины коэффициентов ранговой корреляции Спирмена

Коэффициенты корреляции между показателями обеспеченности витаминами группы В взрослых людей

Параметр	r	n	p
Рибофлавин в плазме — экскреция рибофлавина с мочой:			
здоровые	0,603	35	≤ 0,01
язвенная болезнь	0,806	17	≤ 0,01
ИБС	0,539	10	≤ 0,05
гипертония	0,818	20	≤ 0,01
ПАЛ — ПАЛФ в плазме — экскреция 4-ПК с мочой:			
здоровые	0,511	20	≤ 0,01
язвенная болезнь	0,718	11	≤ 0,01

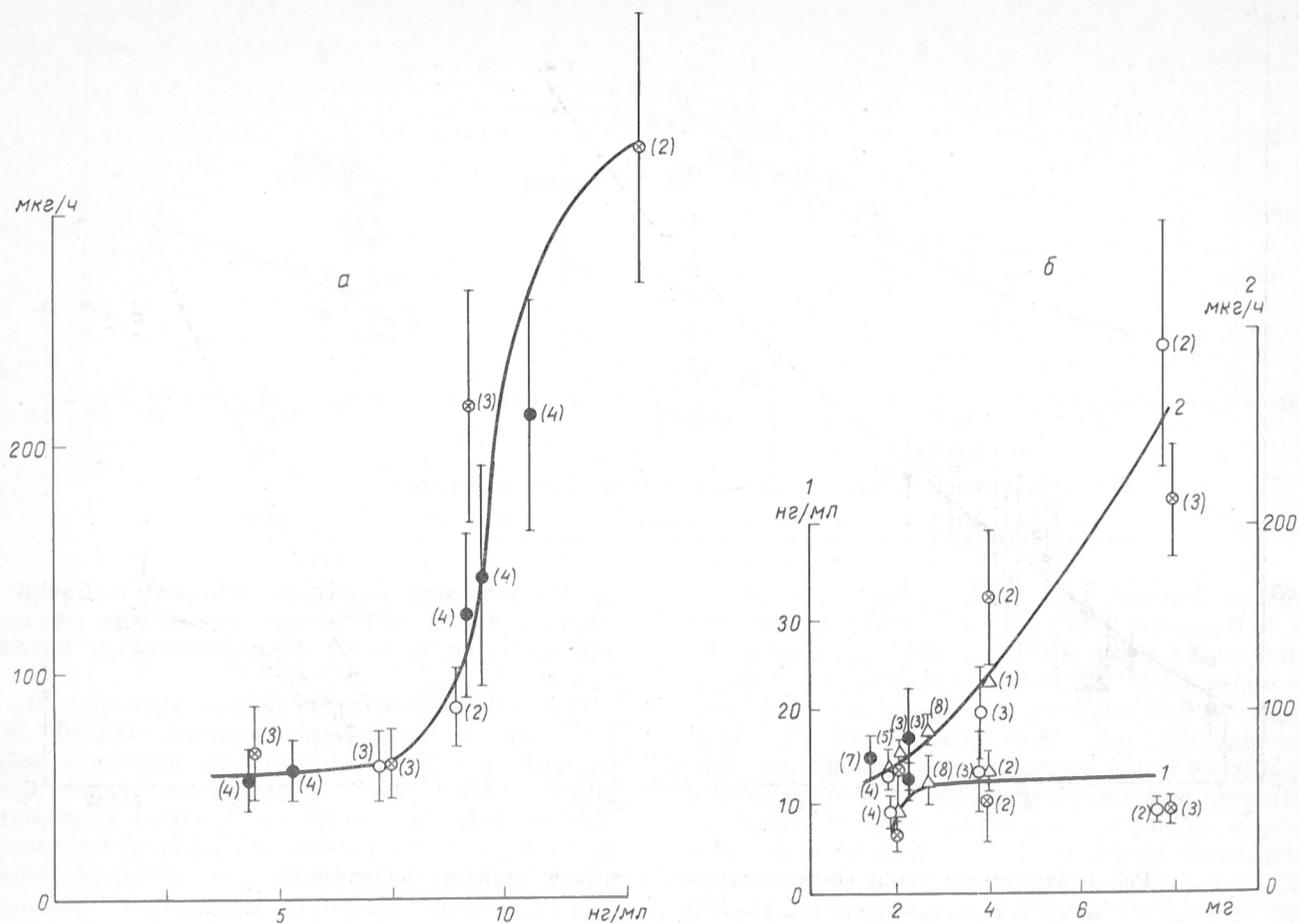


Рис. 2. Зависимость между показателями обеспеченности витамином B_6 .

a — часовой экскреции 4-ПК (в мкг/ч) от концентрации ПАЛФ (в нг/мл) в плазме крови; *б* — концентрации ПАЛФ в плазме (1) и экскреции с мочой 4-ПК (2) от содержания витамина B_6 (в мг) в рационе.

[2], представленные в таблице, так же, как и для здоровых людей [5], отражают наличие выраженной взаимозависимости между содержанием рибофлавина в плазме крови и его экскрецией с мочой при данных заболеваниях. Это означает, что величины экскреции, соответствующие нормальной обеспеченности этим витамином организма больных ИБС, язвенной и гипертонической болезнями, не отличаются от критериев, принятых для здоровых людей.

Дополнительным подтверждением этого вывода может служить исследование зависимости содержания рибофлавина в плазме крови и экскреции его с мочой от содержания витамина B_2 в рационе (рис. 1, б). И в этом случае все экспериментальные точки ложатся на одну кривую. Кривая зависимости концентрации рибофлавина в плазме крови от уровня его потребления, общая для всех заболеваний и для здоровых людей, может быть охарактеризована как кривая насыщения. При потреблении около 1,8—2 мг витамина B_2 в день (рекомендуемое суточное потребление [10]) концентрация рибофлавина в плазме превосходит нижнюю границу нормы и составляет около 7—9 нг/мл, его часовая экскреция при этом составляет 14—17 мкг. Увеличение потребления этого витамина сопровождается постепенно замедляющимся возрастанием его концентрации в плазме при резком увеличении экскреции избытка рибофлавина.

Ранее нами было показано [3], что дефицит рибофлавина в рационе крыс даже при нормальном содержании в нем пиридоксина и никотиновой кислоты сопровождается существенным (на 50—75 %) снижением экскреции с мочой 4-ПК и 1-МНА. Недостаточность витамина B_6 при нормальном содержании в пище никотиновой кислоты также приводит к снижению выделения 1-МНА. Это обусловлено участием витамина B_2 и ПАЛФ-зависимых ферментов в метаболизме пиридоксина и синтезе никотинамидных коферментов из триптофана. Аналогичное снижение экскреций 4-ПК и 1-МНА с мочой в результате недостаточности рибофлавина было обнаружено у людей. С учетом этого при изучении зависимости экскреции с мочой 4-ПК от содержания пиридоксалевого кофермента в плазме крови и этих параметров от содержания витамина B_6 в рационе принимали во внимание только показатели людей, адекватно обеспеченных витамином B_2 (концентрация рибофлавина в плазме более 6 нг/мл). При изучении аналогичной зависимости для ниацина анализировали показатели людей с нормальной обеспеченностью витаминами B_2 и B_6 (концентрация ПАЛФ в плазме крови более 8 нг/мл, экскреция 4-ПК выше 60 мкг/ч).

Исследование зависимости экскреции 4-ПК и 1-МНА от концентрации в крови ПАЛФ и НАД+НАДФ в эритроцитах (рис. 2, а, рис. 3, а)

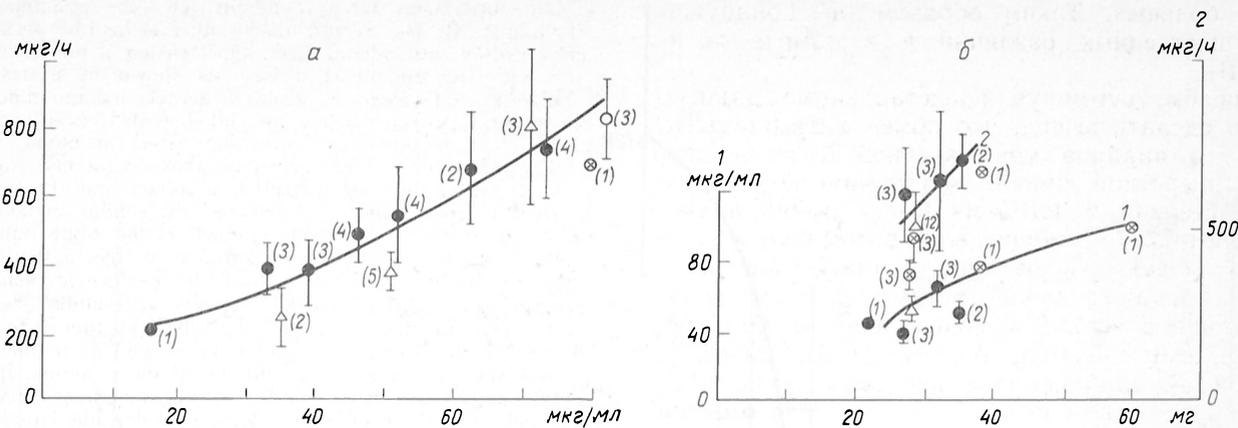


Рис. 3. Зависимость между показателями обеспеченности ниацином.

а — экскреции 1-МНА с мочой (в мкг/ч) от концентрации ПАД+ПАДФ (в мкг на 1 мл эритроцитов); б — концентрации ПАД+ПАДФ (1) и экскреции 1-МНА (2) от содержания в рационе ниацина (в мг).

показало полное совпадение кривых для здоровых и больных. Это свидетельствует о том, что величины экскреции 4-ПК и 1-МНА, соответствующие нормальной обеспеченности, при этих заболеваниях не отличаются от критериев для здорового организма. Этот вывод получил подтверждение и при исследовании зависимости концентрации коферментных форм этих витаминов в крови и экскреции их метаболитов с мочой от содержания витамина В₆ и ниацина в рационе (рис. 3, б, рис. 4, б). При содержании в рационе около 2 мг витамина В₆ содержание ПАЛФ составляет около 8 нг на 1 мл плазмы, а часовая экскреция 4-ПК — 60 мкг. При язвенной болезни выявлена выраженная ранговая корреляция между содержанием в плазме ПАЛФ и экскрецией 4-ПК. При других заболеваниях и в случае ниацина провести корреляционный анализ между содержанием витаминов в крови и экскре-

цией соответствующего метаболита с мочой не удалось ввиду небольшого количества обследованных с нормальной обеспеченностью витамином В₆.

При увеличении потребления витамина В₆ до 4—7 мг в сутки концентрация ПАЛФ возрастает в 1,5 раза, достигая плато, а выведение 4-ПК резко повышается (рис. 2, б). При потреблении ниацина, близком к рекомендуемому [10], содержание НАД+НАДФ в эритроцитах близко к принятому в качестве нормы для здоровых людей и составляет приблизительно 40 мкг/мл. Увеличение содержания в рационе ниацина сопровождается повышением содержания никотинамидных коферментов в эритроцитах и выведения 1-МНА (см. рис. 3, б).

Зависимость экскреции тиамина от величины ТДФ-эффекта при язвенной болезни двенадцатиперстной кишки не отличается от таковой для здоровых людей (рис. 4, а). При потреблении около 2 мг витамина В₁ в сутки величина ТДФ-эффекта составляет приблизительно 1,10, что свидетельствует о полной насыщенности транскетотазы ТДФ. Увеличение потребления витамина В₁ приводит к повышению его экскреции более чем в 2 раза для всех обследованных кате-

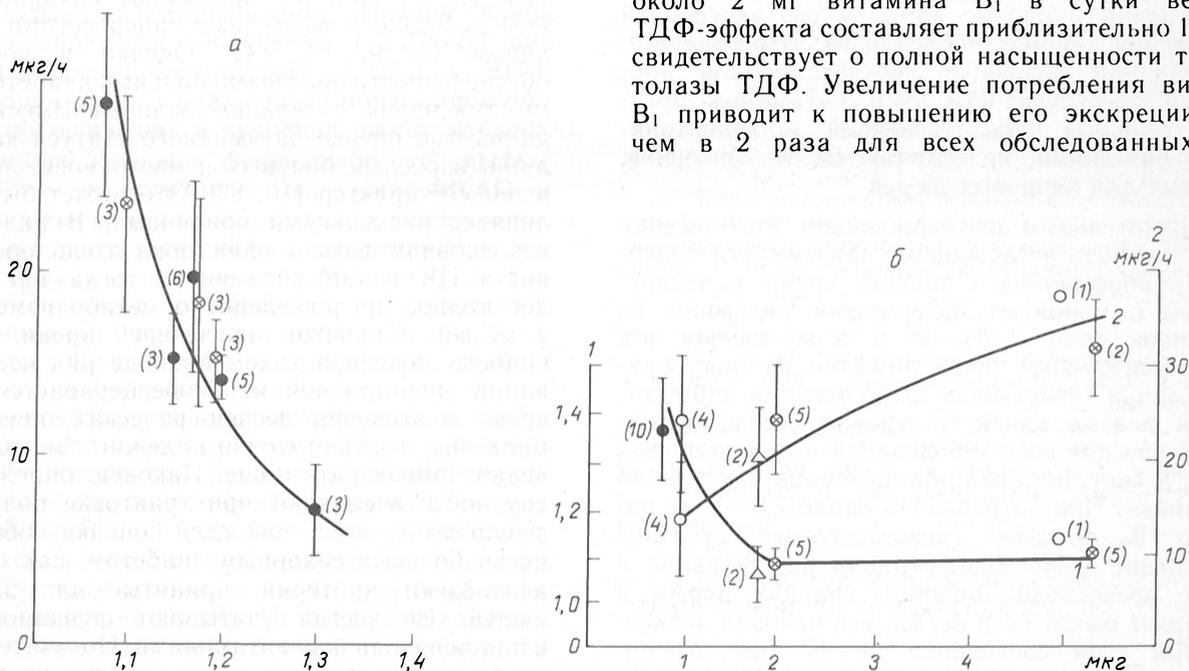


Рис. 4. Зависимость между показателями обеспеченности витамином В₁.

а — величиной ТДФ-эффекта и экскрецией тиамина с мочой (в мкг/ч); б — величиной ТДФ-эффекта и экскреции тиамина с мочой (в мкг/ч) от содержания в рационе витамина В₁ (в мг).

горий больных. Таким образом, не обнаружено существенных различий и в обмене витамина В₁.

В целом, суммируя представленные данные, можно сделать вывод, что обмен витаминов В₁, В₂, В₆ и ниацина при язвенной болезни двенадцатиперстной кишки, гипертонической болезни II степени и ИБС не имеет принципиальных отличий от обмена этих витаминов у здоровых людей. Совпадение кривых зависимости экскреции с мочой витамина от его концентрации в крови и содержания в рационе, по-видимому, свидетельствует, с одной стороны, об одинаковой потребности в витаминах группы В, а с другой стороны, о том, что для оценки обеспеченности витаминами больных с указанными заболеваниями применимы критерии, принятые для здоровых. Описанные в литературе [8] различия в обмене витаминов при этих заболеваниях могут быть обусловлены не самим патологическим процессом, а различиями питания и недостаточным содержанием витаминов в рационе больных, использованием неспецифических методов определения витаминов, а также тем, что не учитывалась исходная обеспеченность витамином В₂, дефицит которого приводит к существенным нарушениям метаболизма витамина В₆ и ниацина.

ЛИТЕРАТУРА

1. Бекетова Н. А., Вржесинская О. А., Коденцова В. М. и др. // Вопр. питания.— 1992.— № 4.— С. 67—69.
2. Гублер Е. В., Генкин А. А. Применение непараметрических критериев статистики в медико-биологических исследованиях.— Л., 1973.
3. Коденцова В. М. // Вопр. мед. химии.— 1992.— № 4.— С. 33—37.
4. Коденцова В. М., Алексеева И. А., Сокольников А. А. и др. // Вопр. питания.— 1991.— № 3.— С. 59—64.
5. Коденцова В. М., Вржесинская О. А., Алексеева И. А., Спиричев В. Б. // Вопр. мед. химии.— 1991.— № 5.— С. 76—79.
6. Коденцова В. М., Вржесинская О. А., Сокольников А. А. и др. // Вопр. питания.— 1992.— № 2.— С. 62—67.
7. Коденцова В. М., Алексеева И. А., Спиричев В. Б. // Укр. биохим. журн.— 1992.— № 4.— С. 105—108.
8. Межвитаминные отношения при ишемической болезни сердца и гипертонической болезни / Борец В. М., Мирончик В. В., Артаев Л. П. и др.— Минск, 1988.
9. Методы оценки витаминной обеспеченности населения.— М., 1987.
10. Нормы физиологических потребностей в пищевых веществах и энергии для различных групп населения СССР.— М., 1991.
11. Химический состав пищевых продуктов.— М., 1987.
12. Хмелевский Ю. В., Розанов А. Я. Обмен витаминов при сердечно-сосудистых заболеваниях.— Киев, 1975.
13. Horwitt M. K. // Amer. J. clin. Nutr.— 1986.— Vol. 44.— P. 973—986.
14. Takeuchi T., Nishino K., Itokawa Y. // Clin. Chem.— 1984.— Vol. 30.— P. 658—661.
15. Ubbink J. B., Serfontein W. J., De Villiers L. S. // J. Chromatogr.— 1986.— Vol. 375.— P. 399—404.

Поступила 10.06.93

METABOLISM OF VITAMINS B IN DUODENAL ULCER, ESSENTIAL HYPERTENSION, AND ISCHEMIC HEART DISEASE.

V. M. Kodentsova, O. A. Vrzhesinskaya, L. A. Kharitonchik, V. B. Spirichev

Institute of Nutrition, Russian Academy of Medical Sciences, Moscow.

No differences were found in the rate of metabolism of vitamins B₁, B₂, B₆ and niacin either in healthy persons or in patients with duodenal ulcer, hypertension of the 2nd degree and with ischemic heart disease as shown by excretion of riboflavin, 4-pyridoxylic acid, 1-methyl nicotinamide and thiamin with urine which correlated with concentration of these vitamins and their coenzyme forms in blood plasma and erythrocytes. Dependence of these vitamins excretion with urine on their concentration in blood and the vitamins content in food appear to demonstrate similar consumption of vitamins B in the persons studied; at the same time, evaluation of the vitamins consumption in the patients with these forms of pathology should be performed using the criteria suitable for healthy persons. Dissimilar rates of metabolism of these vitamins described in literature might be related to differences in nutrition as well as to the use of nonspecific techniques for estimation of the vitamins. Besides, initial consumption of vitamin B₂ was not sometimes considered, but deficiency in riboflavin caused considerable impairments of vitamin B₆ and niacin metabolism.

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 1994

УДК 616.379-008.64-053.2-07:616.153:577.161/.169

V. M. Kodentsova, O. A. Vrzhesinskaya, E. V. Trofimenko, A. A. Sokolnikov, N. A. Beketova, N. V. Blazhevich, V. A. Isaeva, S. I. Aleynik, L. S. Trofimenko, V. I. Drozova, V. B. Spirichev

ВИТАМИННЫЙ СТАТУС ДЕТЕЙ, СТРАДАЮЩИХ САХАРНЫМ ДИАБЕТОМ

Институт питания РАМН, Центральный институт усовершенствования врачей, Всероссийский эндокринологический научный центр, Москва

Заболевание сахарным диабетом приводит к многочисленным нарушениям обмена целого ряда веществ, в том числе многих водорастворимых витаминов [9—12, 17, 19]. В возникновении и прогрессировании этого заболевания витаминам принадлежит важная роль. Многие витамины (В₁, В₂, С, ниацин) оказывают сахаропонижающее действие и выступают синергистами с инсулином [2, 9, 10, 14]. Оценка и коррекция обеспеченности организма больных диабетом витаминами являются важной задачей. Вместе с тем данные по оценке витаминного статуса касаются лишь взрослых больных и часто носят противоречивый характер [10, 11]. Это может быть обусловлено несколькими причинами. В ряде работ исследовали только один показатель обеспеченности организма витамином, тогда как наиболее полное представление о метаболизме может дать сопоставление показателей крови и мочи. Однако даже при таком подходе ряд исследований в значительной мере обесценивается вследствие применения неспецифических, неунифицированных и недостаточно надежных методов изучения обмена витаминов. Наконец, определенные трудности возникают при трактовке полученных результатов, так как для оценки обеспеченности больных сахарным диабетом, как правило, используют критерии, принятые для здоровых людей. Не всегда учитывают функциональные взаимосвязи между витаминами. Показатели обеспеченности одним витамином могут зависеть от обеспеченности другим витамином.

В последние годы в нашей лаборатории проведены сопоставление и стандартизация мето-

Показатели обеспеченности некоторыми витаминами группы В и аскорбиновой кислотой детей, страдающих сахарным диабетом

Показатель	Норма для здоровых	n	$M \pm m$	Разброс значений	Количество обследованных с дефицитом витамина, %
Фолиевая кислота нг на 1 мл сыворотки	$\geq 2,0$ [8]	15	$8,0 \pm 0,4$	6,0—11,3	0
V_{12} , пг на 1 мл сыворотки	≥ 220 [8]	15	945 ± 40	686—1218	0
Экскреция тиамина, мкг/ч	≥ 11	32	$24,8 \pm 4,4$	1,1—104,0	19
Активность транскетолазы, мкмоль/ч на 1 мл эритроцитов	15—20 [21]	11	$8,1 \pm 0,6$	3,8—10,3	100
ТДФ-эффект	$\leq 1,15$ [21]	11	$1,25 \pm 0,03$	1,17—1,47	100
Аскорбиновая кислота, мг на 1 дл плазмы	$\geq 0,7$ [8]	27	$0,9 \pm 0,1$	0,2—1,3	41
Экскреция аскорбиновой кислоты, мг/ч	$\geq 0,7$ [13]	27	$2,2 \pm 0,6$	0,2—12,8	37

дов определения витаминов группы В в крови и моче [1, 6, 7], выявлены особенности обмена рибофлавина и установлены критерии обеспеченности витаминами группы В для больных инсулинзависимым сахарным диабетом детей [5], охарактеризованы взаимозависимости показателей обеспеченности функционально связанных витаминов [4] и разработан подход, позволяющий надежно выявлять и характеризовать особенности обмена витаминов при патологических состояниях. С учетом этого в данной работе было проведено обследование витаминного статуса детей обоего пола в возрасте 9—15 лет, страдающих инсулинзависимым сахарным диабетом в течение 2—3 лет.

Методика. Обеспеченность организма витаминами оценивали, определяя содержание витаминов или их метаболитов в крови и утренней порции мочи, собранной за 1 ч натощак. Исследования мочи проводили в течение 3 сут, результаты усредняли. Эритроциты и плазму из гепаринизированной крови получали по общепринятой методике. Плазму, сыворотку и гемолизаты эритроцитов замораживали и хранили при температуре -20°C в течение 1—2 нед.

Концентрацию рибофлавина в плазме и моче определяли с помощью титрования рибофлавин-связывающим апобелком из куриного яйца [6]. Содержание общего рибофлавина в эритроцитах измеряли люмифлавиновым методом [15]. Концентрацию 1-метилникотинамида (1-МНА) и никотинамидных коферментов (НАД) в крови определяли методом [7] в нашей модификации с использованием в качестве внутреннего стандарта соответственно препаратов 1-МНА и НАД. Концентрацию 4-пиридоксильной кислоты в моче и пиридоксальных коферментов (ПАЛ и ПАЛФ) в плазме крови определяли методом высокоэффективной жидкостной хроматографии [1, 22]. Активность транскетолазы эритроцитов и степень ее активности экзогенным ТДФ (ТДФ-эффект) измеряли после предварительной инактивации трансальдолазы [21].

Содержание тиамина в моче, восстановленной формы аскорбиновой кислоты в моче и плазме

крови, креатинина определяли ранее описанными методами [8], фолиевой кислоты и витамина V_{12} в сыворотке крови — радиоизотопным методом с набором реактивов «Комбостат II» фирмы «Микромедик» (США) [8].

О наличии корреляции между двумя показателями судили, рассчитывая коэффициент ранговой корреляции (ρ) по Спирмену [3].

Результаты и обсуждение. В табл. 1—3 представлены результаты исследования витаминной обеспеченности у 32 детей, страдающих инсулинзависимым сахарным диабетом.

Концентрация фолиевой кислоты и витамина V_{12} в сыворотке крови всех детей значительно превышала таковую, установленную в качестве нормы для здоровых людей, что свидетельствует об их адекватной обеспеченности этими витаминами (см. табл. 1).

Экскреция тиамина была снижена у 28 % детей, что согласуется с данными других авторов [9, 10], хотя средняя величина по всей группе находилась в пределах нормы. В то же время активность ТДФ-зависимой транскетолазы эритроцитов у всех детей была снижена в 1,5—4 раза по сравнению с нормой, величина ТДФ-эффекта превышала уровень, характерный для нормальной обеспеченности витамином V_1 (см. табл. 1). Аналогичные результаты были получены при обследовании взрослых, больных сахарным диабетом [11].

Об обеспеченности витамином С судили по экскреции восстановленной формы аскорбиновой кислоты и ее содержанию в плазме. Витамин С является синергистом инсулина, в связи с чем в рацион больных диабетом обычно рекомендуют вводить его дополнительно, но, как известно, при сахарном диабете наблюдается существенное изменение обмена этого витамина, сопровождающееся повышением уровня в плазме крови дигидроаскорбиновой кислоты [14, 18], которая обладает *in vivo* диабетогенным свойством [18]. В связи с этим высказывается опасение, что одновременно это может сопровождаться увеличением концентрации в крови

Таблица 2

Показатели обеспеченности рибофлавином детей, страдающих сахарным диабетом

Показатель	Норма для больных сахарным диабетом детей	n	$M \pm m$	Разброс значений	Количество обследованных с дефицитом витамина, %
Экскреция с мочой, мкг/ч	≥ 50	32	$81,7 \pm 23,4$	11,6—556	38
Рибофлавин, нг на 1 мл плазмы	≥ 10	20	$10,3 \pm 0,9$	5,8—20,0	50
Общий рибофлавин, нг на 1 мл эритроцитов	≥ 100	19	$82,2 \pm 7,5$	31,6—149	60

Показатели обеспеченности витамином В₆ и ниацином детей, страдающих сахарным диабетом

Показатель	Норма для здоровых	Обеспеченные витамином В ₆		Не обеспеченные витамином В ₆	
		$M \pm m$ (n)	разброс значений	$M \pm m$ (n)	разброс значений
ПАЛФ, нг на 1 мл плазмы	$\geq 8,2$ [16]	$12,7 \pm 2,0$ (10)	8,7—28,6	$4,7 \pm 0,3$ (15)	2,4—7,4
ПАЛФ+ПАЛ, нг на 1 мл плазмы		$15,1 \pm 2,1$ (10)	10,3—32,1	$6,8 \pm 0,5$	4,1—12
Экскреция 4-пиридоксидовой кислоты с мочой, мкг/ч	≥ 60	$76,3 \pm 12,3$ (10)	35,0—168	$72,9 \pm 17,1$ (15)	15,5—213
Экскреция ксантуреновой кислоты с мочой, мкг на 1 мг креатинина	6,7 [17]	$16,7 \pm 5,6$ (6)	3,8—35,3	$12,4 \pm 1,0$ (5)	10,8—15
НАД+НАДФ, мкг на 1 мл эритроцитов	≥ 40 [6]	70 ± 2 (8)	63—79	82 ± 10 (12)	59—150
Экскреция 1-МНА с мочой, мкг/ч	≥ 400 [8]	330 ± 49 (10)	73—604	291 ± 65 (15)	71—819

дигидроаскорбиновой кислоты [18]. В нашей работе была исследована зависимость экскреции аскорбиновой кислоты от ее содержания в крови. Для этого близкие по величине значения концентрации витамина С в плазме крови объединяли в группы и для каждой группы рассчитывали среднее значение величины экскреции (см. рисунок). Поскольку полученная кривая имеет нелинейный характер, для оценки взаимосвязи между этими двумя параметрами был рассчитан коэффициент ранговой корреляции Спирмена [3]. Коэффициент корреляции равен 0,477 для $n=21$ с вероятностью $p \leq 0,05$; это означает существование корреляции.

Таким образом, для больных сахарным диабетом так же, как и для здоровых людей, увеличение концентрации аскорбиновой кислоты в плазме крови выше 1 мг/дл сопровождается резким выбросом избытка этого витамина с мочой.

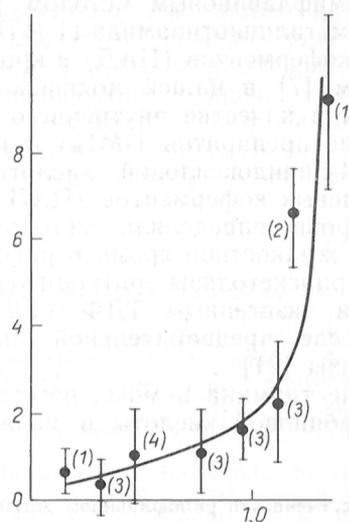
При использовании как одного, так и другого параметра количество детей с дефицитом витамина С составляет в среднем около 40%. Средние значения по группе находятся в пределах нормы. С-гиповитаминоз среди взрослых больных носит более выраженный характер, что, по-видимому, может объясняться как различиями в содержании этого витамина в рационе, так и тяжестью и длительностью заболевания.

При оценке обеспеченности больных детей рибофлавином были использованы критерии, установленные в нашей лаборатории. Величину ФАД-эффекта не определяли, так как этот параметр, как было показано ранее [5], не применим при сахарном диабете. Дефицит этого витамина встречается соответственно в 38—60% случаев. Экскреция рибофлавина оказалась резко повышенной по сравнению с показателем, принятым в качестве нормы для здоровых детей этого возраста: у 20% детей было обнаружено 4-кратное увеличение этого показателя, у 16% — 10-кратное. Лишь у 2 из 32 обследованных детей экскреция рибофлавина была близка к нижней границе нормы для здоровых. Увеличение экскреции рибофлавина у больных диабетом и у крыс со стрептозотоциновым диабетом отмечалось в других работах [11, 19].

Полученные данные указывают на изменение обмена рибофлавина при сахарном диабете. Это изменение не обусловлено уменьшением всасывания в кишечнике этого витамина, о чем

свидетельствуют достаточно высокий его уровень в плазме крови и повышенная экскреция с мочой. Низкое по сравнению со здоровыми содержание общего рибофлавина, представленного в эритроцитах в основном в виде ФАД и ФМН, может быть следствием нарушения фосфорилирования рибофлавина. Подобные нарушения фосфорилирования тиамин у больных диабетом отмечены в литературе [9].

При оценке обеспеченности детей витамином В₆ по концентрации пиридоксалевого кофермента в плазме крови и экскреции 4-пиридоксидовой кислоты с мочой установлено, что дефицит этого витамина встречается в 60% случаев. При этом экскреция ксантуреновой кислоты, выделение которой увеличивается при дефиците как витамина В₆, так и витамина В₂ [2], а также при сахарном диабете [20], оказалась значительно повышенной у 92% обследованных по сравнению с показателями здоровых. Причиной этого, вероятнее всего, является тканевый дефицит витамина В₂ (сниженная концентрация общего рибофлавина в эритроцитах у 89% больных диабетом), поскольку экскреция ксантуреновой кислоты не зависела от обеспеченности



Зависимость экскреции восстановленной формы аскорбиновой кислоты с мочой от ее содержания в плазме крови. Цифры в скобках рядом с точкой — число обследованных.

По оси абсцисс — содержание аскорбиновой кислоты, мг/дл; по оси ординат — экскреция, мг/ч.

витамином В₆ (по концентрации пиридоксалевого коферментов в плазме крови; см. табл. 3).

Уменьшение экскреции продукта метаболизма ниацина — 1-МНА — является одним из критериев дефицита витамина РР, однако, как показано в нашей лаборатории, это снижение может быть также следствием дефицита витамина В₆ и (или) рибофлавина [4]. У 66 % обследованных детей экскреция 1-МНА была ниже нормы, однако это, по-видимому, не было обусловлено дефицитом ниацина, так как концентрация никотинамидных коферментов в эритроцитах у всех детей соответствовала адекватной обеспеченности этим витамином (см. табл. 3). Это может означать, что снижение экскреции 1-МНА обусловлено не дефицитом ниацина, а снижением активности ФАД-зависимой кинуренин-3-монооксигеназы и (или) ПАЛФ-зависимой кинурениназы. Для ответа на этот вопрос была проведена оценка экскреции 1-МНА в зависимости от обеспеченности витамином В₆ (см. табл. 3). Величина экскреции 1-МНА не зависела от концентрации ПАЛ+ПАЛФ в плазме крови. Таким образом, уменьшение экскреции 1-МНА у больных диабетом, отмеченное в литературе, по-видимому, может являться результатом тканевого дефицита рибофлавина.

Суммируя полученные результаты, можно отметить существенное нарушение метаболизма рибофлавина у больных сахарным диабетом, приводящее к снижению концентрации этого витамина в тканях при усилении его выведения из организма. Следствием этого может быть нарушение функционирования некоторых ФАД- и ФМН-зависимых ферментов, в том числе участвующих в обмене других витаминов. Возможно, именно это приводит к снижению экскреции 1-МНА, которое в данном случае не является свидетельством пищевого дефицита ниацина. Таким образом, представленные данные свидетельствуют о широком распространении среди больных сахарным диабетом гиповитаминозных состояний. Лишь 2 человека оказались адекватно обеспеченными всеми витаминами. У 19 % детей обнаружен полигиповитаминоз.

Следовательно, совершенно очевидна необходимость витаминизации больных сахарным диабетом (в первую очередь витамином В₂), что позволило бы не только ликвидировать тканевый дефицит рибофлавина, но и соответственно нормализовать обмен других водорастворимых витаминов.

ЛИТЕРАТУРА

1. Бекетова Н. А., Вржесинская О. А., Коденцова В. М. и др. // Вопр. питания.— 1992.— № 4.— С. 67—69.
2. Витамины / Под ред. М. И. Смирнова.— М., 1974.
3. Гублер Е. В., Генкин А. А. Применение непараметрических критериев статистики в медико-биологических исследованиях.— Л., 1973.
4. Коденцова В. М. // Вопр. мед. химии.— 1992.— № 4.— С. 33—37.
5. Коденцова В. М., Алексеева И. А., Спиричев В. Б. // Укр. биохим. журн.— 1992.— № 4.— С. 30—33.
6. Коденцова В. М., Вржесинская О. А., Алексеева И. А., Спиричев В. Б. // Вопр. мед. химии.— 1991.— № 5.— С. 76—79.
7. Коденцова В. М., Вржесинская О. А., Сокольников А. А. и др. // Вопр. питания.— 1992.— № 2.— С. 62—67.
8. Методы оценки витаминной обеспеченности населения: Теоретические и клинические аспекты науки о питании. Т. 8.— М., 1987.

9. Мойсеенок А. Е., Кочурко С. П., Балаклеевская В. Г. // Кокарбоксилаза и другие тиаминфосфаты.— Минск, 1974.— С. 172—197.
10. Павловский М. П., Томашевский Я. И., Томашевская А. Я., Сергеевко А. А. Изучение обмена тиамин (витамина В₁) и его коррекция у больных и угрожаемых по сахарному диабету: Метод. рекомендации.— Львов, 1982.
11. Подорожный П. Г., Березин П. К. // Актуальные проблемы физиологии, биохимии и патологии эндокринной системы.— М., 1972.— С. 375—376.
12. Попова Т. Ю. // Там же.— С. 377.
13. Потребность человека в витаминах / Под ред. М. И. Смирнова.— М., 1966.
14. Спиричев В. Б., Рымаренко Т. В. // Клини. мед.— 1990.— № 2.— С. 24—30.
15. Чернышов В. Г. // Лаб. дело.— 1985.— № 3.— С. 171—173.
16. Editorial // Pädiat. u. Pathol.— 1974.— Bd 57, N 3.— S. 301—309.
17. Ikeda S., Kotake Y. // Ital. J. Biochem.— 1986.— Vol. 35, N 4.— P. 232—241.
18. Karbi J., Kramlova Y., Skrha J. // Cas. Lek. ces.— 1987.— Vol. 126, N 46.— P. 1430—1432.
19. Reddy A. S., Frank O., Baker H. // Int. J. Vitam. Nutr. Res.— 1990.— Vol. 60, N 3.— P. 252—254.
20. Som S., Basu D., Mukherjee S. et al. // Metabolism.— 1981.— Vol. 30.— P. 572—577.
21. Takeuchi T., Nishino K., Iwakawa Y. // Clin. Chem.— 1984.— Vol. 30.— P. 658—661.
22. Ubbink J. B., Serfontein W. J., De Villiers L. S. // J. Chromatogr.— 1986.— Vol. 30.— P. 658—661.

Поступила 20.04.93

THE VITAMIN STATUS IN CHILDREN WITH DIABETES MELLITUS.

V. M. Kodentsova, O. A. Vrzhesinskaya, Ye. V. Trofimenko, A. A. Sokolnikov, N. A. Beketova, N. V. Blazheevich, V. A. Isaeva, S. I. Aleynik, L. S. Trofimenko, V. I. Dronova, V. B. Spirichev

Institute of Nutrition, Russian Academy of Medical Sciences, Central Institute for Postgraduate Training of Physicians, All-Russian Endocrinologic Research Centre, Moscow.

A vitamin status was studied in 32 children of both sexes at the age of 9—15 years with insulin-dependent diabetes mellitus within 2—3 years. The adequate consumption of all the vitamins studied was found only in two children. Polyhypovitaminosis was detected in 19 % of these children. Deterioration of riboflavin metabolism observed was manifest, as a decrease in the vitamin content in tissues in line with an increase in its excretion with urine. As a result of this impairment metabolism of vitamins В₆ and РР was disturbed with development of these vitamins secondary deficiency of the non-alimentary type. Obligatory correction of the water soluble vitamin deficiency in the patients with diabetes mellitus is discussed.

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 1994

УДК 616.36-018.1-008.939.15-02:616-001.161-07

К. Т. Алматов, Х. Н. Мусаев, З. Кадилова

О ФОСФОЛИПИДНОМ СОСТАВЕ МЕМБРАН МИТОХОНДРИЙ ПЕЧЕНИ ПРИ ТЕПЛОВЫХ СТРЕССАХ

Институт зоологии и паразитологии АН Республики Узбекистан, Ташкент

Ранее нами [10, 13] было показано, что при воздействии умеренно высоких температур (36—37 °С) на организм крыс митохондрии печени незначительно изменяют свои функциональные характеристики и обеспечивают нормальную скорость синтеза АТФ. При этом наблюдается некоторое увеличение скорости окисления сукцината. При более высокой температуре (41—43 °С)

Влияние высокой температуры окружающей среды на фосфолипидный состав (в % от общего количества фосфолипидов) митохондрий печени крысы

Фосфолипиды	Контроль (10)	Опыт			
		36—37 °С		41—43 °С	
		2 ч (10)	4 ч (9)	2 ч (8)	4 ч (7)
ФХ	36,10±1,98	32,37±1,68	31,59±1,77	30,98±1,25	29,12±1,80
ФЭА	25,66±1,10	21,49±0,98	20,10±1,27	19,40±1,71	18,52±1,60
КЛ	10,21±0,72	13,63±1,00	14,45±1,12	14,80±1,25	15,20±1,36
ФС	4,31±0,42	4,94±0,56	5,11±0,61	5,38±0,44	5,94±0,41
ФИ	6,22±0,38	5,68±0,32	5,20±0,36	4,82±0,25	4,42±0,32
ЛФХ	3,43±0,18	4,90±0,21	5,84±0,24	6,24±0,44	7,42±0,51
ЛФЭА	4,22±0,22	5,56±0,27	6,10±0,33	6,56±0,35	7,20±0,49
ЛКЛ	0,50±0,08	1,21±0,10	1,43±0,18	1,61±0,22	1,82±0,17
ФК	2,04±0,11	2,34±0,16	2,49±0,18	2,53±0,20	2,68±0,24
ЛФК	2,10±0,12	2,69±0,18	2,69±0,20	2,78±0,24	2,88±0,28
СМ	5,21±0,32	5,22±0,36	5,00±0,38	4,90±0,26	4,90±0,31

Примечание. В скобках — число животных.

уменьшается эффективность синтеза АТФ, увеличивается доступность фосфолипидов и белков, входящих в состав полиферментных систем дыхательной цепи митохондрий, к действию фосфолипазы и протеазы. Известно, что главным фактором, определяющим структурную организацию и функциональное состояние мембран митохондрий, является их фосфолипидный состав [21—24, 27, 29]. В связи с этим можно полагать, что изменение содержания индивидуальных фосфолипидов и их лизосоединений в митохондриях печени при тепловых стрессах может являться существенным фактором, отражающим нарушения параметров дыхания, окислительного фосфорилирования и активности полиферментных систем дыхательной цепи митохондрий.

Цель настоящей работы — проследить закономерности в количественных сдвигах различных фракций фосфолипидов в митохондриях печени после выдерживания животных при высоких температурах окружающей среды и выяснить, участвуют ли эндогенные липолитические ферменты в превращениях фосфолипидов.

Методика. Тепловую обработку крыс проводили следующим образом. Крыс-самцов массой 180—200 г разделили на 5 групп по 8—10 животных в каждой. Животных 1-й (контрольной) группы не подвергали нагреванию. Животных 2-й и 3-й групп выдерживали в термостате в течение 2 и 4 ч при 36—37 °С, животных 4-й и 5-й групп выдерживали в течение 2 и 4 ч при 41—43 °С.

Митохондрии выделяли из печени [13], используя в качестве среды выделения 10 мМ трис-НСI-буфер рН 7,4, содержащей 0,25 М сахарозу. Фосфолипиды митохондрий экстрагировали по методу [6]. Фосфолипиды анализировали методом горизонтальной тонкослойной хроматографии в модификации А. В. Каргаполова и количественно определяли денситометрически [5]. Липидный фосфор определяли методом [28]. Активность фосфолипазы А₂ митохондрий определяли по скорости накопления лизофосфатидилэтаноламина (ЛФЭА) [11], а лизофосфолипазы А₁ — по накоплению глицерофосфоэтаноламина [3].

Результаты и обсуждение. Результаты воздействия высокой температуры различной интенсивности и длительности приведены в табл. 1, из которой видно, что содержание фосфолипидов

мембран митохондрий печени крыс, выдержанных при умеренно высокой температуре (36—37 °С) в течение 2 ч, отличается от контроля. При этом наблюдается уменьшение содержания фосфатидилхолина (ФХ), фосфатидилэтаноламина (ФЭА), фосфатидилинозита (ФИ) и повышение других фракций фосфолипидов и лизофосфолипидов, за исключением сфингомиелина (СМ). При увеличении времени экспозиции крыс в тех же условиях отличие содержания фосфолипидов мембран митохондрий от контроля возрастает. Так, если после выдерживания животных в течение 2 ч содержание ФХ, ФЭА и ФИ уменьшается на 10,4, 16,3 и 8,6 % соответственно, то после 4 ч — на 12,8, 21,7 и 14,7 %. Если 2-часовое воздействие тепла приводило к повышению содержания кардиолизофосфатидилхолина (ЛФХ), лизофосфатидилэтаноламина (ЛФЭА), лизокардиолипина (ЛКЛ) и лизофосфатидной кислоты (ЛФК) на 33,5, 14,6, 14,7, 42,6, 31,7, 142 и 21,9 % соответственно по сравнению с контролем, то после 4-часового воздействия — на 41,5, 18,5, 22, 70,2, 44,5, 186 и 28 %.

В дальнейшем в экспериментах исследовали указанные эффекты при более высокой температуре окружающей среды (41—43 °С). При этом обнаружено, что содержание фосфолипидов мембран митохондрий печени значительно отличается от нормы. Эти изменения усиливаются с увеличением длительности теплового стресса. Так, если 2-часовое перегревание животных приводило к уменьшению содержания ФХ (на 14,2 %), ФЭА (на 21,4 %), ФИ (на 14,7 %) и повышению содержания КЛ (на 45,6 %), ФС (на 24,8 %), ФК (на 24 %), ЛФХ (на 81,9 %), ЛФЭА (на 55,4 %), ЛКЛ (на 222 %) и ЛФК (на 32,4 %), то после 4-часового воздействия уменьшение содержания ФХ, ФЭА и ФИ достигало 19,4, 27,9 и 29 %, а КЛ, ФС, ЛФХ, ЛФЭА, ЛКЛ и ЛФК — 48,9, 37,8, 31,3, 116,3, 70,6, 264 и 37 % соответственно по сравнению с контролем.

В то же время следует отметить, что соотношение ФХ/ФЭА, играющее важную роль в сохранении интактности мембранных структур при тепловых стрессах, существенно не изменяется. Однако при этом обнаруживаются изменения в соотношении диацильных форм фосфолипидов и их лизопроизводных: коэффициент ФХ/ЛФХ, ФЭА/ЛФЭА, КЛ/ЛКЛ уменьшается и зависит от интенсивно-

Влияние высокой температуры окружающей среды на активность (в мкг/ч на 1 мг белка) фосфолипазы А₂ и лизофосфолипазы А₁ митохондрий печени крыс

Условия эксперимента	Число животных	Фосфолипаза А ₂	Лизофосфолипаза А ₁
Контроль 36—37 °С:	10	4,81±0,35 (100)	2,64±0,22 (100 %)
2 ч	10	5,85±0,46 (121,6)	3,34±0,34 (126,5)
4 ч	9	6,93±0,58 (144)	3,82±0,37 (144,7)
41—43 °С:			
2 ч	8	6,45±0,47 (134)	2,83±0,31 (107)
4 ч	7	7,45±0,62 (154,8)	3,04±0,30 (115)

Примечание. В скобках — процент.

сти и длительности тепловых экспозиций. Так, если после 2- и 4-часового выдерживания животных при 36—37 °С коэффициент ФХ/ЛФХ уменьшается в 1,37 и 1,49 раза, то при 41—43 °С — в 1,53 и 1,63 раза соответственно по сравнению с контролем. Аналогичный характер изменений наблюдается при исследовании коэффициента ФЭА/ЛФЭА и КЛ/ЛКЛ.

При гипертермии изменения содержания фосфолипидов митохондрий, по-видимому, являются результатом нарушения восполнения фосфолипидного компонента мембран митохондрий, разрушения фосфолипидов под влиянием эндогенных фосфолипаз и прямым следствием энзиматических реакций, протекающих в ткани печени. При этом уменьшение синтеза ФХ и ФЭА, на наш взгляд, связано с ослаблением реакции СДР-холина или СДР-этаноламина (образующихся в реакции с СТР фосфорилированных холина и этаноламина) с 1,2-диацилглицеридами [17, 22]. Можно допустить, что при гипертермии в клетках печени ускоряется превращение ФЭА в ФС (реакция трансалкилирования) и замедляется превращение ФС в ФЭВ (реакция декарбоксилирования), в результате чего накапливается ФС.

При гипертермии в митохондриях печени повышение содержания КЛ свидетельствует об ускорении синтеза данных липидов. В ряде работ [19, 20] показано, что митохондрии обладают полным набором ферментов для синтеза КЛ, которые связаны с внутренней мембраной.

При тепловых стрессах уменьшение содержания ФИ мембран митохондрий, по нашему мнению, является одной из главных причин снижения АТФ-синтезирующей функции дыхательной цепи митохондрий печени [10, 13]. Известно, что одним из интересных аспектов физиологической роли обмена ФИ является их участие в трансформации энергии в клетке [7, 8]. Среди ФИ трифосфатидилинозит может выполнять функции как посредника в использовании энергии АТФ, так и предшественника синтеза АТФ. Ранее было показано [18], что АТФ-зависимую сократительную способность митохондрий после нарушения их липидного состава удалось частично восстановить только добавлением монофосфоинозотида. По нашему мнению, гипотетический фактор хемиосмотического сопряжения, фосфолипидную природу которого предположил В. П. Скулачев [16], следует искать среди ФИ.

При гипертермии независимо от уменьшения содержания ФХ, ФЭА и повышения количества КЛ увеличение содержания их лизосоединений свидетельствует о повышении каталитической

активности эндогенной фосфолипазы А₂ мембран митохондрий. Данные об активности фосфолипазы А₂ мембран митохондрий, выделенных из печени животных всех 5 групп, приведены в табл. 2. При небольшой продолжительности (2 ч) теплового воздействия в более мягком режиме активность фосфолипазы А₂ митохондрий повышается (на 21,6 %), а с увеличением длительности эксперимента повышение ее возрастает (на 44 %). При повышении температуры окружающей среды (41—43 °С) в митохондриях печени животных наблюдается значительное усиление активности фосфолипазы А₂. Так, если на начальном этапе теплового воздействия активность фермента повышается в 1,34 раза, то через 4 ч — в 1,55 раза от контроля. Таким образом, активность фосфолипазы А₂ мембран митохондрий печени зависит от интенсивности и длительности перегревания животных, т. е. чем больше длительность перегревания или интенсивность теплового стресса, тем выше активность фермента. Активация фосфолипазы А₂ обуславливает изменение в составе митохондриальной мембраны, что незамедлительно сказывается на функционировании органелл. Увеличивающееся при этом содержание лизофосфолипидов в мембране вызывает образование мицелл [30] и способствует нарушению структуры биомембран [15, 18, 26], а увеличение содержания свободных жирных кислот приводит по крайней мере к трем последствиям: к еще большей активации фосфолипазы, к усилению разобщенности процессов окисления и фосфорилирования и (после перехода свободных жирных кислот в активированную форму) к ингибированию адениннуклеотидтрансферазы [11, 12]. Недавно было показано [25], что холиновые (но не этаноламинные) лизофосфолипиды могут индуцировать выход Ca²⁺ из митохондрий и выступать в качестве медиаторов ишемического поражения тканей при нерегулируемой активации фосфолипазы А₂, нарушая нормальное функционирование митохондрий. В работе [4] показано, что ЛКЛ наряду с другими лизоформами фосфолипидов играет существенную роль в транспорте ионов калия через митохондриальную мембрану.

Недавно в митохондриях обнаружена, помимо фосфолипазы А₂, также лизофосфолипаза А₁ [3]. Этот фермент наиболее специфичен к ЛФЭА, и рН-оптимум его гидролитического действия находится в пределах 6,0—7,4. При этом установлено, что повышение температуры инкубации изолированных митохондрий с 37 до 42 °С приводило к уменьшению гидролитической активности лизофосфолипазы А₁. В связи с этим представляет

интерес, как изменяется активность лизофосфолипазы A_1 мембран митохондрий печени после выдерживания животных при высокой температуре окружающей среды различной интенсивности и длительности.

Данные об активности лизофосфолипазы A_1 мембран митохондрий, выделенных из печени крыс всех 5 групп, приведены в табл. 2. Видно, что перегревание животных в более мягких температурных условиях приводило к повышению активности лизофосфолипазы A_1 (в течение 2 и 4 ч в 1,27 и 1,45 раза соответственно по сравнению с контролем), а при жестких тепловых экспозициях активность фермента уменьшалась и приближалась к контрольным значениям, что свидетельствует о подавлении каталитической активности лизофосфолипазы A_1 мембран митохондрий печени. В этом случае должно происходить накопление лизоформ фосфолипидов. Действительно, в обсуждаемых экспериментах содержание лизофосфолипидов заметно повышается (см. табл. 1). Анализируя полученные результаты, можно заключить, что активизация лизофосфолипазы A_1 при мягких условиях теплового воздействия приводит к удалению лизофосфолипидов, образующихся под действием фосфолипазы A_2 , и, таким образом, предотвращает ее повреждающее действие. При жестких условиях теплового воздействия из-за низкой активности лизофосфолипазы A_1 не происходит гидролиз лизофосфолипидов и, таким образом, не обеспечивается защита мембраны от повреждающего воздействия лизофосфолипидов. Возможно, обнаруженные закономерности на уровне этих ферментов (фосфолипазы A_2 и лизофосфолипазы A_1) мембран митохондрий являются определенными звеньями единого механизма компенсаторно-приспособительных реакций организма на внешние тепловые воздействия.

Недавно в митохондриях печени обнаружена, помимо фосфолипазы A_2 и лизофосфолипазы A_1 , также фосфолипаза D [2, 14]. В связи с этим мы предположили, что главные фосфолипиды гидролизуются при тепловых стрессах не только фосфолипазой A_2 , но и фосфолипазой D. В этом случае должно происходить накопление ФК. Действительно, из табл. 1 видно, что при тепловых стрессах в митохондриях печени содержание ФК повышается. Образующиеся под действием фосфолипазы A_2 лизофосфолипиды могут подвергаться дальнейшему гидролизу лизофосфолипазой A_1 с образованием деацилированных производных и свободных жирных кислот. Кроме того, лизофосфолипиды могут гидролизоваться фосфолипазой D. Известно, что фосфолипаза D гидролизует не только фосфолипиды, но и их лизопроизводные [2, 14]. В этом случае должно повышаться содержание ЛФК. Действительно, при тепловых стрессах в митохондриях печени содержание ЛФК повышается (см. табл. 1). Образование ЛФК может происходить также под действием фосфолипазы A_2 . Кроме того, в митохондриях имеется система ферментов, катализирующих синтез ФК и ЛФК из α -глицерофосфата и жирных кислот с участием АТФ, и АТФ-зависимая система реакцирования лизофосфолипидов [9], которая может вносить вклад в превращение фосфолипидов при тепловом стрессе. Известно, что накопление свободных жирных кислот в митохондриях приводит

к значительным изменениям структуры и функций этих частиц [24, 25]. Возможно, что система α -глицерофосфат — ацилтрансфераза служит для предохранения митохондрий от нежелательных последствий накопления жирных кислот. Таким образом, α -глицерофосфат может служить своеобразной физиологической буферной системой для жирных кислот.

Таким образом, при тепловых стрессах в митохондриях печени наблюдается уменьшение содержания фракций КЛ, ФЭА, ФИ и повышение содержания фракций КЛ, ФС, ФК и лизоформ фосфолипидов. Отклонения содержания фосфолипидов мембран митохондрий коррелируют с интенсивностью и длительностью тепловых воздействий. При мягких условиях теплового воздействия (36—37 °С) на крыс наблюдается повышение каталитической активности фосфолипазы A_2 и лизофосфолипазы A_1 митохондрий печени. С удлинением срока теплового экспозиции (4 ч) повышается активность липолитических ферментов усиливается. При более жестких условиях теплового воздействия (41—43 °С) на крыс наблюдается значительное повышение активности фосфолипазы A_2 мембран митохондрий. При этом активность лизофосфолипазы A_1 мембран митохондрий уменьшается и приближается к контрольным величинам, в результате чего в митохондриях отклонения содержания фосфолипидов усиливаются и накапливается лизоформа фосфолипидов, что способствует нарушению функции митохондрий печени.

ЛИТЕРАТУРА

1. Алматов К. Т. Механизмы развития повреждений мембран митохондрий и роль липолитической системы: Дис. ... д-ра биол. наук.— Ташкент, 1990.
2. Алматов К. Т., Горбатая О. Н., Ходжаева Н. И. и др. // Укр. биохим. журн.— 1987.— Т. 59, № 4.— С. 93—96.
3. Горбатая О. Н., Миргалипов Д. Т., Алматов К. Т., Рахимов М. М. // Там же.— 1988.— Т. 60, № 6.— С. 23—28.
4. Евтодченко Ю. В., Медведев Б. И., Кудзина Л. Ю. и др. // Докл. АН СССР.— 1977.— Т. 233, № 4.— С. 708—711.
5. Каргаполов А. В. // Биохимия.— 1981.— Т. 46, № 4.— С. 691—698.
6. Кейтс М. Техника липидологии: Пер. с англ.— М., 1975.— С. 74—77.
7. Киселев Г. В., Павлинова Л. И., Четвериков Р. А. // Докл. АН СССР.— 1976.— Т. 226.— С. 1455—1458.
8. Киселев Г. В. // Там же.— 1977.— Т. 234.— С. 475—478.
9. Ляхович В. В. // Науч. докл. высш. школы. Биол. науки.— 1976.— № 2.— С. 36—45.
10. Мусаев Х. Н., Алматов К. Т. Особенности энергетики органов пищеварения при адаптации организма к высокой температуре.— Ташкент, 1988.
11. Панов А. В., Константинов Ю. М., Ляхович В. В., Казначеев В. П. // Докл. АН СССР.— 1975.— Т. 221, № 3.— С. 746—748.
12. Панов А. В., Ляхович В. В. // Биооргани. химия.— 1978.— Т. 4, № 1.— С. 5—18.
13. Рахимов М. М., Алматов К. Т. // Биохимия.— 1977.— Т. 42, № 10.— С. 1852—1863.
14. Рахимов М. М., Горбатая О. Н., Алматов К. Т. // Там же.— 1989.— Т. 54, № 7.— С. 1066—1074.
15. Скулачев В. П. Аккумуляция энергии в клетке.— М., 1969.
16. Скулачев В. П. Трансформация энергии в биомембранах.— М., 1972.
17. Francescangeli E., Gerocei G., Porrovecchio P., Porcellati G. // Ital. J. Biochem.— 1984.— Vol. 33, N 3.— P. 213—215.
18. Hunter D. R., Komai H., Haworth R. A. // Biochim. biophys. Res. Commun.— 1974.— Vol. 56, N 3.— P. 647—653.
19. Hostler K. Y., Van den Bosch H., Van Deenen L. L. M. // Biochim. biophys. Acta.— 1971.— Vol. 239.— P. 113—116.

20. Kiyasu S. K., Pieringer R. A., Paulus H., Kennedy S. P. // J. Biochem.— 1963.— Vol. 238.— P. 2293—2297.
21. Palatini P., Dabbeni-Sala F., Bruni A. // Biochim. biophys. Acta.— 1972.— Vol. 228.— P. 413—442.
22. Pelech S. L., Vance D. E. // Ibid.— 1984.— Vol. 779, N 2.— P. 217—251.
23. Ragen C. I. // Biochem. J.— 1978.— Vol. 172, N 3.— P. 539—547.
24. Racker E. A. A New at Mechanism in Bioenergetics.— New York, 1976.
25. Rustenbek I., Eibl H., Kenzen S. // Biochim. biophys. Acta.— 1991.— Vol. 1069, N 1.— P. 99—109.
26. Spach P. I., Parce L. W., Cunningham C. C. // Biochem. J.— 1979.— Vol. 178, N 1.— P. 23—33.
27. Swabljan P., Frideri L., Ohlson K., Ernster L. // Biochim. biophys. Acta.— 1979.— Vol. 305.— P. 519—533.
28. Vackovsky V. E., Kostetsky E. Y., Vasendin Y. M. // J. Sgromatogr.— 1975.— Vol. 114, N 1.— P. 129—141.
29. Vignais P. M. V., Vignais P. V., Lehninger A. L. // J. biol. Chem.— 1964.— Vol. 239, N 6.— P. 2011—2021.
30. Weltzien H. V. // Biochim. biophys. Acta.— 1979.— Vol. 559, N 2—3.— P. 259—287.

Поступила 18.01.93

PHOSPHOLIPID COMPOSITION OF HEPATIC MITOCHONDRIAL MEMBRANES IN THERMIC STRESS.

K. T. Almatov, Kh. N. Musaev, Z. Kadirova

Institute of Zoology and Parasitology, Academy of Sciences of the Uzbekistan Republic, Tashkent.

Content of phospholipids as well as activity of phospholipase A_2 and lysophospholipase A_1 were studied in the hepatic mitochondrial membranes of rats exposed to high temperatures. A decrease in the content of phosphatidylcholine, phosphatidylethanolamine, phosphatidylinositol and increase in fractions of cardiolipin, phosphatidylserine, phosphatidic acid and lysophospholipids were detected in liver tissue mitochondria after heat stress. Alterations of phospholipid levels in the mitochondrial membranes correlated with the rate (36-37° and 41-43°) and duration (2 and 4 hrs) of heat exposure. Under mild conditions of heat exposure, phospholipase A_2 and lysophospholipase A_1 were activated in rat liver mitochondrial membranes. With elongation of the heat effect up to 4 hr activation of the lipolytic enzymes was increased. Under most severe conditions of heat stress, a marked activation of phospholipase A_2 was observed, while the activity of lysophospholipase A_1 was decreased and approached to control values.

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 1994

УДК 615.462:615.281|.03:616.71-089.844

С. Ф. Жильцов, С. Б. Шустов, Л. Н. Бочкарев, Е. С. Малышев, Т. Е. Седова

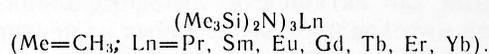
ПОЛУЧЕНИЕ ФИЗИОЛОГИЧЕСКИ АКТИВНОГО ПОЛИМЕТИЛМЕТАКРИЛАТА НА СИЛИЛАМИДАХ ЛАНТАНОИДОВ

Нижегородский педагогический институт им. М. Горького

В настоящее время уделяется большое внимание вопросам восстановительной хирургии костных дефектов. В частности, предпринимались попытки применить полимерные материалы в качестве цементирующих составов или наполнителей костных полостей в сочетании с антисептиками [2, 4]. Известно также, что кремнийорганические полимеры [1, 3] и полимеры, полученные на кремнийорганических катализаторах [7], проявляют антисептические свойства. В связи с этим представлялось интересным получить модифицированный полимер, содержащий элементоорганическую группу с антисептической функцией, и исследовать его физиологическую активность

при воздействии на пораженную костную ткань.

С этой целью нами были использованы в качестве активных катализаторов блочной полимеризации метилметакрилата (ММА) силилаמידные производные трехвалентных лантаноидов

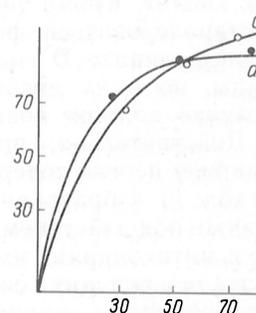


При этом предполагалось, что наличие в составе катализатора силилаמידной группы будет придавать образуемому полимеру биологическую активность. Не исключено, что и лантаноид может оказать синергический эффект.

Методика. Физиологическая активность синтезированного нами полимера была подтверждена в клиническом эксперименте на 15 беспородных кроликах-самцах массой 1,5—2 кг, имеющих полостной дефект размером 0,8×0,4 см в верхней трети большеберцовой кости с полным удалением кортикальной пластинки и губчатого вещества. Эксперимент был осуществлен в лаборатории Нижегородского медицинского института согласно методике [4]. Все манипуляции на животных выполнены под местной анестезией 0,5 % раствором новокаина (2 мл) с предварительной премедикацией раствором промедола. Подопытные животные были разделены на 3 группы (по 5 кроликов в каждой): 1-я — полость заполняли крошкой непереосажденного полиметилметакрилата, полученного на катализаторах [(Me₃Si)₂N]₃Ln (Ln=Sm, Er, Yb); 2-я — в полость помещали аллобрефотрансплантат (костная ткань плода), консервированный в 0,5 % растворе формалина; 3-я — костную полость заполняли кровавым сгустком (контроль).

Исследование замещения дефекта проводили рентгенологическим и гистологическим способами. Окраску гистологических препаратов осуществляли по Ван-Гизону. Рентгенологическое исследование выполняли на аппарате «Арман» через каждые 10 сут. Гистологически исследовали легкие, сердце, печень, почки.

Силилаמידные производные лантаноидов были получены по известным методикам [8, 9]. Используемые мономеры очищали следующим образом. ММА обрабатывали последовательно 10 % раствором щелочи, водой, сушили над хлоридом кальция, мелкодисперсным гидридом лития и молекулярными ситами, перед употреблением переконденсировали в вакууме (т. кип. 99,5 °С, $n_D^{20}=1,4135$). Стирол очищали



Зависимость состава сополимера стирола и ММА от состава исходной смеси мономеров на катализаторах.

По оси ординат — ММА в сополимере (в мол. %); по оси абсцисс — ММА в смеси (в мол. %).

а — [(Me₃Si)₂N]₃Yb (0,8 мас. % в массе); б — [(Me₃Si)₂N]₃Pr (1,2 мас. % в растворе).

Сравнительные данные, характеризующие влияние трех типов пластики костной полости на остеогенез

Группа (тип пластики)	Срок после операции, дни			
	10	40	70	150
1-я (полимер)	Микроскопически со стороны эндооста очаговое разрастание остеобластов. В гаверсовых каналах соединительная ткань. Патологических изменений не выявлено	Микроскопически со стороны эндооста полость заполнена слоем остеобластов. Патологических изменений нет (в том числе со стороны внутренних органов)	Микроскопически вся полость заполнена зрелой костной тканью. Надкостница утолщена. Гаверсовы каналы расширены. Патологических изменений не выявлено.	Макроскопически костная ткань в месте пластики не отличается от здоровой. Патологических изменений не выявлено (в том числе со стороны внутренних органов)
2-я (аллобребротрансплантат)	Макроскопически полость уменьшилась в размерах. Микроскопически сгусток в полости стал плотным, пронизан волокнами соединительной ткани (активизация остеогенеза)	Микроскопически полость полностью заполнена плотной тканью различной степени зрелости. Костная пластинка утолщена, гаверсовы каналы различной величины, расширены	Микроскопически костная ткань без патологии. Гаверсовы каналы единичные, просвет их одинаков. Надкостница с неравномерным утолщением	Макроскопически ткань в месте пластики не отличается от здоровой. Мягкие ткани вокруг полости обычного вида
3-я (кровеный сгусток, контроль)	Макроскопически полость в размерах не уменьшилась	Макроскопически полость почти не сократилась в размерах, заполнена плотным сгустком. Микроскопически мельчайшие очаги костномозгового кроветворения	Макроскопически сохраняется полость размером 0,2×0,5 см	Макроскопически на месте полости остаточные углубления в виде 2 ямок. Макроскопически ткань различной степени зрелости (неоконченный остеогенез)

от ингибиторов 10 % КОН, затем 3—4 % серной кислотой, сушили над сульфатом натрия, гидридом лития и переконденсировали в вакууме (т. кип. 44 °С, $n_D^{20} = 1,5469$).

Проведение полимеризации ММА на катализаторе $[(Me_3Si)_2N]_3Er$. В охлажденную жидким азотом ампулу, содержащую 20 мл сухого дегазированного ММА, через отвод присыпали порциями при энергичном встряхивании 0,12 г (0,6 мас.%) трио-[бис-(триметилсилил)амидо]-эриб в вакуумированной системе. При этом катализатор хорошо растворяется в мономере, образуя бледно-розовый раствор. По мере постепенного размораживания ампулы и повышения температуры полимеризующейся смеси до комнатной образуется твердый непрозрачный светло-розовый блок полимера в течение 5—10 мин. При более быстром размораживании охлажденной ампулы полимеризующаяся смесь мгновенно «вскипает» с выделением теплоты, образуя пенообразный твердый блок за 2—3 мин. Аналогичным образом проводили опыты 1—5, 7 и 8 (табл. 2).

Сополимеризация ММА и стирола на $[(Me_3Si)_2N]_3Yb$ в массе. В 3 ампулах готовили смесь объемом 15 мл ММА и стирола в мольном соотношении соответственно 1:3, 1:1 и 3:1. Смеси мономеров дегазировали в вакууме путем многократного замораживания жидким азотом и размораживания, далее в вакуумированной системе через отвод прибавляли равные количества катализатора (0,25 г, 1,6 мас.%). Сополимеризацию проводили при комнатной температуре в течение 10 мин (конверсия до 10 %). Полученный сополимер очищали от исходных мономеров и катализатора троекратным растворением в смеси бензол—ацетон и осаждением метанолом. Переосажденный очищенный сополимер сушили в вакууме до постоянной массы. Сухой остаток анализировали на содержание звеньев стирола и ММА элементарным анализом.

Результаты и обсуждение. Рентгенографические исследования показали, что регенерация костной ткани наступила к 40—50-му дню

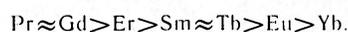
после операции. Костная полость к этому времени на снимках в 1-й группе животных не прослеживалась. Полимерная крошка в костном дефекте не обнаружена через 10 сут, так как она не воспринимает гистологическую окраску. В контрольной группе животных заполнение костной полости регенератом не наблюдается и к 150-му дню после операции. Пластика аллобребротрансплантатом дает результаты, сходные с полученными в 1-й группе.

Результаты исследований подтверждены фотограммами, рентгеновскими снимками и гистологическими препаратами. В табл. 1 мы приводим сравнительные данные, характеризующие влияние трех типов пластики костного дефекта (испытываемым нами полимером, аллобребротрансплантатом и кровяным сгустком) на процессы остеогенеза в равных клинических условиях.

Исходя из этих данных, нами сделан вывод, что ускорение регенерации оставшихся костных стенок, окружающих полость, происходит за счет биостимулирующего влияния полимерного материала. Кроме того, последний, по-видимому, проявляет и антисептическую функцию, так как в эксперименте не обнаружено признаков воспалительных процессов. Этот факт следует рассматривать как преимущество перед аллобребротрансплантатом, нуждающимся в обязательной консервации и стерилизации.

Установлено, что силиламидные производные лантаноидов проявляют высокую активность при низкотемпературной полимеризации ММА, сопровождающейся образованием блочного полимера. В табл. 2 приведены условия процесса и характеристика полученных полимеров.

Активность силиламидных катализаторов зависит от природы лантаноида и снижается в следующем ряду:



Эта активность сравнивалась с каталитической способностью аналогичного амидопроизводного лития (сравните опыты 1—7 с 8, см. табл. 2). Амиды щелочных металлов [5, 6] широко

Каталитическая активность силиламидных производных лантаноидов в реакциях полимеризации ММА

№ опыта	Катализатор	Концентрация, % к массе ММА	Длительность реакции, мин	Характеристика полимера
1	$[(\text{Me}_3\text{Si})_2\text{N}]_3\text{Pr}$	1,8	2—5	Блок пенообразный, твердый, бледно-зеленого цвета
2	$[(\text{Me}_3\text{Si})_2\text{N}]_3\text{Sm}$	2,0	5—10	Блок пористый, твердый, бледно-желтого цвета
3	$[(\text{Me}_3\text{Si})_2\text{N}]_3\text{Eu}$	2,0	10—15	Блок плотный, твердый, желтого цвета, прозрачный в слое до 0,5 см
4	$[(\text{Me}_3\text{Si})_2\text{N}]_3\text{Gd}$	2,0	2—5	Блок пенообразный, твердый, бесцветный, непрозрачный
5	$[(\text{Me}_3\text{Si})_2\text{N}]_3\text{Tb}$	2,1	5—10	Блок плотный, твердый, бесцветный, полупрозрачный
6	$[(\text{Me}_3\text{Si})_2\text{N}]_3\text{Er}$	1,8	2—5	Блок пористый, твердый, бледно-розового цвета
7	$[(\text{Me}_3\text{Si})_2\text{N}]_3\text{Yb}$	2,1	20—40	Блок плотный, твердый, зеленовато-желтого цвета, прозрачный в слое до 0,2 см
8	$(\text{Me}_3\text{Si})_2\text{NLi}$	2,8	5—10	Блок пористый, твердый, бесцветный

Примечание. Опыты проводили при нагревании замороженной жидким азотом ампулы до 20 °С.

используются в качестве катализаторов ионной полимеризации виниловых мономеров.

Приведенные в табл. 2 катализаторы инициируют полимеризацию ММА по анионному механизму. В пользу этого свидетельствуют данные по сополимеризации ММА и стирола в присутствии $[(\text{Me}_3\text{Si})_2\text{N}]_3\text{Ln}$ ($\text{Ln}=\text{Pr}, \text{Yb}$). Образующиеся сополимеры обогащаются ММА (см. рисунок), как и в случае модельной системы ММА — стирол на амиде натрия [5, 6].

Полученный таким образом полимер содержит в качестве концевых групп кремнийорганический фрагмент, обуславливающий биологическую активность.

Неизрасходованный в процессе полимеризации катализатор, равномерно распределенный по всей массе полимера, может усиливать биологическую активность последнего. Использованный нами полимер устойчив на воздухе, а поэтому удобен в обращении. Напротив, композиция, приготовленная из катализатора и полиметилметакрилата, который получен путем термополимеризации ММА, неустойчива на воздухе ввиду легкости гидролиза силиламидного компонента смеси.

Таким образом, полиметилметакрилат, полученный на силиламидных производных самария, эрбия и иттербия, способствует росту костной ткани при ее дефектах, не вызывая побочных явлений. Синтезированные на данных катализаторах полимеры можно использовать в пластике костных полостей без дополнительного введения антисептика. Использованные катализаторы типа $[(\text{Me}_3\text{Si})_2\text{N}]_3\text{Ln}$ проявляют высокую активность при низкотемпературной полимеризации ММА, протекающей по анионному механизму и сопровождающейся образованием блочного полимера.

ЛИТЕРАТУРА

1. Байгожин А. В. // Успехи химии.— 1980.— Т. 49, № 11.— С. 2241—2254.
2. Гостицев В. К., Василькова З. Ф., Вавилова Г. С. // Хирургия.— 1983.— № 6.— С. 91—96.
3. Долгов Б. Н., Харитонова Н. П. // Ленинград. пром.-сть.— 1958.— № 4.— С. 49—54.
4. Малышев Е. С. // Реконструктивно-восстановительная хирургия заболеваний в детском возрасте.— Горький, 1990.— С. 93—97.
5. Семчиков Ю. Д., Жильцов С. Ф., Кашаева В. Н. // Введение в химию полимеров.— М., 1988.— С. 51.

6. Стрелухеев А. А., Деревицкая В. А. // Основы химии высокомолекулярных соединений.— М., 1976.— С. 84.
7. Шустов С. Б., Бочкарев Л. Н., Жильцов С. Ф., Федюшкин И. Л. // Биохимические основы защиты промышленных материалов от биоповреждений.— Горький, 1987.— С. 45—47.
8. Alyes E. C., Bradley D. C., Copperthwaite R. G. // J. Chem. Soc. Dalton Trans.— 1972.— № 14.— P. 1580—1584.
9. Bradley D. C., Ghotra J. S., Hart F. A. // Ibid.— 1973.— № 10.— P. 1021—1023.

Поступила 18.11.92

SYNTHESIS OF PHYSIOLOGICALLY ACTIVE POLYMETHYL METHACRYLATE USING LANTHANOID SILYLAMIDES.

S. F. Zhil'tsov, S. B. Shustov, L. N. Bochkarev, E. S. Malyshev, T. E. Sedova

M. Gorki Pedagogical Institute, Nizhny-Novgorod.

Catalytic activity of silylamide derivatives of three-valent lanthanoids $[(\text{Me}_3\text{Si})_2\text{N}]_3\text{Ln}$ (where $\text{Me}=\text{CH}_3$; $\text{Ln}=\text{Pr}, \text{Sm}, \text{Eu}, \text{Gd}, \text{Tb}, \text{Er}, \text{Yb}$) was studied under conditions of low temperature polymerization of methacrylate. The reaction involved an anion-dependent mechanism and was accompanied by formation of block polymer. The physiological activity of the polymethacrylate produced was manifested as stimulation of the growth rate in bone tissue after its impairments. The organoelement fragment introduced into the polymer was responsible for this kind of activity.

© С. А. ГУЛИЕВА, С. И. САМЕДОВ, 1994

УДК 616.153.915-391-02:615.326:553.9821-092.9-07

С. А. Гулиева, С. И. Самедов

ПЕРЕКИСНОЕ ОКИСЛЕНИЕ ЛИПИДОВ В ПЛАЗМЕ КРОВИ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫХ ЖИВОТНЫХ ПРИ ВОЗДЕЙСТВИИ НА ОРГАНИЗМ НАФТАЛАНОВОЙ НЕФТЬЮ

НИИ курортологии и физических методов лечения, Баку

Согласно современным представлениям, перекисное окисление липидов (ПОЛ) является постоянно протекающим физиологическим процессом, который при его интенсификации участвует в развитии ряда заболеваний [9, 14, 15]. К настоящему времени экспериментальными исследованиями и клиническими наблюдениями доказано, что нафталан и его препараты являются ценными лечебными средствами.

Применение нафталановой нефти (НН) как

Группа животных	МДА, нмоль на 1 мл сыворотки	КД, Д ₂₃₂ на 1 мл плазмы	ГП, 10 ⁻⁸ г-экв на 1 мг липидов
Контрольная	4,79±0,136	1,74±0,023	1,51±0,108
1-я — НН из скважины № 39	3,28±0,158	1,43±0,098	1,06±0,013
<i>p</i>	<0,001	<0,05	<0,01
2-я — НН из скважины № 54	2,70±0,152	1,24±0,013	0,88±0,048
<i>p</i>	<0,001	<0,001	<0,001
3-я — НН из скважины № 88	4,12±0,226	1,69±0,020	1,18±0,068
<i>p</i>	<0,05	>0,05	<0,05

лечебного средства привлекает внимание исследователей к изучению ее механизма действия и биохимических показателей при различных методах ее воздействия на животный организм [1, 4].

В течение ряда лет (1982—1990) занимаясь изучением механизма действия НН, мы убедились в позитивном влиянии этого природного фактора на показатели фракций и жирнокислотный состав липидов [5—7, 18, 19].

Ранее нами было показано, что под влиянием нафталановых аппликаций происходит повышение уровня фосфолипидов, эфиров холестерина и снижение свободного холестерина, незэтерифицированных жирных кислот и триглицеридов, повышение уровня олеиновой, линолевой, линоленовой, арахидоновой кислот и снижение уровня лауриновой, миристиновой, миристолевой, пальмитиновой, пальмитолеиновой, маргариновой, гентадекановой, стеариновой, эйкозодиеновой, эйкозатриеновой кислот [6, 7, 20].

В настоящее время лечебную НН, добытую из разных скважин на территории курорта Нафталан, собирают в единый резервуар и применяют для лечебных целей многократно. По данным литературы [11], лечебная НН, полученная из разных скважин, различается по физико-химическим свойствам, что указывает на необходимость проведения настоящих исследований по изучению отдельных показателей ПОЛ в плазме крови под воздействием НН из различных скважин в эксперименте.

Методика. Настоящие исследования проводены на 40 кроликах (возраст 2—2,5 года, масса тела 3,2—3,6 кг), содержание и кормление которых было одинаковым. Из 40 кроликов сформировали 4 группы по 10 животных в каждой: контрольную и 3 опытные, в которых применяли НН из скважины № 39 (1-я группа), № 54 (2-я группа), № 88 (3-я группа).

Подопытные кролики получали 10 местных аппликаций НН на боковую поверхность тела размером 10×10 см в дозе 1 мл на 1 кг массы. НН находилась на коже в течение 10 мин; после окончания процедуры кроликов обмывали теплой мыльной водой и обтирали специальной бумагой.

Контрольная группа не подвергалась только нафталановым процедурам. Кровь для исследования брали из краевой вены уха кролика. О состоянии процесса ПОЛ в крови кроликов судили по содержанию гидроперекисей (ГП) [17], конъюгированных диенов (КД) [2] и малонового диальдегида (МДА) [3].

Результаты обрабатывали методом вариацион-

ной статистики с использованием критерия Стьюдента.

Результаты и обсуждение. Данные о влиянии НН из различных скважин на содержание ГП, КД и МДА отражены в таблице.

Как видно из результатов наших опытов, после 10-кратного применения НН из различных скважин содержание первичных продуктов ПОЛ (ГП и КД) в крови кроликов по сравнению с контрольными данными снизилось. Так, содержание ГП в цельной крови в 1-й группе снизилось на 29,81% ($p<0,01$), во 2-й — на 41,72% ($p<0,001$) и в 3-й — на 21,86% ($p<0,05$). Уменьшение содержания КД в крови также можно отметить в 1, 2 и 3-й группах соответственно на 17,82% ($p<0,05$), 28,74% ($p<0,001$) и 2,9% ($p>0,05$). Это снижение, как видно в таблице, в 3-й группе было недостоверным ($p>0,05$).

После 10 нафталановых процедур у всех подопытных животных по сравнению с контрольной группой содержание МДА в сыворотке крови достоверно снизилось ($p<0,05$), что составило в 1-й группе 31,53% ($p<0,001$), во 2-й 43,64% ($p<0,001$) и в 3-й 13,99% ($p<0,05$).

Имеются данные литературы, свидетельствующие о том, что увеличение интенсивности ПОЛ обусловливается повышением концентрации активных форм кислорода (O_2NO , H_2O_2), которые вступают в реакцию с ненасыщенными жирнокислотными остатками фосфолипидов мембран [10, 16].

Образующиеся в процессе ПОЛ ГП, КД, МДА и др. являются мутагенами и обладают выраженной цитотоксичностью. Они нарушают процессы гликолиза и окислительного фосфорилирования, ингибируют синтез белка и нуклеиновых кислот, окисляют белковые тиолы и дисульфиды, нарушают секрецию триглицеридов гепатоцитами и т. д. [9, 13].

Согласно данным литературы [12, 13, 21], важную роль в регуляции процессов ПОЛ в организме играют антиоксиданты, предварительное введение которых животным вызывало снижение активности фермента моноаминоксидазы [10].

По нашим данным, НН из различных скважин под влиянием 10-кратных процедур в организме кроликов вызывает некоторое уменьшение продуктов ПОЛ, что больше выражено во 2-й группе опытов.

Необходимо отметить, что при применении НН во всех группах по сравнению с контролем отмечена потеря живой массы тела. В проведенных нами опытах изменения в общем состоянии

подопытных животных не выявлены. Суточное потребление корма не уменьшилось, кролики не снижали своей активности.

Таким образом, результаты настоящих исследований дают возможность отметить положительное влияние НН из различных скважин (№ 39, 54, 88) на образование продуктов ПОЛ в организме экспериментальных животных, что, вероятно, сможет помочь в расшифровке механизма ее лечебного действия, подтверждая наши рекомендации [8] в отношении доставки лечебной НН в ванное здание курорта Нафталан при заболеваниях с нарушением липидного обмена не из общего резервуара, что имеет место в настоящее время, а конкретно из скважины № 54.

ЛИТЕРАТУРА

1. Али-заде М. А. Влияние нафталанов и его фракций на содержание липидов в крови.— Баку, 1970.— С. 3—313.
2. Гаврилов В. Б., Мишкорудная М. И. // Лаб. дело.— 1983.— № 3.— С. 33—36.
3. Гаврилов В. Б., Гаврилова А. Р., Мажуль Л. М. // Вопр. мед. химии.— 1987.— № 1.— С. 118—122.
4. Гулиева С. А. Уникальная лечебная нафталановая нефть.— Баку, 1981.
5. Гулиева С. А., Самедов С. И., Гусейнов Т. Г. и др. // Закавказская конф. патофизиологов, 6-я: Тезисы.— Ереван, 1985.— С. 77—78.
6. Гулиева С. А., Самедов С. И. // Азерб. мед. журн.— 1989.— № 8.— С. 17—23.
7. Гулиева С. А., Самедов С. И. // Вопр. мед. химии.— 1991.— № 3.— С. 43—45.
8. Гулиева С. А., Самедов С. И. Целесообразность применения лечебной нафталановой нефти из скважины № 54 нафталанского промысла при заболеваниях с нарушением липидного обмена: Метод. рекомендации.— Баку, 1991.
9. Давыдов Б. В., Голиков П. П. // Вопр. мед. химии.— 1987.— № 4.— С. 70—73.
10. Джафаров А. И., Магомедов Н. М., Азимова А. М. и др. // Бюл. экспер. биол.— 1988.— № 7.— С. 45—47.
11. Кулиев А. М., Левшина А. М., Кадиров А. Л., Полякова Л. П. // Азерб. нефт. хоз-во.— 1988.— № 6.— С. 56—61.

12. Ланкин В. З. // Биохимия липидов и их роль в обмене веществ.— М., 1981.— С. 75—95.
13. Ланкин В. З., Вихерг А. М., Тихадзе А. К., Бондарь Т. П. // Вопр. мед. химии.— 1989.— № 3.— С. 18—24.
14. Логинов А. С., Джалалов К. Д., Ерин А. Н., Прилипко Л. Л. // Бюл. экспер. биол.— 1986.— № 1.— С. 26—28.
15. Меерсон Ф. З., Коган В. Е., Прилипко Л. Л. и др. // Там же.— 1979.— № 10.— С. 404—406.
16. Меерсон Ф. З. Патогенез и предупреждение стрессорных и ишемических повреждений сердца.— М., 1984.
17. Нейфах Е. А., Коган В. Е. // Биохимия.— 1969.— Т. 34, № 3.— С. 511—517.
18. Самедов С. И. // Эффективность нафталановой терапии при сочетании с другими факторами.— Баку, 1983.— С. 120—135.
19. Самедов С. И. // Вопросы курортного нафталанолечения.— Баку, 1984.— С. 88—101.
20. Самедов С. И. // Нафталанолечение некоторых болезней суставов, кожи и периферической нервной системы.— Баку, 1987.— С. 53—63.
21. Фридрих И. // Свободные радикалы в биологии: Пер. с англ.— М., 1979.— С. 272—314.

Поступила 12.04.93

LIPID PEROXIDATION IN BLOOD PLASMA OF ANIMALS TREATED WITH NAPHTHALANE OIL.

S. A. Gulieva, S. I. Samedov

Institute of Health Resort and Physical Methods of Treatment, Baku.

40 rabbits were used in the experiments, where 10 animals were in control group, and 3 groups of the animals were treated with naphthalane oil obtained from various pit-holes NN 39, 54 and 88. The treatment course included 10 applications of naphthalane oil, which was placed on lateral body surface, 10×10 cm, a dose of 1.0 ml/kg, within 10 min. A state of lipid peroxidation was evaluated by measurement of hydroperoxides, diene conjugates and malonic dialdehyde in rabbit blood. Some decrease in content of lipoperoxides was observed in rabbits after the course of naphthalane oil treatment and the oil from the pit-hole 54 exhibited the highest effect. These results may be involved in evaluation of the naphthalane oil medicinal effects as well as in working out recommendations to use the naphthalane oil not from usual reservoir, but namely from pit-hole 54 for treatment of patients with impaired lipid metabolism.

МЕТОДЫ БИОХИМИЧЕСКИХ ИССЛЕДОВАНИЙ

© Г. Ю. МАЛЬЦЕВ, А. В. ВАСИЛЬЕВ, 1994

УДК 616.155.1-008.931:577.152.193]-074

Г. Ю. Мальцев, А. В. Васильев

СПОСОБ ОПРЕДЕЛЕНИЯ АКТИВНОСТИ КАТАЛАЗЫ И СУПЕРОКСИДИДИСМУТАЗЫ ЭРИТРОЦИТОВ НА АНАЛИЗАТОРЕ ОТКРЫТОГО ТИПА

Институт питания РАМН, Москва

Существующий спектр методов определения активности каталазы (КФ 1.11.1.6) очень широк. Для рутинных исследований наибольшее применение находят спектрофотометрические, титриметрические и полярографические процедуры [1]. Широко принятая ранее методика прямого измерения убыли H_2O_2 при 240 нм [2], основанная

на очень высоком значении константы скорости каталазной реакции, не применима для автоматизированного определения из-за оптических ограничений для существующих биохимических анализаторов. Модификация методики [6], основанная на фиксации комплекса H_2O_2 — молибдат при 405 нм, также имеет ограничения для большинства анализаторов.

Проявление пероксидазной активности каталазы, в частности, в отношении этанола [11] создает возможности для непрерывного кинетического анализа. При этом целесообразно рассмотреть возможность использования индикаторных реакций, например обратимой алкогольдегидрогеназной реакции, широко применяемой в ряде тестов в сочетании с каталазой для улавливания H_2O_2 , в частности в тесте определения мочевой кислоты [5].

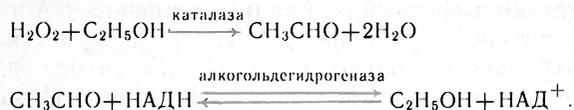
Определение активности супероксиддисмутазы

(СОД; КФ 1.15.1.1) в основном базируется на непрямом методе торможения скорости реакции в оксидоредуктазных системах, сопровождающихся образованием супероксид-анион-радикала, например в системе генерации ксантин — ксантиноксидаза с цитохромом с в качестве акцептора [9], в том числе в автоматизированном варианте [7]. Можно утверждать, что выбор методики измерения для рутинных исследований часто диктуется экономическими соображениями, что особенно характерно для прямых методов измерения [4, 8], в то время как непрямые методы присущи довольно однотипные недостатки, связанные с учетом нелинейности базовой реакции, учетом неспецифических редокс-компонентов, оценкой использования деструктурирующих процедур типа предварительной экстракции гемоглобина смесью хлороформ — этанол [9].

В данной работе была поставлена задача разработать измерение активности СОД при минимуме деструктивных воздействий на эритроциты на основе ранее предложенного способа генерации супероксид-анион-радикалов в системе НАДН — феназинметосульфат (ФМС) — нитросиний тетразолий [10] с использованием полуавтоматизированных систем измерения.

Методика. Исследования проводили на гемолизатах эритроцитов, полученных из гепаринизированной крови человека. После центрифугирования проб при 1500 г в течение 10 мин отбирали эритроциты из середины пробирки и разводили бидистиллированной водой, после чего замораживали при -12 — -15 °С.

Активность каталазы определяли на основе схемы:



Образующийся ацетальдегид улавливали в обратимой индикаторной реакции, катализируемой алкогольдегидрогеназой при участии НАДН.

Раствор 1: 50 мл 67 мМ Na-фосфатного буфера pH 7,4 смешивали с 1 мл 36,8 мМ НАДН, 1 мл раствора алкогольдегидрогеназы ($\geq 36,8$ U/мл). Смесью стабильна 2—3 дня при -2 — -8 °С. Раствор 2: 0,3 % раствор H_2O_2 в 70 % этаноле непосредственно перед определением. 0,49 мл раствора 1 смешивали с 0,01 мл гемолизата эритроцитов (разведение в 160 раз), реакцию запускали 0,05 мл раствора 2. Режим измерения: время задержки 20 с, время измерения 120 с, 37 °С, режим постоянной скорости, 340 нм.

Активность СОД определяли в соответствии с вышеупомянутым методом [10] путем пропорционального пересчета до конечного объема 0,52 мл реакционной смеси. При этом установлены следующие пропорции и последовательности добавок: к 0,35 мл 2 мМ пиродифосфатного буфера с 2 мМ ЭДТА — Na_2 pH 8,3 добавляли 0,02 мл гемолизата эритроцитов (разведение в 80 раз), 0,05 мл 0,05 мМ нитросинего тетразолия в буфере и 0,05 мл 2,25 мкМ НАДН в буфере. Реакцию запускали добавлением 0,05 мл 2,2 мкМ ФМС. Измерения проводили на ФП-901 по схеме 9 одновременных определений. Режим измерения: время задержки 10 с, время измере-

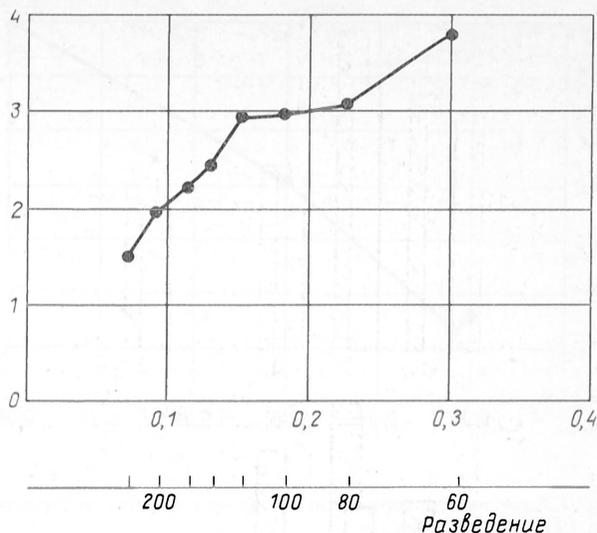


Рис. 1. Зависимость активности каталазы эритроцитов от содержания гемолизата.

По оси абсцисс — содержание гемолизата, мкл эритроцитов/мл среды; по оси ординат — активность каталазы, ммоль/мин на 1 мл гемолизата.

ния 180 с, 37 °С, режим постоянной скорости, 540 нм.

Использовали следующие реактивы: НАДН («Serva»), алкогольдегидрогеназа дрожжей (≤ 25 U на 1 мкг белка) («Reanal»), ФМС (КО ИРЕА), нитросиний тетразолий («Serva»), СОД из *E. coli* (≤ 75 U/мг) («Serva»).

Измерения проводили на анализаторах ФП-901 фирмы «Лабсистем» и анализаторе «Клиникон» фирмы ЛКБ.

Результаты и обсуждение. При определении активности каталазы на ФП-901 практически все исследованные гемолизаты с разведением в 160 раз имели линейную кинетику убывания оптической плотности при 340 нм от начального значения около 1,2 А, что контролировали на линейном анализаторе «Оливетти М-20» с программой визуализации данных, разработанной фирмой «Лабсистем».

Зависимость скорости пероксидазной реакции

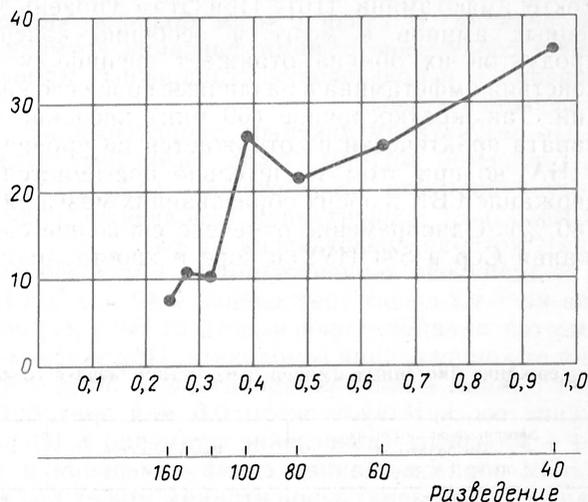


Рис. 2. Зависимость торможения скорости реакции от концентрации гемолизата эритроцитов.

По оси абсцисс — концентрация гемолизата, мкл эритроцитов на 1 мл среды; по оси ординат — торможение, %.

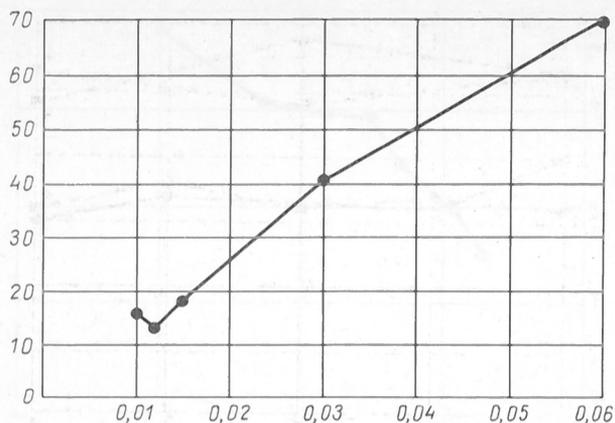


Рис. 3. Зависимость торможения скорости реакции от содержания СОД фирмы «Serva».

По оси абсцисс — содержание СОД, U на пробу; по оси ординат — торможение, %.

каталазы эритроцитов от содержания гемолизата представлена на рис. 1.

Имеется удовлетворительная линейная закономерность реакции, позволяющая использовать данный способ для рутинных измерений. При этом не следует пренебрегать величиной неспецифического фона, определяемого при экстраполяции прямой на ось ординат, причем, как показали неприведенные данные, на анализаторе с боковым ходом луча «Клиникон» эта компонента была выше. Формула расчета активности на ФП-901 такова: активность каталазы (в ммоль/мин на 1 мл гемолизата) = $(A_{\text{ин}} - A_{\text{фон}}) \times 0,76/5,66 \cdot v_{\text{ин}}$ (в мл). Предварительный расчет по спрямленной кривой показывает, что активность каталазы эритроцитов после вычета неспецифического фона составляет в среднем 225 кУ/мл эритроцитной массы, что укладывается в рекомендованные значения нормы — 207—290 ммоль/мин на 1 мл эритроцитов, полученные прямым методом по скорости убывания H_2O_2 на отмытых эритроцитах [3].

При определении активности СОД трудности вызывает оценка нелинейности базовой кривой вследствие невозможности точной оценки порядка реакции. В связи с этим большое значение имеет соблюдение режима фиксации времени измерения и использования стандартных процедур усреднения кривых.

По результатам линейной аппроксимации, осуществляемой ФП-901, была вычислена зависимость процента торможения $(\Delta A_{\text{проба}}/\Delta A_{\text{фон}} \times 100 \%)$ от концентрации гемолизата (разведения), которая представлена на рис. 2.

В диапазоне концентраций до 1 мкл эритроцитов на 1 мл среды (разведение в 40 раз и выше) имеется линейная зависимость степени торможения от концентрации гемолизата. При экстраполяции прямой можно установить, что 50 % торможение соответствует около 0,6 мкл эритроцитов на 1 мл среды (разведение примерно в 60 раз). Таким образом, данная схема измерения в указанных диапазонах концентраций может быть использована для измерения активности СОД. Расчет по традиционной формуле: активность (в усл. ед.) = $(1 - A_{\text{ин}}/A_{\text{фон}}) \cdot 2 \cdot v_{\text{смеси}}/v_{\text{пробы}} \cdot \text{разв.}$ [11] — дает среднюю величину около 1600 усл. ед. на

1 мл эритроцитов, что вполне согласуется с данными литературы.

Для сопоставления данных с традиционными единицами активности исследовали зависимость степени торможения реакции от содержания коммерческого препарата СОД (рис. 3). Несмотря на некоторый разброс данных, можно отметить линейный характер зависимости; 50 % торможение соответствует 0,04 ед. в пробе, что в 25 раз выше традиционных единиц [9]. Полученная кривая в принципе может быть использована в качестве калибровочной кривой для расчета.

Таким образом, предложенные способы определения активности каталазы и СОД при минимальном деструктивном воздействии на эритроцит могут быть использованы в рутинных исследованиях на полуавтоматических анализаторах типа ФП-901.

ЛИТЕРАТУРА

1. Aebi H., Suler H. // Biochemical Methods in Red Cell Genetics / Ed. J. J. Yunis.— 1969.— P. 255—285.
2. Aebi H. // Methods in Enzymatic Analysis / Ed. H. V. Bergmeyer.— 1974.— Vol. 2.— P. 673—678.
3. Balcerzak S. P., Jensen W. N. // Scand. J. Hemat.— 1966.— Vol. 3.— P. 245—256.
4. Bolann B. J., Ulvik R. J. // Clin. Chem.— 1991.— Vol. 37.— P. 1993—1998.
5. Freichtmeier T., Wrenn H. // Amer. J. clin. Path.— 1955.— Vol. 25.— P. 833.
6. Goth L. // Clin. chim. Acta.— 1991.— Vol. 196.— P. 143—152.
7. L'Abbe M. R., Fisher P. W. // Clin. Biochem.— 1986.— Vol. 19.— P. 175—178.
8. Marklund S. // J. biol. Chem.— 1976.— Vol. 251.— P. 7504—7507.
9. McCord J. M., Fridovich I. // Ibid.— 1968.— Vol. 243.— P. 5753—5763.
10. Niashikimi M., Rao N. A., Jagi K. // Biochem. biophys. Res. Commun.— 1972.— Vol. 46.— P. 849—854.
11. Oshino N., Chance B. // Arch. Biochem.— 1973.— Vol. 154.— P. 117—131.

Поступила 15.06.93

ESTIMATION OF ERYTHROCYTE CATALASE AND SUPEROXIDE DISMUTASE ACTIVITIES USING THE OPEN TYPE ANALYZER.

G. Yu. Maltsev, A. V. Vasilyev

Institute of Nutrition, Russian Academy of Medical Sciences, Moscow.

Human erythrocyte catalase activity was studied involving the peroxidase reaction with ethanol and the reverse alcohol dehydrogenase reaction. The adequate kinetic parameters of the reaction were obtained under mild conditions of hemolysate preparation. Estimation of catalase activity in series of hemolysates enabled us to measure the activity values near 220.0 kU/ml of erythrocytes which corresponded to those in literature. Adaptation of the superoxide dismutase activity evaluation in erythrocytes was carried out using the basic system NADH-phenazine methasulfate-tetrazolium blue and the analyzer FP-901 equipped for nine simultaneous measurements. The rate of base reactions was plotted and the linear correlation was found between the reaction inhibition per cent and content of erythrocyte hemolysate and of commercially available preparation of superoxide dismutase. The procedures are simple and reproducible and may be used in routine studies of antioxidants.

Г. Ю. Мальцев, Л. А. Орлова

ОПТИМИЗАЦИЯ ОПРЕДЕЛЕНИЯ АКТИВНОСТИ ГЛУТАТИОНРЕДУКТАЗЫ ЭРИТРОЦИТОВ ЧЕЛОВЕКА НА ПОЛУАВТОМАТИЧЕСКОМ АНАЛИЗАТОРЕ

Институт питания РАМН, Москва

Оценка активности глутатионредуктазы (ГР; КФ 1.6.4.2), несмотря на простоту и множество методик измерения [5, 7, 9—11], имеет существенные вариации в окончательных результатах [2]. Причиной различий получаемых результатов, по всей видимости, является нестабильность апофермента и условий его перехода в голоформу [4].

Большинство из предложенных методик определения активности ГР в значительной степени учитывает эти особенности путем создания реакционных и лизирующих растворов с добавлением ЭДТА, дигитонина и др., поскольку направлены на изучение ФАД-активационного эффекта в качестве критерия обеспеченности рибофлавином [3, 4, 6, 8].

При исследовании антиоксидантной функции ГР эритроцитов, напротив, возникает задача простой и надежной оценки активности голофермента, имеющего сравнительно медленную кинетику при ограниченном объеме гемолизата в реакционной среде, что в свою очередь диктует необходимость автоматизации метода измерения [1]. При этом существует задача свести к стандартному минимуму деструктивные воздействия на структуру эритроцита после процедуры гемолиза.

Цель данной работы заключалась в исследовании оптимальных условий определения активности ГР в традиционном режиме с учетом перехода на полуавтоматический способ определения.

Методика. Исследования выполнены с использованием полученных из гепаринизированной крови эритроцитов человека. Исходные гемолизаты готовили разведением осажденной при 1500 g в течение 10 мин эритроцитарной массы

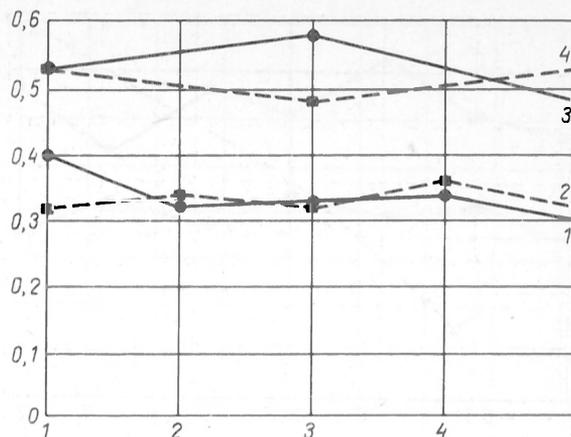


Рис. 1. Зависимость активности ГР и ФАД — ГР от времени преинкубации в 20 и 50 мМ трис-НСl pH 7,6.

По оси абсцисс — время инкубации, мин; по оси ординат — активность ГР, мкмоль/мин на 1 мл эритроцитов. 1 — 20 мМ трис-НСl; 2 — 50 мМ трис-НСl; 3 — 20 мМ трис-НСl+ФАД; 4 — 50 мМ трис-НСl+ФАД. Добавка ФАД — 0,05 мл 0,27 мМ раствора. Условия реакции: 37 °С, двухволновой кинетический режим с $\lambda_1=347$ нм и $\lambda_2=382$ нм. Приведены средние данные 3 определений.

дистиллированной водой в соотношении 1:1 и замораживанием при $-12-15$ °С.

Определение активности ГР осуществляли на основе опубликованного ранее метода [10] с некоторыми модификациями, описанными в тексте. В типичном определении 3 мл исследуемого буфера смешивали с 0,05 мл гемолизата, 0,05 мл 2 мМ НАДФН, реакцию запускали 0,05 мл 7,4 мМ окисленного глутатиона.

Регистрацию реакции проводили в кинетическом режиме на спектрофотометре «Хитачи-556» в двухволновом режиме и на биохимических анализаторах «Клиникон» (фирма ЛКБ) и ФП-901 (фирма «Лабсистем»).

Использовали реактивы фирм: трис («Serva»), окисленный глутатион («Reanal»), НАДФН («Serva»), ФАД («Fluka»).

Результаты и обсуждение. Исследовали кинетику ГР-реакции в зависимости от типа, pH, ионной силы буфера, а также от добавок ЭДТА — Na_2 . Результаты и условия измерения приведены в таблице.

Влияние состава буферной смеси в инкубационной среде на активность ГР эритроцитов человека

Калий-фосфатный буфер, мМ	ГР, мкмоль/мин на 1 мл эритроцитов		трис-НСl-буфер, мМ	ГР мкмоль/мин на 1 мл эритроцитов	
	-ЭДТА	+ЭДТА		-ЭДТА	+ЭДТА
pH 6,8:					
60	0,36	0,40	50	0,34	0,34
30	0,22	0,22	20	0,24	0,20
20	0,18	—	10	0,14	0,15
10	0,12	—			
pH 7,4:					
60	0,32	0,34	50	0,30	0,33
30	0,16	—	20	0,18	0,17
20	0,15	—	10	0,14	0,16
10	0,10	—			
pH 7,6:					
60	0,30	0,28	50	0,30	0,28
30	0,18	—	20	0,24	0,18
20	0,14	—	10	0,12	0,12
10	0,10	—			

Примечание. Средний из 3 проб гемолизат (1:19). Добавки: 0,05 мл 80 мМ ЭДТА — Na_2 . Условия измерения: преинкубация 1,5 мин, 37 °С, $\lambda_1=347$ нм, $\lambda_2=382$ нм (опорная), $\epsilon=4,75$ ммоль $^{-1}$ ·см $^{-1}$ (экспериментально). Приведены средние данные 3 измерений.

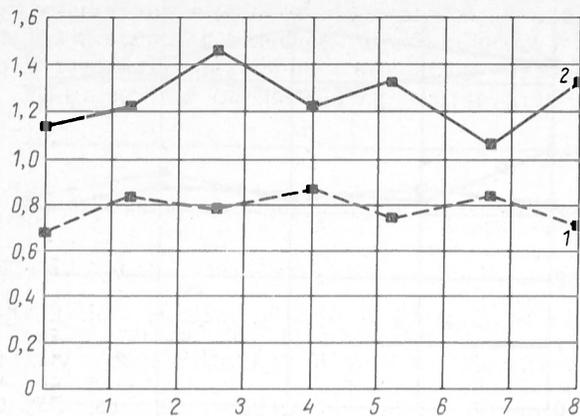


Рис. 2. Зависимость ГР-реакции от содержания ФАД.

По оси абсцисс — содержание ФАД; мкмоль на 1 мл среды; по оси ординат — активность ГР, мкмоль/мин на 1 мл эритроцитов. Реакционная смесь содержала 3 мл 20 или 50 мМ трис-НСI-буфера рН 7,6, 0,05 мл 7,4 мМ окисленного глутатиона, 0,05 мл 2 мМ НАДФН, 0,05 мл гемолизата отмытых эритроцитов (20). Условия измерения: время преинкубации 3 мин, 37 °С, двухволновой кинетический режим с $\lambda_1=347$ нм и $\lambda_2=390$ нм. Приведены средние данные по 3 гемолизатам. Остальные обозначения те же, что на рис. 1.

Отмечено, что снижение молярности буфера приводит к снижению активности ГР. ЭДТА не оказывает влияния на течение реакции. Полученные данные дают основание использовать в дальнейшем 0,05 М трис-НСI-буфер рН 7,6 в качестве реакционной среды для измерения активности ГР. В отличие от обычно используемых реакционных сред с высокой ионной силой [4, 5, 7] данные условия могут быть более предпочтительны в плане стабильности хранения реагентов и условий измерения.

Зависимость активности ГР и ФАД — ГР от времени преинкубации без субстрата в 20 и 50 мМ трис-НСI-буфере представлена на рис. 1.

По всей видимости, режим преинкубации 2—3 мин можно считать достаточно оптимальным для измерения. Различия по активности в 20 и 50 мМ трис-НСI сохраняются. Мы исследовали зависимость ГР-реакции от со-

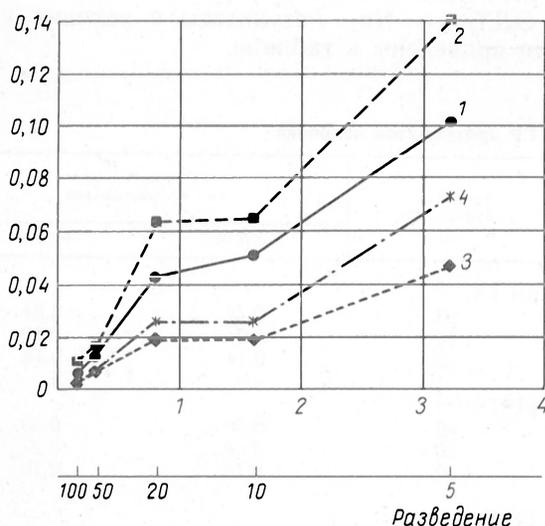


Рис. 3. Зависимость активности ГР- и ФАД — ГР-реакций от разведения гемолизата эритроцитов.

По оси абсцисс — содержание гемолизированных эритроцитов в 1 мл реакционной среды (1), разведения гемолизата (2); по оси ординат — активность, мкмоль НАДФН в 1 мин на 1 мл гемолизата указанных разведений. 1 и 2 — 50 мМ трис-НСI (+ФАД и —ФАД). 3 и 4 — 20 мМ трис-НСI (+ФАД и —ФАД). Приведены средние данные по 5 смешанным гемолизатам.

держания ФАД в реакционной среде при 3-минутной преинкубации (рис. 2).

Очевидно, что содержание ФАД в среде инкубации в области обычно применяемых концентраций не влияет на условия измерения активности ГР. Этот эффект можно объяснить также отсутствием апофермента, разрушенного в процессе хранения гемолизата [4]. В данном опыте следует отметить более высокие значения активности в пробах с отмытыми эритроцитами. Однако еще нет достаточных оснований для введения дополнительной процедуры отмытки при оценке активности голофермента.

Зависимость скорости ГР-реакции от разведения гемолизата эритроцитов и добавок ФАД представлена на рис. 3.

В целом отмечается линейный характер зависимости, за исключением отклонения показателей в области разведения гемолизата 1:19. Этот эффект не зависит от наличия ФАД в среде инкубации и молярности буфера. В данном случае не представляется возможным дать объяснение отклонению от закономерности, зависящей от разбавления материала. Необходимы более тщательные исследования процедур подготовки проб в плане условий хранения, особенно условий замораживания.

На основании данных, полученных макрометодом, была проведена адаптация методики для анализаторов открытого типа — «Клиникон» (ЛКБ) и ФП-901 («Лабсистем»).

Перед серией измерений готовили буферно-коферментную смесь в минимальной пропорции: 3 мл 50 мМ трис-НСI-буфера рН 7,6 на 0,05 мл 4 мМ НАДФН. В измерительные кюветы вносили 0,48 мл буферно-кофакторной смеси, 0,02 мл перемороженного гемолизата эритроцитов в разведении 1:19 (исходное разведение 1:1), инкубировали 2—3 мин при 37 °С (на анализаторе «Клиникон» дольше ввиду последовательной подачи штативов). Реакцию запускали 0,1 мл 3,7 мМ окисленного глутатиона. Условия измерения: время задержки 30 с, время измерения 240 с, режим постоянной скорости, 37 °С. Начальные значения оптической плотности обычно не превышали

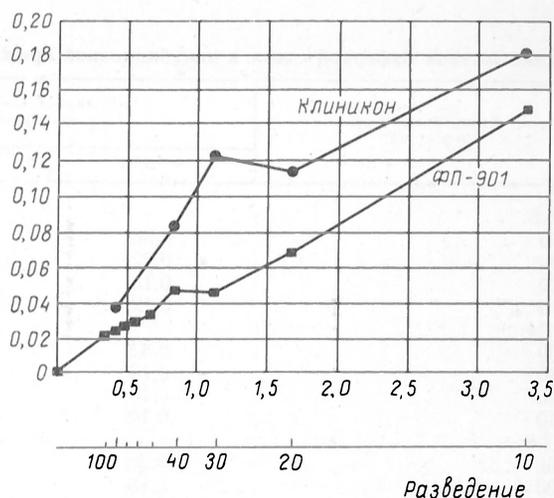


Рис. 4. Зависимость активности ГР-реакции от разведения гемолизата на двух типах анализаторов. Приведены средние данные по 6—7 смешанным гемолизатам.

Обозначения те же, что на рис. 3.

1,3 А, кинетика реакции имела линейный характер, что контролировали на онлайн-процессоре «Оливетти М-20» по специальной программе для анализатора ФП-901. Соотношение эритроциты (в мкл): НАДФН (в мкмоль): окисленный глутатион (в мкмоль) в реакционной среде соответственно составило 1,0:0,03:0,37 (глутатион: НАДФН=12:1).

Исследование зависимости активности фермента от разведения гемолизата было проведено на двух типах анализаторов (рис. 4).

Характер линейной зависимости в исследуемом диапазоне в основном сохраняется. Если для анализатора ФП-901 зависимость вполне приемлема по характеру и абсолютным значениям активности, то для анализатора типа «Клиникон» следует учитывать следующее: при боковом ходе луча, как и в традиционных методиках, существует неспецифическая компонента за счет оседания частиц гемолизата, что на приведенном рисунке может быть условно определено экстраполяцией на ось ординат. Анализатор ФП-901 благодаря схеме хода луча «через дно» позволяет минимизировать эту компоненту. Кроме того, схема одновременной регистрации реакции в 9 ячейках является более удобной в плане стандартизации времен преинкубации.

Следует отметить, что эффект отклонения в зоне разведений 20—40, отмеченный ранее, воспроизводится на приборе с боковым ходом луча («Клиникон»).

Предложенная схема измерения на ФП-901 отличается от ранее предложенной [1] типом буфера, последовательностью введения в инкубационную среду реакционных компонентов, соотношением реагентов и режимом измерения с учетом современных средств контроля за ходом реакции, разработанных фирмой «Лабсистем». Необходимо отметить, что предлагаемая схема измерения активности ГР эритроцитов может быть предназначена для рутинных исследований анти-

оксидантных систем, в то время как при оценке ФАД-активационного эффекта для оценки обеспеченности организма рибофлавином следует руководствоваться специальными методиками.

ЛИТЕРАТУРА

1. Верболович В. П., Подгорная Л. М. // Лаб. дело.— 1987.— № 2.— С. 17—20.
2. Юсупова Л. Б. // Там же.— 1989.— № 4.— С. 19—21.
3. Bamtji M. S. // Clin. chim. Acta.— 1969.— Vol. 26.— P. 263.
4. Becker K., Krebs B., Schirmer R. H. // Int. J. Vitam. Nutr. Res.— 1991.— Vol. 61.— P. 186—187.
5. Beutler E., Yeh M. K. H. // Blood.— 1963.— Vol. 21.— P. 573.
6. Beutler E. // Science.— 1969.— Vol. 165.— P. 613.
7. Erden M., Bon N. M. // Biochem. med.— 1984.— Vol. 31, N 2.— P. 217—227.
8. Glatzle D., Weber F., Wiss O. // Experientia (Basel).— 1968.— Vol. 24.— P. 1122.
9. Manso C., Wroblewsky F. // J. clin. Invest.— 1958.— Vol. 37.— P. 214.
10. Tillotson J. A., Saubertlich H. S. // J. Nutr.— 1971.— Vol. 101.— P. 1549.
11. Wendel P. L. // Biochim. biophys. Acta.— 1968.— Vol. 159, N 1.— P. 179—181.

Поступила 02.06.93

OPTIMUM ESTIMATION OF GLUTATHIONE REDUCTASE ACTIVITY IN HUMAN ERYTHROCYTES USING A HALF-AUTOMATIC ANALYZER.

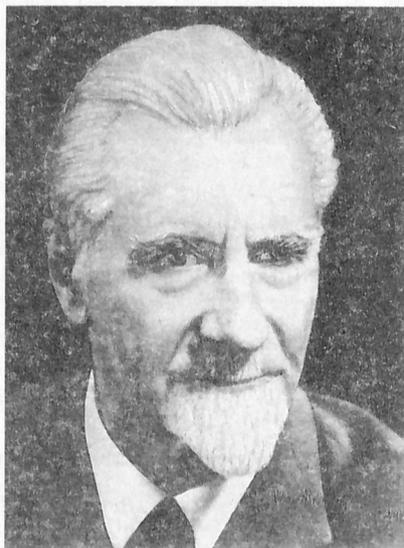
G. Yu. Maltsev, L. A. Orlova

Institute of Nutrition, Russian Academy of Medical Sciences, Moscow.

A relatively simple procedure was developed for estimation of the glutathione reductase activity using half-automatic analyzer. The procedure involved: preparation of hemolysates with minimal rate of erythrocyte destruction; substitution of buffers with high ionic strength for 0.05 M Tris-HCl buffer not containing EDTA. Most effective period of preincubation was found; dependence of the reaction rate on FAD was studied. The procedure developed was approved using two types of half-automatic analyzer and the model FP-901 was shown to be the most suitable for estimation of the glutathione reductase holoenzyme activity.

УДК 616-008.9:92 Северин

ПАМЯТИ АКАД. СЕРГЕЯ ЕВГЕНЬЕВИЧА СЕВЕРИНА (1901—1993 гг.)



15 августа 1993 г. на 92-м году жизни скончался выдающийся деятель российской науки и образования Сергей Евгеньевич Северин. Многолетняя неутомимая научная, педагогическая и общественная деятельность Сергея Евгеньевича оказала огромное влияние на развитие биохими-

ческой науки в нашей стране. Достаточно перечислить только некоторые стороны его официальной деятельности, чтобы представить масштаб этого влияния. Он был основателем и в течение более 50 лет бессменным заведующим кафедрой биохимии Московского университета им. М. В. Ломоносова, президентом биохимического общества при президиуме Российской академии наук, главным редактором журналов «Вопросы медицинской химии» и «Биохимия», академиком двух российских академий, почетным членом зарубежных академий и биохимических обществ, членом редколлегий отечественных и международных журналов. Несколько поколений российских биохимиков, среди которых академики, директора институтов, заведующие кафедрами и лабораториями, научные работники и преподаватели, связавшие свою судьбу с биохимией под незабываемым впечатлением от блестящих лекций Сергея Евгеньевича в Московском университете. Огромная эрудиция, живой интерес ко всем сторонам жизни, мудрость, доброжелательность и личное обаяние, которые Сергей Евгеньевич сохранил до последнего дня своей долгой и яркой жизни, навсегда сохранятся в памяти всех, кому выпало счастье общаться с этим выдающимся человеком.

*Сотрудники кафедры биохимии
МГУ им. М. В. Ломоносова*

СОДЕРЖАНИЕ

Обзор

Солдатова А. М., Воскресенский О. Н. Витамины антиоксидантного действия и возрастная дистрофия сетчатки 2

Оригинальные статьи

- Доведова Е. Л. К механизму действия амфетамина на нейромедиаторные системы мозга 7
- Голиков П. П., Николаева Н. Ю. Модуляция глюкокортикоид-рецепторного взаимодействия этазол-натрием 9
- Джавадов С. А., Эйюбова А. А., Мамедова Л. К., Гельфгат Е. Б., Погача Г. Количественный анализ фосфолипидного состава миокарда при экспериментальном сахарном диабете: влияние тотальной ишемии 12
- Козлов Ю. А., Волкова Н. П., Байков А. Н., Новицкий В. В. Состояние синтеза нуклеиновых кислот и суммарных белков в органах гемопоэза у мышей с аллоксановым диабетом 19
- Васильев А. В., Самсонов М. А., Покровский В. Б., Покровская Г. Р., Левачев М. М. Характеристика системы гуморального иммунитета и процессов перекисного окисления липидов у лиц, проживающих на территориях, загрязненных радионуклидами 21
- Чиркин А. А., Коневалова Н. Ю., Гребенников И. Н., Куликов В. А., Филипенко Г. В. Действие полиненасыщенного фосфатидилхолина на активность антиоксидантных и липолитических ферментов при алиментарной гиперхолестеринемии у облученных крыс 24

CONTENTS

Review of Literature

Soldatova, A. M., Voskresensky, O. N. The antioxidation vitamins and age-dependent dystrophy of the retina 2

Original Papers

- Dovedova, E. L. Effect of amphetamine on the brain neurotransmitter systems 7
- Golikov, P. P., Nikolaeva, N. Yu. Sodium sulfaethidole modulation of the glucocorticoid-receptor interaction 9
- Dzhavadov, S. A., Eiyubova, A. A., Mamedova, L. K., Gelfgat, Ye. B., Pogacha, G. Quantitative analysis of myocardial phospholipid composition in experimental diabetes: impact of total ischemia 12
- Kozlov, Yu. A., Volkova, N. P., Baykov, A. N., Novitsky, V. V. Synthesis of nucleic acids and total proteins in hemopoietic tissues of mice with alloxan diabetes 19
- Vasilyev, A. V., Samsonov, M. A., Pokrovsky, V. B., Pokrovskaya, G. R., Levachev, M. M. The system of humoral immunity and lipid peroxidation in persons living in radionuclide-contaminated areas 21
- Chirkin, A. A., Konevalova, N. Yu., Grebennikov, I. N., Kulikov, V. A., Filipenko, G. V. Effect of polyunsaturated phosphatidylcholine on the activity of antioxidative and lipolytic enzymes in irradiated rats with alimentary hypercholesterolemia 24