

Том 40

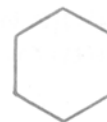
выпуск 5

СЕНТЯБРЬ—ОКТЯБРЬ

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. ЛРЧАКОВ, И. П. АШМАРИН, Т. Т. БЕРЕЗОВ,
Ю. В. БУКИН, А. В. ВАСИЛЬЕВ, Е. Н. ГЕРАСИМОВА, В. З. ГОРКИН, А. Д. ДУРНЕВ,
И. Б. ЗБАРСКИЙ, В. Л. КОЗЕЛЫЦЕВ (ответственный секретарь), А. Н. КЛИМОВ,
Б. Ф. КОРОВКИН, Л. А. ЛОКШИНА, В. П. ОРЕХОВИЧ, Л. Ф. ПАПЧЕНКО,
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)
ЯСЛАЙТИС А. А. (Вильнюс)

Адрес редакции журнала:

Москва, 109801, Солянка, 14,

РАМН

Тел.: 917-16-44

Зав. редакцией Э. А. Половинко



© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 1994

УДК 615.356:577.161.21.015.4.07

Л. Б. Бондаренко, О. В. Харченко,
И. А. Бутович

ГОРМОНАЛЬНО-AКТИВНАЯ ФОРМА ВИТАМИНА D₃—1,25-ДИОКСИВИТАМИН D₃—ИНГИБИТОР ЛЕЙКОЦИТАРНОЙ ЛИПОКСИГЕНАЗЫ

Институт биоорганической химии и нефтехимии АН Украины,
Киев

Механизм прямого действия 1,25-диоксивитамина D₃ (1,25(OH)₂D₃) на процессы пролиферации и дифференциации клеток, обуславливающего его иммуномодулирующий и антиопухолевый эффекты, остается во многом не выясненным. Исследования последних лет показали, что весь спектр биологической активности данного метаболита витамина D₃ не может быть объяснен исключительно его регулирующим воздействием на гомеостаз кальция в организме [1]. Возможно, участие 1,25-диоксивитамина D₃ в процессах роста и развития клеток опосредовано влиянием на обмен липидов в мембранных структурах [12]. 1,25-Диоксивитамин D₃ изменяет активность мембранных ферментов, состав фосфолипидов мембраны и ее текучесть [12]. Помимо этого, влияние метаболитов витамина D₃ на иммунную систему может быть обусловлено и их участием в регуляции каскада арахидоновой кислоты. 1,25-Диоксивитамин D₃ в культуре гладкомышечных клеток аорты кролика стимулирует продукцию простаглицина, активность липоксигеназы (опосредованно, путем повышения концентрации ионов кальция в клетке) [13]. Различные аналоги витамина D₃ также способны в культуре клеток человеческих синовиоцитов стимулировать или подавлять активность циклооксигеназы [11]. Отмечено регулирующее действие 1,25-диоксивитамина D₃ на дифференцировку моноцитов в макрофаги, тесно связанное с его воздействием на обмен арахидоновой кислоты, активность липоксигеназ и биосинтез лейкотриенов. Повышая внутриклеточную концентрацию ионов кальция, 1,25-диоксивитамин D₃ стимулирует метаболизм 5-липооксигеназы и белка, активирующего этот фермент в культуре периферических моноцитов крови, находящихся на стадии дифференцировки в зрелые макрофаги [8].

Однако все вышеприведенные результаты были получены на культурах клеток с высоким содержанием кальция как в средах, так и внутри клеток. Таким образом, при этом невозможно разделить прямой и опосредованный кальцием эффекты 1,25-диоксивитамина D₃ на ферменты арахидонового каскада. Для выявления непосред-

ственного воздействия 1,25-диоксивитамина D₃ необходимо использование системы *in vitro*, не содержащей ионы кальция. Именно такая система была использована нами [3] при изучении влияния витамина D₃ и его гормонально-активной формы—1,25-диоксивитамина D₃ на ключевой фермент биосинтеза лейкотриенов из арахидоновой кислоты—5-липоксигеназу (из клубней картофеля). Полученные нами результаты свидетельствуют о способности витамина D и его производного существенно ингибировать активность данного фермента уже в концентрациях 10⁻⁸—10⁻⁷ М.

В связи с важной ролью лейкотриенов в регуляции иммунных ответов организма (воспалительные и аллергические реакции) [10] особый интерес представляет выяснение прямого эффекта 1,25-диоксивитамина D₃ (также сильного иммуномодулятора [1]) на липоксигеназу животного происхождения, в особенности из клеток иммунной системы. В связи с этим целью наших исследований явилось изучение характера воздействия гормонально-активной формы витамина D₃ на липоксигеназу из лейкоцитов крови свиньи.

Методика. Липоксигеназа из лейкоцитов крови свиньи была выделена по модифицированному нами методу [7] с использованием ультрацентрифугирования при 100 000 g и DEAE-хроматографии. В работе использованы следующие реактивы: линолевая кислота и луброл PX (фирма «Sigma», США), 1,25-диоксивитамин D₃ (масляный раствор; фирма «Hoffmann—La Roche», Швейцария), неорганические кислоты, щелочи и соли марки х. ч.

1,25-Диоксивитамин D₃ вводили в дозах, обеспечивающих его конечную концентрацию в пробах 10⁻⁹, 10⁻⁸, 10⁻⁷ М (обычно применяемых при работе с системами *in vitro*) [1]. В контроль добавляли соответствующее количество чистого растворителя.

Скорость ферментативного окисления линолевой кислоты лейкоцитарной липоксигеназой определяли спектрофотометрически по степени возрастания оптической плотности реакционной смеси в области 235 нм. Объем смеси составлял 2,5 мл [4].

Результаты и обсуждение. Приведенные на рис. 1 результаты свидетельствуют, что 1,25-диоксивитамин D₃ способен оказывать заметное ингибирующее влияние на лейкоцитарную липоксигеназу при pH 8,0. Эффект гормонально-активной формы витамина D₃ проявлялся уже при концентрациях 10⁻⁸ М и возрастал с увеличением дозы стероида. При этом лейкоцитарная липоксигеназа из крови свиньи значительно более чувствительна к воздействию 1,25-диоксивитамина D₃, чем 5-липоксигеназа из клубней картофеля [3]. Наиболее сильно ингибирующее действие

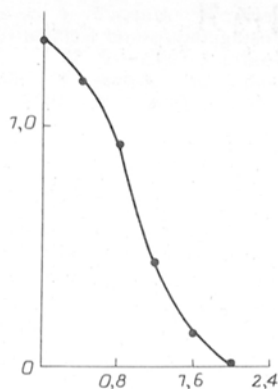


Рис. 1. Снижение активности лейкоцитарной липоксигеназы в присутствии различных доз 1,25-диоксивитамина D₃.

По оси ординат: *V*—скорость ферментативной реакции (10^{-8} моль продукта в 1 мин на 1 мг белка); по оси абсцисс—*I*—концентрация ингибитора (10^{-7} M). (0,1 M трис-HCl pH 8,0, 70 мкМ линолевой кислоты, 0,02% луброл PX).

как для липоксигеназы из лейкоцитов, так и для фермента из картофеля оказывала максимальная доза 1,25-диоксивитамина D₃ ($2 \cdot 10^{-7}$ M).

Результаты изучения зависимости степени ингибирования 1,25-диоксивитамин D₃ лейкоцитарной липоксигеназы от концентрации субстрата (линолевой кислоты) приведены в табл. 1, из которой видно, что, как и в случае 5-липоксигеназы картофеля, существует определенная зависимость степени ингибирования от концентрации субстрата, однако она носит сложный характер, не позволяющий четко определить тип ингибирования. Сравнение приведенных на рис. 2 структурных формул молекул 1,25-диоксивитамина D₃ и продуктов липоксигеназного окисления линолевой кислоты (9-гидропероксиоктадекадиеновой и 13-гидропероксиоктадекадиеновой кислот) указывает на наличие в их молекулах гомологичных участков. Возможно, в какой-то мере ингибирующее действие соединений D-витаминной природы на активность липоксигеназ осуществляется по конкурентному механизму, путем внесения затруднений в образование комплекса фермент—продукт. Кроме того, установлено, что инкубация непосредственного предшественника биосинтеза витамина D₃—холестерина

Таблица 1

Зависимость степени ингибирования 1,25-диоксивитамина D₃ ($1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$; $2 \cdot 10^{-7}$ M) лейкоцитарной липоксигеназы от концентрации линолевой кислоты (0,1 M трис-HCl pH 8,0, 0,02% луброл PX)

Концентрация линолевой кислоты в пробе, мкМ	Вещество	Активность, 10^{-8} моль продукта в 1 мин на 1 мг белка	Степень ингибирования, разы
10	Контроль	4,35	—
	1,25(OH) ₂ D ₃	1,45	2,9
20	Контроль	7,00	—
	1,25(OH) ₂ D ₃	2,65	2,7
30	Контроль	7,25	—
	1,25(OH) ₂ D ₃	1,70	4,0
40	Контроль	12,32	—
	1,25(OH) ₂ D ₃	2,42	4,9
50	Контроль	13,05	—
	1,25(OH) ₂ D ₃	2,42	5,3
70	Контроль	14,25	—
	1,25(OH) ₂ D ₃	1,45	9,5
90	Контроль	12,08	—
	1,25(OH) ₂ D ₃	3,15	4,8
120	Контроль	12,80	—
	1,25(OH) ₂ D ₃	5,30	2,4

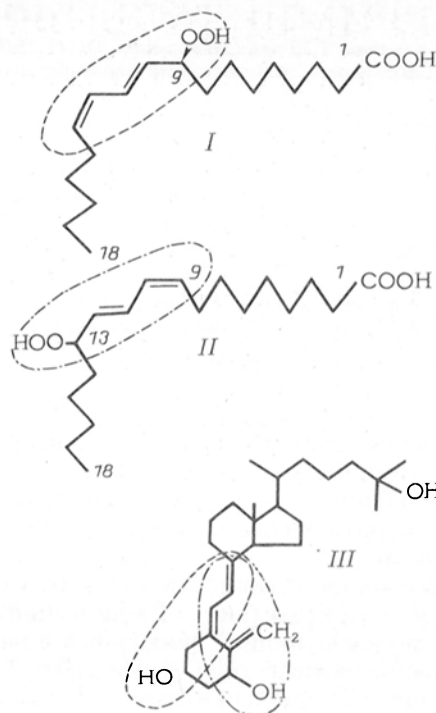


Рис. 2. Структура молекул продуктов липоксигеназного окисления линолевой кислоты и 1,25-диоксивитамина D₃.

I—9-гидропероксиоктадекадиеновая кислота; *II*—13-гидропероксиоктадекадиеновая кислота; *III*—1,25-диоксивитамин D₃.

с липоксигеназой и линолевой кислотой приводит к образованию его 7-гидроксипроизводных [9]. Для этих окислительных преобразований необходимо наличие аллильных водородов при C-7 (присутствующих и в молекуле витамина). Нельзя исключить возможности взаимодействия витамина с липоксигеназой и линолевой кислотой и по этому пути. В целом с увеличением концентрации субстрата (выше 70 мкМ) степень ингибирования 1,25-диоксивитамина D₃ ферментативной активности лейкоцитарной липоксигеназы заметно снижалась.

Были проведены также исследования зависимости ингибирующего эффекта 1,25-диоксивитамина D₃ на липоксигеназу из лейкоцитов крови свиньи от pH среды системы, результаты которых приведены на рис. 3 и в табл. 2. Степень

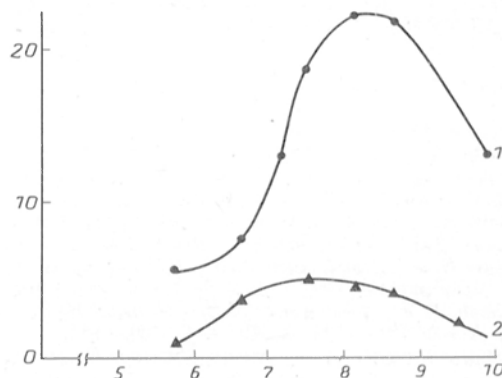


Рис. 3. Зависимость влияния 1,25-диоксивитамина D₃ ($2 \cdot 10^{-7}$ M) на активность лейкоцитарной липоксигеназы от pH среды.

I—контроль; *2*—1,25-диоксивитамин D₃; по оси ординат: *V*—скорость ферментативной реакции (10^{-8} моль продукта в 1 мин на 1 мг белка); по оси абсцисс—pH (0,1 M ЭАС—NaOH pH 5,0—6,6; 0,1 M трис-HCl pH 6,6—8,6; 0,1 M борат—NaOH pH 8,5—10,0; 100 мкМ линолевой кислоты; 0,02% луброл PX).

Таблица 2

Зависимость влияния 1,25-диоксивитамина D₃ (1,25(OH)₂D₃; 2 · 10⁻⁷ М) на активность лейкоцитарной липоксигеназы от pH среды

Параметр	Контроль	1,25(OH) ₂ D ₃
pK ₁	7,230 ± 0,137	5,800 ± 0,080
pK ₂	9,758 ± 0,123	9,714 ± 0,102
(Vst)opt	19,375 ± 1,475	7,250 ± 0,525
const	0,185 ± 0,050	0,099 ± 0,024

Примечание. pK₁ и pK₂ — константы диссоциации ионизированных групп фермента, (Vst)opt — стационарная скорость реакции при оптимальном значении pH, const — константа.

ингибирования 1,25-диоксивитамина D₃ последовательно возрастает вместе с увеличением pH среды. Результаты измерений обрабатывали по методу нелинейной регрессии, используя алгоритм Марквардта в соответствии с f-pH-функцией Михаэлиса [5].

pH-зависимости активности фермента без ингибитора и в присутствии 1,25-диоксивитамина D₃ описываются функцией Михаэлиса с параметрами, приведенными в табл. 2. Из табл. 2 видно, что введение 1,25-диоксивитамина D₃ приводит к снижению скорости реакции при оптимальном pH в 2,7 раза и сдвигу pK в более кислую сторону, не затрагивая существенно pK₂.

Таким образом, в результате проведенных исследований показано, что 1,25-диоксивитамин D₃ способен ингибировать активность лейкоцитарной липоксигеназы *in vitro* при отсутствии в системе ионов кальция. Эффект 1,25-диоксивитамина D₃ возрастает с увеличением его дозы и pH среды и ослабляется с увеличением концентрации субстрата — линолевой кислоты (более 70 мкМ). В целом лейкоцитарная липоксигеназа более чувствительна к воздействию 1,25-диоксивитамина D₃, чем ранее изученная 5-липоксигеназа из клубней картофеля [3]. Выявленные различия прямого и опосредованного кальция [8] эффектов 1,25-диоксивитамина D₃ ранее были отмечены при изучении влияния производных витамина D на пул свободных аминокислот, содержание различных фракций холестерина в сыворотке крови и аминокислотный состав белков соединительной ткани [2, 6].

ЛИТЕРАТУРА

1. Бауман В. К. Биохимия и физиология витамина D. — Рига, 1989.
2. Бондаренко Л. Б., Яхимович Р. И., Гогман И. В. и др. // Докл. АН УССР. — 1991. — № 7. — С. 138—143.
3. Бондаренко Л. Б., Харченко О. В., Бутович И. А. // Биополимеры и клетка. — 1992. — Т. 8, № 6. — С. 41—44.
4. Бутович И. А., Бабенко В. М., Ливарчук Л. В. и др. // Биохимия. — 1991. — Т. 56, № 6. — С. 1077—1081.
5. Бутович И. А., Парашкова Т. В., Бабенко В. М. и др. // Биол. мембраны. — 1992. — Т. 9, № 1. — С. 611—616.
6. Яхимович Р. И., Бондаренко Л. Б., Гогман И. В. и др. // Докл. АН УССР. — 1991. — № 5. — С. 149—151.
7. Claeys M., Kivits G. A. A., Christ-Hazelhof E. et al. // Biochim. biophys. Acta. — 1985. — Vol. 837. — P. 35—51.
8. Coffey M. J., Gyetko M., Peters-Golden M. // International Conference on Prostaglandins and Related Compounds, 8-th: Proceedings. — Montreal, 1992. — P. 4.
9. Lund E., Diezfelusy U., Bjorkhem I. // J. biol. Chem. — 1992. — Vol. 267, № 18. — P. 12462—12467.
10. Park S., Seyama Y., Shimizu T. // New Era Global Harmony Nutrition. — Seoul, 1989. — Vol. 1. — P. 111—114.

11. Raz A., Kamin-Belsky N., Meyer F. A. et al. // International Conference on Prostaglandins and Related Compounds, 8-th: Proceedings. — Montreal, 1992. — P. 53.
12. Schwartz Z., Swain L. D., Ramirez V., Boyan V. D. // Biochim. biophys. Acta. — 1990. — Vol. 1027, № 3. — P. 278—287.
13. Wakasugi N., Noguchi T., Inoue M. et al. // Prostaglandins. — 1991. — Vol. 42, № 2. — P. 127—136.

Поступила 15.06.93

THE HORMONALLY ACTIVE VITAMIN D₃ FORMYLATION, 1,25-DIHYDROXYVITAMIN D₃, A LEUKOCYTE LIPOXYGENASE INHIBITOR

L. B. Bondarenko, O. V. Kharchenko, I. A. Butovich

Institute of Bioorganic Chemistry and Petrochemistry, Ukrainian Academy of Sciences, Kiev

The effect of the hormonally active vitamin D₃ formulation on the activity of porcine leukocyte lipoxygenase was studied. The rate of enzyme inhibition was vitamin dose-dependent and increased if pH values raised, while the vitamin inhibitory effect was decreased as the content of linoleic acid used as a substrate was increased.

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 1994

УДК 616.858-02:615.31:547.583.5:015.156:07

Л. М. Герштейн, А. В. Сергутин, Л. А. Кукуев

ВЛИЯНИЕ ОТМЕНЫ ПРЕПАРАТОВ L-ДОФА НА ВЫЗВАННЫЕ ИМИ ПАТОХИМИЧЕСКИЕ ИЗМЕНЕНИЯ ДВИГАТЕЛЬНЫХ СТРУКТУР МОЗГА

НИИ мозга РАМН, Москва

Высокая эффективность лечения паркинсонизма препаратами L-ДОФА [13], а также положительный результат их применения в целях нормализации двигательных нарушений при наследственных экстрапирамидных заболеваниях [14], торсионной дистонии [8], деформирующей мышечной дистонии [9], реактивного ступора [10] и других церебральных заболеваний вызвали в 70—80-е годы подчас неумеренные восторги, а нередко и преувеличенные надежды на исключительные целебные свойства этих препаратов.

Однако по мере накопления опыта выяснилось, что при паркинсонизме положительный эффект достигается лишь в 80—90% случаев и ограничивается в основном снижением скованности и повышением двигательной активности. Особенно это относится к акинетико-ригидной форме паркинсонизма, в основе которой, видимо, лежат наибольшие морфологические деструкции [15]. Положительный результат применения препаратов L-ДОФА, даже в сочетании с другими фармакологическими средствами и хирургическим вмешательством, оказывается недостаточно стойким и с годами снижается вплоть до полного исчезновения.

Применение L-ДОФА иногда сопровождается осложнениями в двигательной и психической сферах.

Наше внимание привлекают осложнения главным образом в двигательной сфере, особенно дискинезии, проявляющиеся сходными с хореическими подергиваниями различных мышечных групп [1, 4], наблюдаемые при передозировке препарата L-ДОФА и его отмене [11]. Патогенез

дискинезий после отмены препарата неясен. Это и стало целью настоящего исследования, проведенного на крысах с высокой (ВДА) и низкой двигательной активностью (НДА), которых мы условно рассматриваем как до известной степени приближенные модели одного из существенных компонентов двигательных расстройств у человека.

Методика. Проводили количественное цитохимическое определение активности ферментов окислительного обмена, обмена белков и нейромедиаторов в хвостом ядре, сенсомоторной коре, а также в не имеющих непосредственного отношения к двигательной функции п. ассумбенса и гишпокампе мозга крыс-самцов линии Вистар после ежесуточного введения мадопара-125 в течение 14 дней и через 14 дней после его отмены.

После декапитации крыс под легким эфирным наркозом исследованы: 1) препараты мозга животных с ВДА и НДА, которым в течение 14 дней вводили внутривентрикулярно мадопар-125 (препарат L-ДОФА) в ежесуточной дозе 25,5 мг на 1 кг массы; 2) препараты мозга животных с ВДА и НДА через 2 нед после отмены инъекций мадопара-125; 3) препараты мозга контрольных животных с ВДА и НДА, которым внутривентрикулярно вводили физиологический раствор.

В каждом эксперименте использовали не менее 3 животных.

На криостатных срезах толщиной 20 мкм сенсомоторной коры (слои III и V, поля FP^a , FP^b , PA [12]), хвостатого ядра, гишпокампа (CA3) и п. ассумбенса выявляли активность ферментов обмена белков—аминопептидазы (АМП) [2], кислой фосфатазы (КФ) [7], нейромедиаторов—моноаминоксидазы (МАО) [17], ацетилхолинэстеразы (АХЭ) [18] и окислительного обмена—

глутаматдегидрогеназы (ГДГ) [19], глюкозо-6-фосфатдегидрогеназы (Г-6-ФДГ) [19]. Уровень ферментативной активности в условных единицах оптической плотности оценивали количественно на микроскопе ЛЮМАМ-ИЗ: ГДГ, Г-6-ФДГ и МАО при длине волны 589 нм, АМП при 550 нм, АХЭ при 488 нм и КФ при 567 нм. Статистическую обработку проводили по критерию Стьюдента.

Детально методика исследования изложена в работе [3].

Результаты и обсуждение. В настоящей работе были подвергнуты анализу лишь достоверные гистохимические изменения в основном двигательных структур мозга, которые могли бы быть использованы для суждения о подобных изменениях в мозгу человека при лечении препаратами L-ДОФА и после его отмены.

У животных с ВДА после 14-дневного введения мадопара возрастает по сравнению с контролем активность КФ—фермента, связанного с обменом фосфопротеинов (на 13%; рис. 1), и Г-6-ФДГ (на 17%) в хвостатом ядре (рис. 2). У этой группы животных отмечается достоверное снижение активности МАО (на 18%) в п. ассумбенса и увеличение активности АХЭ (на 20%) и АМП (на 11%) в гишпокампе (см. рис. 1, рис. 3). Достоверных изменений в сенсомоторной коре мозга у этих животных не отмечается.

После отмены мадопара у крыс с ВДА, хотя и отмечается нормализация ранее измененного уровня активности большинства исследованных ферментов, однако в хвостатом ядре сохраняется достоверно высокая активность Г-6-ФДГ (на 12%) по сравнению с контролем (см. рис. 2). Кроме того, в слоях III и V сенсомоторной коры появляется ранее не определявшееся достоверное

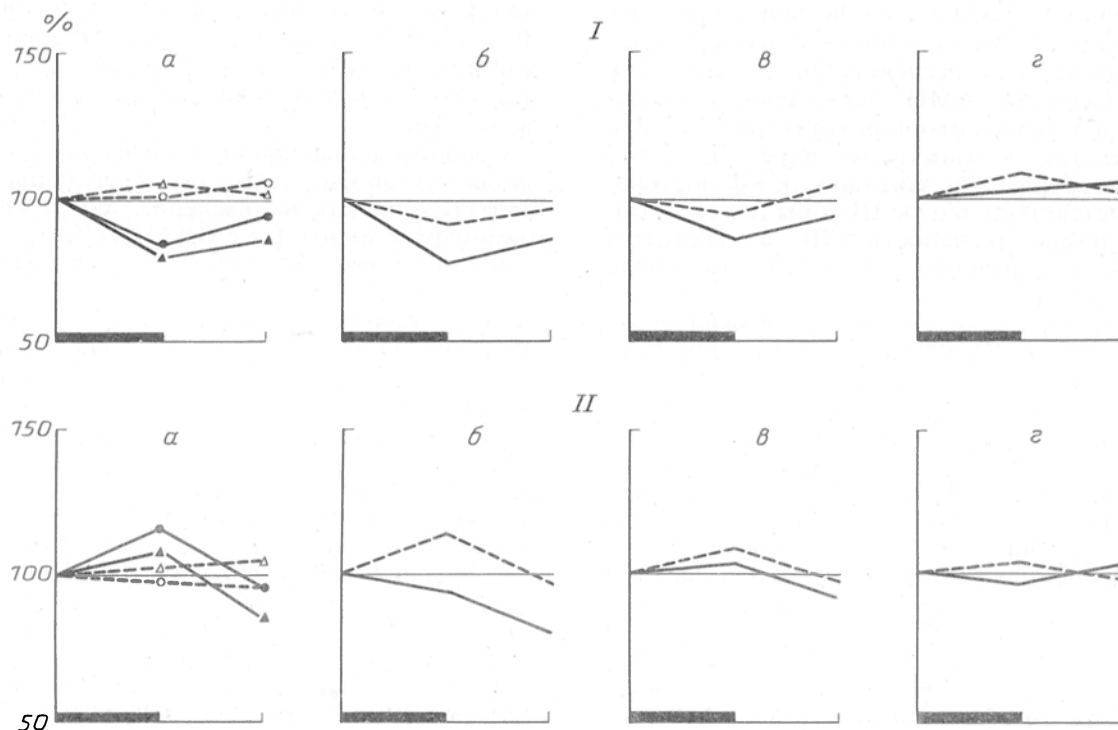


Рис. 1. Изменения активности ферментов обмена белков при введении мадопара и после его отмены.

По осям абсцисс— время выведения мадопара: утолщенная часть— 14 сут, тонкая часть— 28 сут; по осям ординат— изменения активности, % (100%— контроль). I— активность АМП; II— активность КФ. Штриховая линия— животные с ВДА; сплошная линия— животные с НДА. а— сенсомоторная кора (кружки— слой III, треугольники— слой V); б— хвостатое ядро; в— п. ассумбенса; г— гишпокамп.

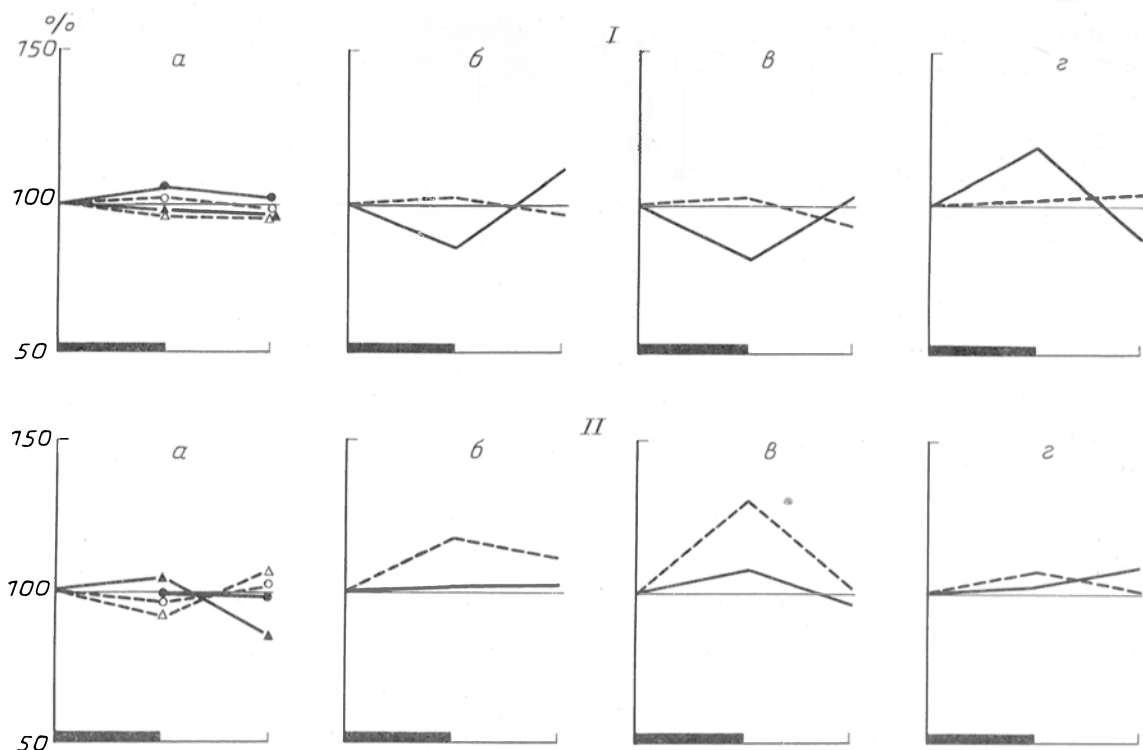


Рис. 2. Изменения активности ферментов окислительного обмена при введении мадонара и после его отмены.

I — активность ГДП; II — активность Г-6-ФДГ. Остальные обозначения те же, что на рис. 1.

возрастание активности МАО (соответственно на 19 и 12%; см. рис. 3).

Таким образом, у животных с ВДА в хвостатом ядре сохраняются изменения активности Г-6-ФДГ и обнаруживаются изменения активности МАО в сенсомоторной коре.

У животных с НДА после введения мадонара изменения цитохимических показателей наблюдаются почти во всех исследованных структурах мозга. Активность АМП достоверно снижена в слоях III и V сенсомоторной коры (на 17 и 18% соответственно), в хвостатом ядре (на 22%) и п. ассумбенса (на 13%). Активность КФ достоверно изменяется лишь в слое III коры (на 16%; см. рис. 1). Снижена активность ГДГ в хвостатом ядре (на 13%), п. ассумбенса (на 17%) и повышена в гиппокампе (на 21%; см. рис. 2). Среди исследованных показателей медиаторного обмена обнаружено увеличение активности АХЭ в гиппокампе (на 13%; см. рис. 3).

После отмены мадонара у животных с НДА нормализация исследованных показателей существенно отличается от наблюдавшейся у крыс с ВДА. Активность АМП остается сниженной в слое V коры (на 14%) и хвостатом ядре (на 21%; см. рис. 1). Активность ГДГ после отмены препарата достоверно возрастает в хвостатом ядре (на 12%). После курса введения мадонара неизменная активность Г-6-ФДГ достоверно снижается в слое V коры (на 15%), а активность МАО также снижается в слое V коры (на 10%) и хвостатом ядре (на 11%; см. рис. 2 и 3). Активность АХЭ нормализуется в гиппокампе, но возрастает в слое V коры (на 16%; см. рис. 3).

Таким образом, при 14-дневном введении мадонара в мозг крыс с НДА в отличие от крыс

с ВДА наблюдаются наиболее выраженные изменения активности АМП и ГДГ.

Отмена мадонара приводит к нормализации активности АМП, ГДГ и АХЭ в п. ассумбенса и гиппокампе. В двигательной системе мозга животных с НДА отмечается появление ранее не обнаруживавшихся изменений активности Г-6-ФДГ в сенсомоторной коре и МАО в сенсомоторной коре и хвостатом ядре. Выявлены достоверные изменения в активности всех исследованных ферментов.

Сравнительный анализ полученных данных позволил установить сходство и различие в ответной реакции как на введение, так и на отмену мадонара у животных с ВДА и НДА.

Установлено, что наблюдавшиеся в гиппокампе и п. ассумбенса изменения в активности исследованных ферментов у крыс с ВДА и НДА при введении мадонара после его отмены нормализуются, тогда как в исследованных образованиях двигательной системы они сохраняются (Г-6-ФДГ — у крыс с ВДА, АМП — у крыс с НДА) или появляются впервые (МАО — у крыс с ВДА и НДА, Г-6-ФДГ и АХЭ — у крыс с НДА).

Таким образом, в мозгу обеих групп животных после отмены мадонара 125 достоверные изменения сохраняются только в образованиях двигательной системы. Они относительно незначительны у крыс с ВДА и более выражены по всем показателям у крыс с НДА.

Можно высказать предположение, что значительные нейрохимические различия в ответной реакции на отмену мадонара у крыс с ВДА и НДА отчасти определяются генетическими особенностями их двигательной активности. В этом предположении нас утверждает и тот факт, что

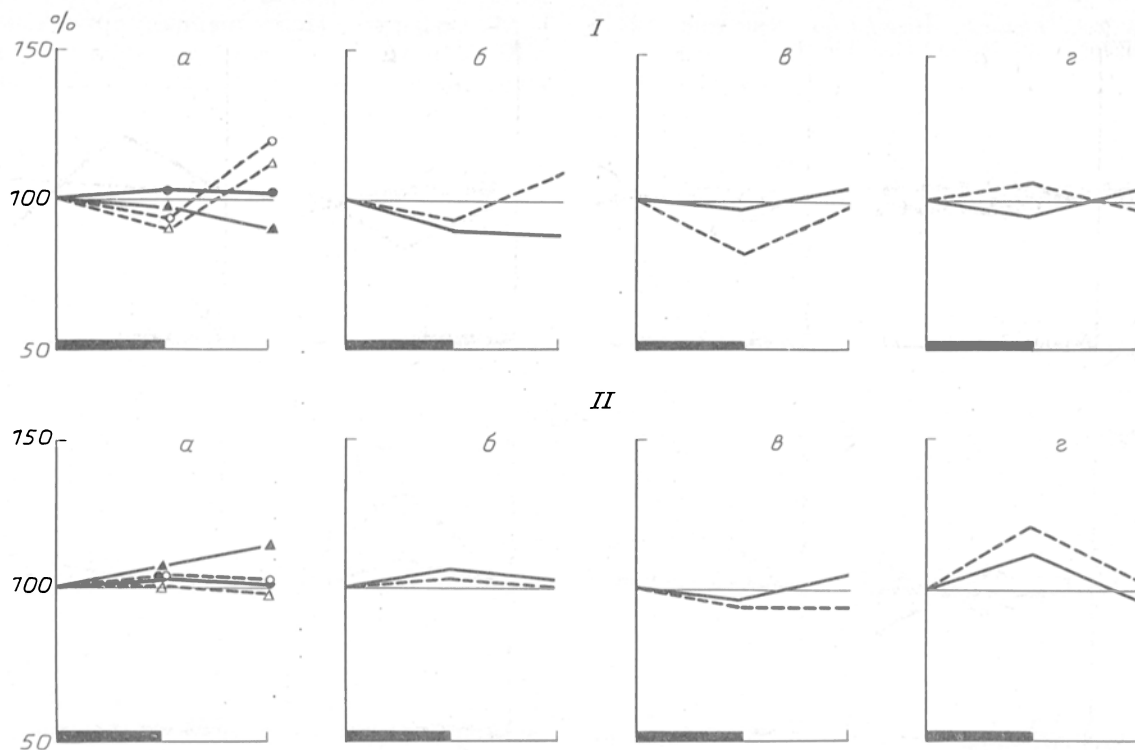


Рис. 3. Изменения активности ферментов медиаторного обмена при введении мадопара и после его отмены.

I — активность МАО; II — активность АХЭ. Остальные обозначения те же, что на рис. 1.

у крыс с НДА наблюдаются наибольшие изменения активности одного из ферментов обмена белков — АМП [3].

Итак, воздействие препаратов L-ДОФА (мадопар) не только сопровождается достаточно широко известными изменениями в содержании дофамина в двигательных и некоторых других структурах мозга, но и влечет за собой изменения различных сторон обмена нейронов. Это убедительно доказывается результатами исследования, поскольку МАО и АХЭ в основном обеспечивают обмен нейромедиаторов, КФ и АМП — белков, а ГДГ и Г-6-ФДГ — окислительный обмен. Наибольшее внимание заслуживают гистохимические изменения в мозгу животных с НДА, ранее не известные и выявленные впервые. Особо здесь, видимо, нужно отметить достоверное снижение активности МАО, имеющей свойство инактивировать дофамин. Возможно, это является одним из существенных факторов, лежащих в основе патогенеза как симптомов психического возбуждения (беспокойство, галлюцинации и др.), так и дискинезий, наблюдающихся нередко при отмене препаратов L-ДОФА.

Полученные результаты могут оказаться полезными не только для новых поисков наиболее эффективных вариантов и схем лечения паркинсонизма, но и для поиска новых средств лечебного воздействия, направленного на нормализацию двигательных нарушений экстрапирамидного генеза с учетом, помимо обмена дофамина, роли таких медиаторов, как γ -аминомасляная кислота [16], и других видов обмена нейронов, в том числе исследованных в настоящей работе, а также с учетом онто- и филогенетических структурно-функциональных особенностей экстрапира-

мидной системы [5] и всей сложности строения и функции основных морфологических образований мозга, участвующих в осуществлении и регуляции движений [6].

ЛИТЕРАТУРА

1. Вейн А. М., Голубев В. Л., Берзиньш Ю. Э. Паркинсонизм. — Рига, 1981.
2. Герштейн Л. М. // Цитология. — 1965. — Т. 7, № 6. — С. 769—773.
3. Герштейн Л. М., Камышева А. С., Чеботарева Т. Л. и др. // Журн. невропатол. и психиатр. — 1991. — № 2. — С. 300—305.
4. Карлов В. А. Терапия нервных болезней. — М., 1987. — С. 297—311.
5. Кукуев Л. А. Структура двигательного анализатора. — М.; Л., 1978.
6. Кукуев Л. А. // Журн. невропатол. и психиатр. — 1986. — № 7. — С. 961—965.
7. Луппа Х. Основы гистохимии. — М., 1980. — С. 223—224.
8. Маркова Е. Д. // Клин. мед. — 1975. — № 9. — С. 89—92.
9. Мельничук П. В., Милич Л. П. // Журн. невропатол. и психиатр. — 1979. — № 8. — С. 1002—1005.
10. Морозов Г. В., Лукачер Г. Я. // Там же. — 1978. — № 5. — С. 113—115.
11. Петелин Л. С. // Современные проблемы нейрофармакологии. Принципы патогенетического лечения больных нервными и психическими заболеваниями. — М., 1984. — Т. 1. — С. 153—154.
12. Светухина В. М. // Арх. анат. — 1962. — № 2. — С. 31—45.
13. Столяров А. Г., Кистелев Б. А. // Журн. невропатол. и психиатр. — 1973. — № 2. — С. 199—205.
14. Ткачев Р. А., Маркова Е. Д. // Там же. — № 4. — С. 513—519.
15. Яхно Н. П., Дамулин И. В., Гончаров А. О. // Там же. — 1992. — № 4. — С. 3—7.
16. Dnus P. Topikal Diagnosis in Neurologic. — Stuttgart, 1983. — S. 319—328.
17. Glenner G. G., Burtner H. Y., Brown G. W. // J. Histochem. Cytochem. — 1957. — Vol. 5, № 6. — P. 591—600.
18. Karnovsky M. J., Roots L. B. et al. // Ibid. — 1964. — Vol. 12, № 3. — P. 219—221.

IMPACT OF WITHDRAWAL OF L-DOPA DRUGS ON THEIR PATHOCHEMICAL ALTERATIONS IN BRAIN MOTOR STRUCTURES

L. M. Gershtein, A. V. Sergutina, L. A. Kukuev

Institute of Brain, Russian Academy of Medical Sciences, Moscow

Activities of enzymes of protein metabolism (aminopeptidase, acid phosphatase), of neurotransmitters (monoamine oxidase, acetylcholinesterase) and oxidative metabolism (glutamate- and glucose-6-phosphate dehydrogenases) were studied by quantitative cytochemical procedures in brain motor structures (sensomotor cortex, caudate nucleus) as well as in brain tissues not related directly to locomotory functions (*n. accumbens*, hippocampus) of rats exhibiting high and low locomotory activities after repeated L-DOPA administration within 14 days as well as within 14 days after drug discontinuation. That of L-DOPA (madopare) caused alterations in the enzymatic activity in the brain motor structures of rats, mainly, with a high locomotory activity. It may be suggested that madopare withdrawal-induced decreases in MAO activity might be, to a certain extent, a cause of dyskinesias occurring after discontinuation of L-DOPA drugs.

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 1994

УДК 615.355:577.152.165:1331.015.4.07

В. Н. Георгиев, А. Д. Дурнев, С. Б. Середенки

УБИХИНОНЫ И АНТИМУТАГЕННАЯ ЗАЩИТА ОРГАНИЗМА

НИИ фармакологии РАМН, Москва

Исследования в области антимуtagenеза начались около 30 лет назад [15, 16]. К настоящему времени сложились представления об универсальности явления антимуtagenеза в живой природе [1], его можно наблюдать у организмов, значительно различающихся по уровню организации [1, 2, 9].

Антимуtagenные свойства показаны у десятков самых разнообразных природных и синтетических соединений, в том числе у веществ, являющихся необходимыми диетическими компонентами и естественными метаболитами организма [1, 2, 9]. Это витамины, аминокислоты, полиамины, пуриновые рибозиды, эндогенные антиоксиданты и некоторые другие. Их подробный список изложен в обзоре [3].

Особое внимание исследователей всегда привлекали отдельные компоненты антиоксидантной системы организма. Их антимуtagenные свойства широко исследованы и установлены в экспериментах *in vitro* и *in vivo* для глутатиона, аскорбиновой кислоты, токоферола, каротиноидов и *in vitro* для антиоксидантных ферментов—супероксиддисмутазы и каталазы [1, 2, 5]. Однако за рамками изучения остались природные внутриклеточные антиоксиданты терпеноидной природы—убихиноны.

Единственной формой убихинонов, обнаруживаемой в тканях человека, является убихинон-10 [17]. Создание и использование за рубежом лекарственных средств на основе убихинона-10 и аналогичные работы в России обусловили исследование антимуtagenных свойств этого соединения в экспериментах *in vivo*.

Методика. Исследование проведено методом учета хромосомных aberrаций в метафазных клетках костного мозга мышей-самцов линии C56Bl/6 в возрасте 1,5—2 мес (питомники РАМН «Светлые горы» и «Крюково»).

В качестве индукторов мутагенеза использовали диоксидин в дозах 100 и 300 мг/кг, фотрин в дозе 7 и 14 мг/кг и циклофосфан из расчета 20 мг/кг. Водные растворы мутагенов в объеме 0,2 мл вводили однократно, внутрибрюшинно на срок 24 ч. Убихинон-10, полученный биотехнологическим путем в ГосНИИ синтезбелок, вводили через 1 ч после мутагенов перорально в виде масляного раствора (0,2 мл оливкового масла) в дозах 0,2, 2,0 и 20 мг/кг.

Приготовление метафазных препаратов проводили суховоздушным способом, согласно описанному ранее методу [8]. При цитогенетическом анализе учитывали одиночные и парные фрагменты, обмены хромосом, отдельно—ахроматические повреждения (гены); количество клеток с хромосомными повреждениями использовали в качестве интегрального показателя сравнения контрольных и опытных результатов. Клетки, имеющие более 5 цитогенетических повреждений, учитывали как метафазы с множественными повреждениями хромосом. Принципы цитогенетического анализа не отличались от общепринятых [8].

Результаты и обсуждение. Результаты, полученные при исследовании влияния убихинона-10 на мутагенные эффекты диоксидина, фотрина и циклофосфана, представлены в таблице.

Диоксидин в дозах 100 и 300 мг/кг индуцирует хромосомные повреждения в 5,6 и 20,4% исследованных клеток, что совпадает с ранее установленными данными [9]. Убихинон-10 в дозе 20 мг/кг практически полностью устраняет эффект мутагена при его использовании в дозе 100 мг/кг. Зарегистрированный результат 2,4% статистически достоверно не отличается от контроля—1,5%. В дозах 2 и 20 мг/кг убихинон-10 статистически достоверно редуцирует цитогенетический эффект диоксидина, применяемого из расчета 300 мг/кг, на 33 и 49% соответственно.

В экспериментах с фотрином (7 и 14 мг/кг) статистически значимое уменьшение цитогенетического эффекта под действием убихинона было зарегистрировано только при применении мутагена в дозе 14 мг/кг. Убихинон-10 в дозе 2 мг/кг редуцировал количество поврежденных клеток на 24% и в дозе 20 мг/кг—на 32%. Показатели, характеризующие уровень цитогенетической активности мутагена, так же как в предыдущем случае, совпадают с установленными ранее [9].

Циклофосфан в дозе 20 мг/кг индуцировал хромосомные повреждения у 9,6% исследованных клеток, что практически совпадает с данными литературы [9]. Убихинон-10, применяемый из расчета 2 и 20 мг/кг, вызывал статистически достоверное снижение выхода клеток, повреждаемых мутагеном, на 42—46%.

Таким образом, убихинон-10 при пероральном введении проявляет антимуtagenную активность в диапазоне доз 2—20 мг/кг по отношению к цитогенетическим эффектам 3 исследованных мутагенов. Во всех случаях отмечено пропорциональное снижение различных регистрируемых типов

Модификация убихиноном-10 кластогенного действия фотрина, диоксилина и циклофосфана у мышей линии С57В1/6

Условия эксперимента	Количество исследованных клеток	Гены	Аберрации хромосом	Всего поврежденных метафаз, %	p
		на 100 клеток			
Диоксидин, 100 мг/кг	500	1,2	4,4	5,6	
Диоксидин 100 мг/кг + убихинон, 20 мг/кг	500	1,2	2,4	2,4	<0,5
Диоксидин 100 мг/кг + убихинон, 2 мг/кг	500	0,8	4,2	3,8	>0,05
Диоксидин 100 мг/кг + убихинон, 0,2 мг/кг	500	0,6	3,4	4,0	>0,05
Диоксидин, 300 мг/кг	500	1,8	15,0	20,4*	
Диоксидин 300 мг/кг + убихинон, 20 мг/кг	500	0,6	6,8	10,4*	<0,05
Диоксидин 300 мг/кг + убихинон, 2 мг/кг	500	1,4	14,4	13,6*	<0,05
Диоксидин 300 мг/кг + убихинон, 0,2 мг/кг	500	0,6	15,4	18,2*	>0,05
Фотрин, 7 мг/кг	500	4,0	10,8	13,6	
Фотрин 7 мг/кг + убихинон, 20 мг/кг	500	2,2	12,4	11,6	>0,05
Фотрин 7 мг/кг + убихинон, 2 мг/кг	500	1,25	13,0	11,75	>0,05
Фотрин 7 мг/кг + убихинон, 0,2 мг/кг	500	1,0	11,8	12,8	>0,05
Фотрин 14 мг/кг	500	4,4	34,8	29,0	
Фотрин 14 мг/кг + убихинон, 20 мг/кг	500	2,2	25,8	19,8	<0,05
Фотрин 14 мг/кг + убихинон, 2 мг/кг	500	2,0	28,2	22,0	<0,05
Фотрин 14 мг/кг + убихинон, 0,2 мг/кг	500	2,6	30,6	25,2	>0,05
Циклофосфан, 20 мг/кг	500	0,2	10,2	9,6	
Циклофосфан 20 мг/кг + убихинон, 20 мг/кг	500	0,2	8,4	5,6	<0,05
Циклофосфан 20 мг/кг + убихинон, 2 мг/кг	500	0,4	5,8	5,2	<0,05
Циклофосфан 20 мг/кг + убихинон, 0,2 мг/кг	500	0,6	9,6	8,4	>0,05

Примечание. Звездочка — включая клетки с множественными повреждениями хромосом.

повреждений хромосом. Антимутагенное действие соединения не имеет дозовой зависимости и не превышает 50%. В одном случае выявлена зависимость защитного действия убихинона-10 от использованной дозы мутагена. Препарат не оказывал влияния на уровень клеток, повреждаемых фотрином, в дозе 7 мг/кг, но оказался эффективным при использовании мутагена из расчета 14 мг/кг.

Многочисленными работами установлено, что убихиноны являются природными антиоксидантами [6, 11, 12]. Показано, что убихиноны и их восстановленные формы оказывают ингибирующее действие на перекисное окисление липидов за счет обрыва цепей [7, 13, 14] и осуществляют дисмутацию супероксидного анион-радикала кислорода [10].

В экспериментах на мышах линии BALB установлено, что введение убихинонов влияет на всю систему природных антиоксидантов, увеличивая их количество. В частности, при внутрибрюшинном введении убихинона-6 содержание природных антиоксидантов в организме увеличивается в 6 раз за 12 ч. Количество убихинона возрастает при этом в 1,6 раза [6].

Одновременно известно, что в механизме мутагенного действия алкилирующего мутагена фотрина присутствует свободнорадикальный компонент, а цитогенетическое действие диоксилина

обусловлено его прооксидантной активностью. Цитогенетическая активность фотрина в культуре клеток цельной крови человека подавляется супероксиддисмутазой и каталазой, диоксилина — каталазой [9]. Существуют также косвенные указания на роль процессов свободнорадикального окисления кислорода и иерекисного окисления липидов в проявлении мутагенных свойств циклофосфамида [9].

В совокупности описанные данные позволяют предполагать, что именно антиоксидантные свойства убихинона-10 лежат в основе его редуцирующего влияния на кластогенные эффекты фотрина, диоксилина и циклофосфана, а также подтверждают ранее сделанное теоретическое предположение [4] о том, что природные антиоксиданты — убихиноны — могут рассматриваться как элементы эндогенной антимутагенной системы клеток.

ЛИТЕРАТУРА

1. Алекперов У. К. Антимутагенез. Теоретические и прикладные аспекты. — М., 1984.
2. Гончарова Р. И. Антимутагенез. — Минск, 1974.
3. Гончарова Р. И., Левина А. Б. // Вестн. АН БССР. Сер. биол. наук. — 1984. — № 6. — С. 50—54.
4. Гончарова Р. И. // Вестн. Рос. АМН. — 1993. — № 1. — С. 26—32.
5. Дурнев А. Д., Середенин С. Б. // Хим.-фарм. журн. — 1990. — № 2. — С. 92—100.
6. Заславский Ю. А., Храпова Н. Г., Терехова С. Ф. и др. // Биофизика. — 1977. — № 2. — С. 359—361.
7. Казан В. Е., Тюрин В. А., Кутанова С. А. и др. // Бюл. экпер. биол. — 1985. — № 4. — С. 420—422.
8. Руководство по краткосрочным тестам для выявления мутагенных и канцерогенных химических веществ (Гигиенические критерии состояния окружающей среды, № 51). — М., 1989.
9. Середенин С. Б., Дурнев А. Д. // Фармакологическая защита генома. — М., 1992. — С. 41.
10. Beyer R. E. // Free Radical Biol. Med. — 1990. — Suppl. 1. — P. 545—565.
11. Casu A., Cattalaso D., Pranzato M. A. et al. // Cell. Biochem. Funct. — 1986. — Vol. 4, № 17. — P. 37—42.
12. Cruger E. N., Tappel A. // Lipid. — 1971. — № 2. — P. 147—148.
13. Landi L., Cabrini L., Sechi A.-M., Pasquali P. // Biochem. J. — 1984. — Vol. 222, № 2. — P. 463—466.
14. Landi L., Fiorentini D., Cabrini L. et al. // Biochim. biophys. Acta. — 1989. — Vol. 984, № 1. — P. 21—25.
15. Novick A., Scillard L. // Nature. — 1952. — Vol. 170. — P. 926—927.
16. Novick A. // Brookhaven Symp. Biol. — 1956. — Vol. 8. — P. 201—215.
17. Pennock J. F. // Vitam. a. Horm. — 1966. — Vol. 24. — P. 307—329.

Поступила 12.01.94

UBIQUINONES AND THE BODY'S ANTIMUTAGENIC DEFENSE

V. N. Georgiev, A. D. Durnev, S. B. Seredenin

Institute of Pharmacology, Moscow

The effects of ubiquinone-10 given in oral doses of 0.2-20 mg/kg on cytogenetic effects of intraperitoneal photrinum (7 and 14 mg/kg), dioxydinum (100 and 300 mg/kg) and cyclophosphanum (20 mg/kg) were studied in the bone marrow metaphasic cells of male C57B1/6 mice. Ubiquinone-10 (2 to 20 mg/kg) statistically significantly reduced the clastogenic action of these mutagens, except photrinum used in a dose of 7 mg/kg. The antimutagenic effect of the drug was dose-independent and no more than 50%. The findings enable ubiquinone-10 be considered as an endogenous antimutagen. It is suggested that the antimutagenic activity of the compound is due to its antioxidative properties.

Л. С. Колесниченко, В. И. Кулинский,
М. В. Ясько, Е. Н. Екимов, Л. М. Станевич,
Е. Ф. Глушкова, С. Б. Белогоров, Г. Т. Филиппова

ВЛИЯНИЕ ЭМОЦИОНАЛЬНО-БОЛЕВОГО СТРЕССА, ГИПОКСИИ И АДАПТАЦИИ К НЕЙ НА АКТИВНОСТЬ ФЕРМЕНТОВ МЕТАБОЛИЗМА ГЛУТАТИОНА И КОНЦЕНТРАЦИЮ ГЛУТАТИОНА В ОРГАНАХ КРЫС

Иркутский медицинский институт

Катехоламины и иммобилизационный стресс значительно и одинаково изменяют активность ферментов метаболизма глутатиона (ФМГ) [2—4]. Данные о влиянии других внешних факторов носят разрозненный характер [5, 10, 13]. Ввиду огромного значения глутатиона для ряда фундаментальных биологических функций и для устойчивости организма [6, 13] такие исследования необходимы. Недавно было выдвинуто предположение о существовании у обычных гомойотермных млекопитающих двух качественно различных реакций организма на неблагоприятные воздействия: резистентной (стрессовой) и толерантной [7]. При этом вторая в биохимическом и особенно энзимологическом плане изучена мало.

Задача настоящей работы заключалась в сравнительной характеристике сдвигов активности ФМГ при стрессе, гипоксии и длительной адаптации к ней.

Методика. Работа проведена на белых крысах (121) обоего пола массой 120—240 г. У крыс-самцов в течение 4 ч вызывали эмоционально-болевой стресс (ЭБС) в сочетании с внутривидовой агрессией, обусловленной борьбой за безо-

пасную территорию [1]. Модель была модифицирована: на безопасную площадку временами также подавали ток; различали доминантных и рецессивных крыс. У наркотизированных этаминалом натрия (40 мг/кг внутривенно за 15 мин) крыс вызывали гиперкапническую гипоксию при помощи приспособления (стеклянного стаканчика объемом 150 мл с фиксированной на нем частью хирургической перчатки), надеваемого на голову крысы; в месте мягкого контакта с резиной шее смазывали вазелиновым маслом. Это приспособление позволяло измерять температуру тела и в нужное время моментально, не прерывая гипоксии, забивать крысу путем декантации. Адаптацию к высотной гипоксии вызывали в барокамере путем подъема на высоту 2—5,5 км (с 14-х суток—5,5 км) в течение 6 ч по 5 раз в неделю в течение 6 нед. В надосадочной жидкости 18000 г определяли активность ФМГ, как описано ранее [3]. Восстановленный глутатион (GSH) определяли в сульфосалициловых экстрактах с 5,5'-дитиобис-2-нитробензойным [12]. Статистический анализ проводили с использованием критериев F , t и d .

Результаты и обсуждение. ЭБС в наших опытах был интенсивным, о чем свидетельствуют увеличение уровня кортикостерона в крови в среднем в 3,4 раза (с $86 \pm 0,3$ до 293 ± 1 нМ, $p < 0,001$) и снижение содержания адреналина в надпочечниках и норадреналина в гипоталамусе и сердце (соответственно в 1,5, 2,8 и 1,3 раза, $p < 0,01—0,001$), а также аккумуляция адреналина в сердце (в 1,6 раза). Параллельно (табл. 1) происходили активация (или отмечалась тенденция к ней) ГПО в сердце, печени (в среднем на 50%) и почках (на 30%, при объединении двух опытных серий $p < 0,05$), активация ГТ в сердце (на 33%) и печени (у доминантных крыс на 23%), ингибирование ГГТ в печени (на 36%) при отсутствии изменений активности ГР в этих органах

Таблица 1

Активность ФМГ и концентрация GSH в органах крыс при ЭБС

Животные	Активность ФМГ, нмоль/мин на 1 мг белка				Концентрация GSH, мкмоль на 1 г ткани
	ГПО	ГТ	ГГТ	ГР	
Сердце					
Контрольные	78 ± 8,2	30 ± 1,6	0,44 ± 0,077	9,6 ± 0,61	—
Доминантные	110 ± 28	40 ± 2,5***	0,54 ± 0,072	11,2 ± 0,92	—
Рецессивные	108 ± 17*	40 ± 2,7***	0,55 ± 0,064	11,0 ± 0,63	—
Печень					
Контрольные	77 ± 9,4	285 ± 19	4,3 ± 0,50	52 ± 4,4	2,91 ± 0,34
Доминантные	114 ± 16*	351 ± 17**	2,8 ± 0,37**	48 ± 2,0	2,62 ± 0,24
Рецессивные	118 ± 15**	317 ± 23	2,6 ± 0,36**	46 ± 3,0	2,62 ± 0,20
Почки					
Контрольные	51 ± 3,8	165 ± 12	1564 ± 233	118 ± 5,2	1,75 ± 0,24
Доминантные	66 ± 6,7*	144 ± 14	1545 ± 309	122 ± 5,9	1,83 ± 0,18
Рецессивные	66 ± 9,4	146 ± 10	1707 ± 203	119 ± 7,1	1,68 ± 0,19
Головной мозг					
Контрольные	26 ± 2,7	59 ± 5,0	3,7 ± 0,45	14 ± 0,71	1,0 ± 0,09
Доминантные	22 ± 3,3	58 ± 2,7	3,3 ± 0,53	14 ± 0,90	0,97 ± 0,08
Рецессивные	22 ± 3,5	61 ± 5,8	3,7 ± 0,28	15 ± 1,3	0,91 ± 0,13

Примечание. Здесь и в табл. 2 значимость различий с контролем: одна звездочка— $p < 0,1$, две— $p < 0,05$, три— $p < 0,01$, четыре— $p < 0,001$. ГПО—глутатионпероксидаза, ГТ—глутатионтрансфераза, ГГТ—γ-глутамилтрансфераза, ГР—глутатионредуктаза.

($p > 0,1-0,9$). Различий между доминантными и рецессивными крысами, как правило, не выявляли. Ни один из изученных показателей не изменялся в головном мозге ($p > 0,1-0,9$), что может быть связано с исследованием мозга как целого и не исключает возможности сдвигов в отдельных нервных структурах. Другое возможное объяснение отсутствия сдвигов в мозге — наличие противоположной регуляции ФМГ разными нейрогормонами.

Нам не удалось подтвердить данные о снижении при стрессе концентрации GSH в тканях [5] — она не изменялась в печени, почках и головном мозге ($p > 0,1-0,9$). Отсутствовали изменения концентрации глюкозы в крови: $3,6 \pm 0,46$ мМ в контроле, $3,6 \pm 0,50$ мМ у доминантных и $3,7 \pm 0,67$ мМ у рецессивных крыс ($p > 0,3-0,9$). Вероятно, это связано с большой длительностью стресса, которая может вызывать компенсаторное увеличение синтеза GSH и использования глюкозы. Отметим, что изменения активности ФМГ столь же стабильны, как мобилизация гормонов стресса, и более устойчивы, чем сдвиги концентрации GSH в органах и глюкозы в крови.

Кратковременная 2- и 4-минутная гипоксия не влияет на активность ФМГ (табл. 2). У крыс, погибших от гипоксии через 2—15 мин, увеличивается активность ГПО в печени, снижается активность ГТ и ГР в почках и наблюдается тенденция к снижению активности ГГТ в сердце, печени и головном мозге. В селезенке и костном мозге активность ФМГ не изменяется. Концентрация GSH проявляет тенденцию к снижению в головном мозге, но не в других органах.

Значительно более распространенный характер носят сдвиги активности ФМГ при длительной периодической адаптации к гипоксии (см. табл. 2). Во всех 4 исследованных органах снижается активность ГПО и ГР, в сердце, печени и почках уменьшается активность ГТ, а активность ГГТ снижается в головном мозге и проявляет тенденцию к повышению в почках. Это расходится с сообщением, что активность ГПО снижается при непрерывной, но увеличивается при периодической гипоксии [10]. Концентрация GSH увеличивается в почках, сердце, головном мозге, но не изменяется в других органах.

Таким образом, изученные нами воздействия качественно различно влияют на активность ФМГ. ЭБС в основном влияет так же, как и иммобилизационный стресс и экзогенные катехоламины [2—4], — прежде всего происходит активация ГПО и ГТ. Эта стрессовая реакция (кроме предсмертной активации ГПО в печени) полностью отсутствует при гипоксии, даже в ранние сроки (2—4 мин), когда обычно происходит усиленный выброс в кровь катехоламинов и глюкокортикостероидов и развиваются симпатикогенные вегетативные сдвиги [7—9]. Очевидно, отсутствие ранних стрессовых реакций ФМГ в наших опытах связано с использованием барбитуратного наркоза, который, как хорошо известно, резко снижает реактивность стволовых вегетативных центров и в результате — мобилизацию катехоламинов.

Поздняя — предсмертная реакция ФМГ — выражена скупо и проявляется снижением или тенденцией к снижению трех ФМГ в некоторых

Таблица 2

Изменения активности (в %) ФМГ и концентрации GSH при гипоксических воздействиях

Серия опытов	ГПО	ГТ	ГГТ	ГР	GSH
Сердце					
2 мин	—	$+2,6 \pm 1,5$	$+33 \pm 66$	$-1,7 \pm 8,2$	—
4 мин	—	$+1,0 \pm 8,9$	$-0,9 \pm 31$	$-2,8 \pm 12$	—
Гибель	$+6,7 \pm 13$	$+7,8 \pm 8,6$	$-66 \pm 35^*$	$-9,9 \pm 7,2$	$-8,6 \pm 5,4$
Адаптация	$-38 \pm 14^{**}$	$-22 \pm 6,0^{***}$	$+47 \pm 29$	$-23 \pm 5,3^{4*}$	$+20 \pm 8,1^{**}$
Печень					
2 мин	—	-10 ± 10	$+12 \pm 30$	$-4,0 \pm 7,9$	—
4 мин	—	$-9,6 \pm 6,7$	-27 ± 33	$-3,6 \pm 21$	—
Гибель	$+39 \pm 17^{**}$	$-8,2 \pm 6,5$	$-32 \pm 18^*$	$-4,7 \pm 6,5$	$-1,5 \pm 6,9$
Адаптация	$-75 \pm 15^{4*}$	$-27 \pm 6,8^{4*}$	$+20 \pm 20$	$-33 \pm 6,7^{4*}$	$+5,0 \pm 9,5$
Почки					
2 мин	—	$+0,6 \pm 10$	$+18 \pm 28$	$-1,0 \pm 9,3$	—
4 мин	—	-11 ± 14	$+28 \pm 24$	$-9,2 \pm 13$	—
Гибель	$+18 \pm 11$	$-16 \pm 7,8^{**}$	-18 ± 14	$-14 \pm 5,8^{**}$	$-7,2 \pm 6,4$
Адаптация	$-62 \pm 14^{4*}$	$-43 \pm 7,6^{4*}$	$+48 \pm 27^*$	$-37 \pm 11^{***}$	$+25 \pm 5,9^{***}$
Головной мозг					
2 мин	—	$+13 \pm 12$	$+4,9 \pm 19$	$+1,5 \pm 8,0$	—
4 мин	—	$-3,1 \pm 20$	$+74 \pm 42$	$-0,9 \pm 7,7$	—
Гибель	$+6,1 \pm 13$	-12 ± 10	$-41 \pm 21^*$	$-4,3 \pm 6,3$	$-15 \pm 7,5^*$
Адаптация	$-53 \pm 17^{***}$	-16 ± 12	$-29 \pm 9,2^{**}$	$-21 \pm 4,3^{4*}$	$+17 \pm 5,7^{**}$
Селезенка					
2 мин	—	$+10 \pm 10$	$+9,0 \pm 17$	$+1,3 \pm 11$	—
4 мин	—	$-3,8 \pm 21$	$-9,0 \pm 24$	$-1,5 \pm 10$	—
Гибель	$+25 \pm 17$	$+0,5 \pm 9,9$	-28 ± 16	$+2,0 \pm 7,1$	$-3,6 \pm 6,2$
Адаптация	—	—	—	—	—
Костный мозг					
2 мин	—	-13 ± 14	$-6,9 \pm 38$	$+10 \pm 14$	—
4 мин	—	—	—	—	—
Гибель	—	$+35 \pm 22$	$+16 \pm 13$	$+12 \pm 15$	—
Адаптация	—	—	—	—	—

органах. Длительная адаптация к периодической гипоксии снижает активность ГПО, ГТ и ГР в большинстве исследованных органов, но не в селезенке. Снижение активности ФМГ интегрально сопоставить с тем, что вторая фаза реакции на острую гипоксию и длительная адаптация к гипоксии происходят обычно по толерантному типу—со снижением потребления O_2 и температуры тела [7, 8, 11]. При этом биохимические механизмы изменений активности ФМГ, вероятно, различны: при острых воздействиях обычно изменяется регуляция активности ферментов, при длительных—их экспрессия [9, 11]. Вероятно, снижение активности ФМГ при адаптации к гипоксии является результатом их репрессии.

Концентрация GSH как при ЭБС, так и при гипоксии и адаптации к ней более стабильна, чем активность ФМГ. Это может быть связано как с противоположными изменениями активности разных ФМГ, так и с компенсаторными сдвигами биосинтеза GSH.

Биологическое значение обнаруженных нами двух типов реакции ФМГ, очевидно, тоже различно. Активация ГПО и ГТ при различных видах стресса должна способствовать увеличению устойчивости организма к перекисидации, вызываемой стрессом и многими ксенобиотиками [10, 13]. Активация ГТ может также способствовать большей резистентности к ксенобиотикам-электрофилам. Снижение активности ГГТ—главного фермента катаболизма GSH [5, 13]—во второй фазе реакции на гипоксию может способствовать сбережению GSH.

Особого внимания заслуживают данные по длительной адаптации к периодической гипоксии, поскольку она обеспечивает широкий спектр защитных эффектов против ряда неблагоприятных воздействий [10]. Наш материал показывает, что эта защита не является универсальной. Комплексное снижение активности ГПО, ГТ и ГР может снизить сопротивляемость организма к перекисидному стрессу и ксенобиотикам-электрофилам.

ЛИТЕРАТУРА

1. Буров Ю. В., Салимов Р. М. // Бюл. экспер. биол.—1975.—№ 5.—С. 64—67.
2. Колесниченко Л. С., Кулинский В. И. // Физиол. журн. СССР.—1990.—Т. 76, № 10.—С. 1418—1425.
3. Колесниченко Л. С., Манторова Н. С., Шапиро Л. А. // Биохимия.—1987.—Т. 52, № 5.—С. 743—749.
4. Колесниченко Л. С., Манторова Н. С., Шапиро Л. А., Кулинский В. И. // Пат. физиол.—1990.—№ 4.—С. 9—11.
5. Кулинский В. И., Колесниченко Л. С. // Успехи биол. химии.—1990.—Т. 31.—С. 157—179.
6. Кулинский В. И., Колесниченко Л. С. // Успехи соврем. биол.—1990.—Т. 110, № 1.—С. 20—33.
7. Кулинский В. И., Ольховский И. А. // Там же.—1992.—Т. 112, № 5.—С. 697—714.
8. Малкин В. В. // Экологическая физиология человека: Адаптация человека к экстремальным условиям среды / Под ред. О. Г. Газенко.—М., 1979.—С. 333—405.
9. Меерсон Ф. З. // Физиология адаптационных процессов / Под ред. О. Г. Газенко, Ф. З. Меерсона.—М., 1986.—С. 10—123; 222—250.
10. Меерсон Ф. З. // Успехи физиол. наук.—1991.—Т. 22, № 2.—С. 52—89.
11. Хочачка П., Сомеро Дж. // Биохимическая адаптация: Пер. с англ.—М., 1988.
12. Anderson M. E. // Glutathione: Chemical, Biochemical and Medical Aspects / Eds D. Dolphin, R. Poulsen, C. O. Avramovic.—New York, 1989.—Pt A.—P. 333—405.

13. Glutathione: Chemical, Biochemical and Medical Aspects / Eds D. Dolphin, R. Poulsen, C. O. Avramovic.—Pt A.—New York, 1989.

Поступила 10.08.93

INFLUENCE OF EMOTIONAL-PAIN STRESS, HYPOXIA AND ITS ADAPTATION ON THE ACTIVITY OF GLUTATHIONE METABOLIC ENZYMES AND GLUTATHIONE CONCENTRATION IN RAT ORGANS

L. S. Kolesnichenko, V. I. Kulinsky, M. V. Yasko, E. N. Ekimov, L. M. Stanevich, E. F. Glushkova, S. B. Belogorov, G. T. Filipova

Medical Institute, Irkutsk

The stress activates glutathione peroxidase in the heart, liver, and kidney, glutathione transferase in the heart and liver, inhibits γ -glutamyl transferase in the liver; the activity of glutathione reductase and the content of reduced glutathione were unchanged. Two-four-minute hypercapnic hypoxia unchanged the activity of glutathione metabolic enzymes. The activity of the above enzymes decreases in some organs at the death caused by 2-15-minute hypoxia. Long-term intermittent adaptation to hypobaric hypoxia lowers the activity of glutathione peroxidase, -transferase and -reductase. The biological value of the two types of enzymatic responses may be different: stress-induced activation of glutathione metabolic enzymes can enhance resistance to stress and xenobiotics; however, their inhibition during hypoxic adaptation may produce the opposite effect.

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 1994

УДК 616.379-008.64-092.9-07:616.36-008.939.15

Ю. А. Козлов, Э. В. Сапрыкина, А. Н. Байков, В. В. Новицкий

МЕТАБОЛИЗМ НЕЙТРАЛЬНЫХ ЛИПИДОВ В ОРГАНАХ ГЕМОПОЭЗА И В ПЕЧЕНИ МЫШЕЙ С АЛЛОКСАНОВЫМ ДИАБЕТОМ

ЦИЛ Сибирского государственного медицинского университета, Томск

Сахарный диабет характеризуется существенными нарушениями липидного обмена [10, 12, 14]. В последние годы интенсивно изучаются изменения липидных и липопротеидных фракций крови при этом заболевании [3, 4, 16, 17]. В меньшей степени исследованы нарушения липидного обмена на органном и тканевом уровнях. Особенно это касается системы крови, отдельных ее органов и клеток [18, 19]. Как известно, многие клетки этой системы проявляют определенную чувствительность к инсулину [5, 6, 15]. Наиболее же выражено при сахарном диабете страдает функция цитотоксических Т-лимфоцитов, образующихся в тимусе [5]. Исходя из этого, в данной работе ставилась цель изучить состояние обмена нейтральных липидов в тимусе, селезенке и лимфоузлах у животных с экспериментальным сахарным диабетом. Исследовалась также печень как орган, занимающий центральное место в липидном обмене организма.

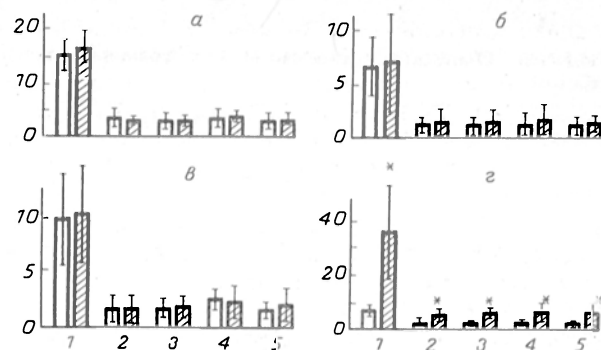
Методика. Исследования выполнены на 30 мышах-самцах линии BALB/c (питомник «Рассвет», Томск) массой 18—20 г. Из них 15 мышей составили контрольную интактную группу, 15—группу животных с подострым 3-недельным аллоксановым диабетом (концентрация глюкозы в крови не ниже 14 ммоль/л, определяли унифицированным о-толуидиновым методом). Диабет

вызывали однократным подкожным введением 4% раствора аллоксангидрата («Лаксима-Хема-нол», Чехия) в дозе 400 мг/кг.

О состоянии синтеза липидов и отдельных их фракций в исследованных органах судили по включению меченых предпестественников — 1,2-³H-уксусной кислоты (1,3 ТБк/моль) и 1-¹⁴C-пальмитиновой кислоты (1,7 ТБк/моль) (В/О «Изотоп»), которые вводили внутрибрюшинно в 0,2 мл изотонического раствора хлористого натрия одновременно за 2 ч до забоя животных. Меченый ацетат инъецировали в дозе 200 МБк/кг, меченый пальмитат — в дозе 40 МБк/кг. Мышей забивали путем разрушения шейного отдела позвоночника. Для исследований быстро извлекали печень, селезенку, тимус и илеоцекальный комплекс лимфоузлов, которые промывали в холодном растворе Хенкса (4° С), после чего брали навески 100—200 мг и гомогенизировали на холоду в хлороформ-метаноловой смеси (2:1) с использованием стеклянного гомогенизатора Поттера. Тимусы и лимфоузлы объединяли от 3 мышей. Общий липидный экстракт из гомогенатов получали по методу [13]. Содержание общих липидов оценивали по [1]. Определение уровней отдельных фракций липидов (свободный и эфирсвязанный холестерин, моно-, ди- и триацилглицериды) проводили методом тонкослойной хроматографии на пластинках «Silufol UV-254» (Чехия). Для разделения использовали смесь растворителей гептан—этиловый эфир—этиловый эфир уксусной кислоты в соотношении 80:20:1,5 [2]. Включение радиоактивных меток в общие липиды и их индивидуальные компоненты оценивали в толуоловом сцинтилляторе (РРО—4 г, РОРОР—0,1 г, толуол—1 л) и выражали в импульсах в 1 мин на 1 мг липидов отдельно для меченого ацетата и пальмитата. Радиоактивность липидных фракций, элюированных с хроматограмм хлороформ-этиловой смесью (2:1), определяли после выпаривания и добавления к сухому остатку 10 мл толуолового сцинтиллятора [8]. Радиоактивность подготовленных проб измеряли на отечественном бета-анализаторе «Бета-2» в режиме одновременной регистрации ³H и ¹⁴C (метод двойной радиоизотопной метки). Эффективность регистрации в усеченных тритиевом и углеродном каналах составляла соответственно 25 и 60%. Делали поправку на углеродный плеф в тритиевом канале, которая составляла 9% от радиоактивности ¹⁴C. Полученные данные обрабатывали методом вариационной статистики с использованием критерия Стьюдента.

Результаты и обсуждение. Результаты исследований показали, что у мышей линии BALB/c с 3-недельным аллоксановым диабетом абсолютное содержание липидов и их отдельных фракций (свободный и эфирсвязанный холестерин, моно-, ди- и триацилглицериды) в ткани печени, селезенке и лимфоузлах существенно не отличалось от соответствующих значений в группе контрольных животных (см. рисунок). Данные литературы также свидетельствуют, что развитие этой формы диабета у животных не сопровождается ожирением паренхиматозных органов (в частности, печени) и кетозом [6, 9].

Вместе с тем при изучении синтеза липидов по включению меченых предпестественников у живот-



Содержание нейтральных липидов (в мг/г) и отдельных их фракций в различных тканях мышей с аллоксановым диабетом.

1—общие липиды; 2—свободный холестерин; 3—моно- и диацилглицериды; 4—триацилглицериды; 5—эфиры холестерина. а—печень; б—селезенка; в—лимфоузлы; г—тимус. Светлые столбики—контроль, заштрихованные—опыт. Звездочка— $p < 0,001$. Представлены средние величины и их доверительные интервалы.

ных с диабетом нами были выявлены существенные сдвиги по сравнению со здоровыми мышами. В печени скорость включения ацетата в суммарные липиды у подопытных животных оказалась сниженной почти на 60% за счет уменьшения его включения в холестерин и триацилглицериды и несколько в меньшей степени в моно- и диацилглицериды (табл. 1). Известно, что синтез холестерина из ацетата при аллоксановом диабете может увеличиваться лишь в том случае, когда животные находятся на очень богатой углеводной диете и в печень поступает большое количество глюкозы [16]. Аналогичная зависимость прослежена и при использовании в качестве предпестественника синтеза липидов печени ¹⁴C-пальмитата (табл. 2). Включение последнего в общие липиды печени при диабете также имело тенденцию к угнетению, при этом более существенно нарушался синтез индивидуальных липидных компонентов: холестерина (на 39%), эфиров холестерина (на 49%), моно-, ди- и триацилглицеридов (в среднем на 30%). Полученные нами результаты согласуются с данными других авторов [14], изучавших скорость включения 1-¹⁴C-ацетата в липиды и фосфолипиды печени у крыс с аллоксановым диабетом и пришедших к подобному же выводу о существенном угнетении включения указанного предпестественника в фосфолипиды, триацилглицериды и эфиры холестерина. Угнетение включения меченых предпестественников в отдельные липидные фракции обычно трактуется как проявление их низкой метаболической обновляемости [8, 14].

Такая же, как и в печени, направленность изменений метаболизма нейтральных липидов была выявлена в лимфоузлах мышей с диабетом (см. табл. 1 и 2).

Вместе с тем нарушения метаболизма липидов в селезенке, клеточный состав которой в качественном отношении у мышей имеет много общего с костным мозгом, при аллоксановом диабете характеризовались особенностями, которые мы не смогли бы обнаружить, если бы использовали в качестве меченого предпестественника один лишь ацетат. Включение последнего в такие липидные фракции, как свободный и эфирсвязанный холестерин, а также триацилглицериды, в указанном органе животных с диа-

Таблица 1

Включение ^3H -ацетата (в ими/мин на 1 мг фракции липидов $\cdot 10^3$) в нейтральные липиды различных тканей мышей с аллоксановым диабетом

Исследованные органы	Группа животных	Число животных	Общие липиды	Свободный холестерин	Моно- и диацилглицериды	Триацилглицериды	Эфиры холестерина
Печень	Контроль	14	74,7 \pm 7,5	34,8 \pm 4,0	14,3 \pm 4,0	127,4 \pm 8,8	25,0 \pm 1,0
	Опыт	15	32,3 \pm 4,8	11,2 \pm 0,5	9,6 \pm 1,2	46,8 \pm 5,7	10,2 \pm 1,2
	<i>p</i>		<0,001	<0,001	>0,05	<0,001	<0,001
Селезенка	Контроль	15	41,2 \pm 5,3	49,8 \pm 5,7	28,2 \pm 3,0	33,0 \pm 2,4	21,2 \pm 3,2
	Опыт	15	27,7 \pm 4,9	14,6 \pm 1,7	24,5 \pm 2,2	22,3 \pm 2,2	10,2 \pm 1,4
	<i>p</i>		>0,05	<0,001	>0,05	<0,001	<0,001
Лимфоузлы	Контроль	15	30,6 \pm 1,8	13,6 \pm 1,8	15,7 \pm 2,3	61,0 \pm 6,9	11,0 \pm 1,1
	Опыт	15	14,0 \pm 1,1	9,6 \pm 1,0	12,4 \pm 0,8	15,0 \pm 1,0	5,6 \pm 0,6
	<i>p</i>		<0,001	<0,01	>0,05	<0,001	<0,001
Тимус	Контроль	15	16,8 \pm 1,0	26,3 \pm 2,8	18,6 \pm 2,5	13,6 \pm 2,1	7,1 \pm 0,4
	Опыт	15	12,6 \pm 1,3	12,0 \pm 0,5	13,7 \pm 1,0	10,0 \pm 1,1	9,6 \pm 1,1
	<i>p</i>		<0,05	<0,001	>0,05	>0,05	<0,05

Таблица 2

Включение ^{14}C -пальмитата (в ими/мин на 1 мг фракции липидов $\cdot 10^3$) в липиды различных тканей мышей с аллоксановым диабетом

Исследованные органы	Группа животных	Число животных	Общие липиды	Свободный холестерин	Моно- и диацилглицериды	Триацилглицериды	Эфиры холестерина
Печень	Контроль	14	63,2 \pm 10,7	21,2 \pm 2,8	16,6 \pm 0,8	151,8 \pm 8,1	14,7 \pm 1,0
	Опыт	15	57,1 \pm 6,0	13,0 \pm 0,8	10,4 \pm 1,1	103,4 \pm 11,0	7,5 \pm 0,8
	<i>p</i>		>0,05	<0,01	<0,001	<0,01	<0,001
Селезенка	Контроль	15	76,2 \pm 11,0	40,9 \pm 4,6	50,3 \pm 6,7	91,1 \pm 7,5	18,2 \pm 2,1
	Опыт	15	105,5 \pm 18,6	34,6 \pm 2,9	65,7 \pm 7,6	129,2 \pm 9,0	13,7 \pm 1,6
	<i>p</i>		>0,05	>0,05	>0,05	<0,001	>0,05
Лимфоузлы	Контроль	15	33,2 \pm 6,5	9,6 \pm 0,5	15,6 \pm 0,5	66,5 \pm 3,7	6,8 \pm 0,4
	Опыт	15	13,9 \pm 1,3	3,2 \pm 0,4	4,0 \pm 0,3	33,4 \pm 1,6	1,9 \pm 0,1
	<i>p</i>		<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001
Тимус	Контроль	15	11,5 \pm 0,8	2,8 \pm 0,1	21,5 \pm 3,0	12,0 \pm 0,1	2,5 \pm 0,5
	Опыт	15	7,0 \pm 0,4	4,3 \pm 0,6	7,4 \pm 0,5	8,3 \pm 0,7	1,9 \pm 0,4
	<i>p</i>		<0,05	<0,05	<0,001	<0,001	>0,05

бетом угнеталось так же, как в печени и лимфоузлах (см. табл. 1). Однако включение ^{14}C -пальмитиновой кислоты при этом в большинстве случаев не нарушалось, а в отношении триацилглицеридов даже достоверно увеличивалось (на 42%; см. табл. 2), что свидетельствовало об увеличении скорости обновления данной липидной фракции в спленоцитах. Последнее может косвенно указывать на более интенсивное поступление триацилглицеридов селезенки в плазму крови в составе липопротеидных комплексов. Если это действительно так, то нарушения липидного обмена в селезенке могут быть причастны к развитию гипертриацилглицеридемии, характерной для сахарного диабета [7, 9, 10, 16]. Эта гипотеза, на наш взгляд, заслуживает особого внимания.

Наиболее существенные нарушения метаболизма липидов при аллоксановом диабете были выявлены нами в тимусе (см. рисунок, табл. 1 и 2), который синтезирует гуморальный фактор, участвующий в регуляции липидного обмена [2]. Общее содержание липидов в тимусе через 3 нед после развития аллоксанового диабета возрастало у мышей в 5 раз за счет всех изученных фракций, что могло отражать процесс ускоренной инволюции этого органа и частичное замещение лимфоидной ткани жировой. Как известно, состояние сахарного диабета у животных характеризуется выраженной атрофией тимуса и его гипоплазией [5, 6]. Вместе с тем интенсивность синтеза липидов из меченых предшественников в тимусе в целом бы-

ла существенно подавлена. Исключение составляли процессы синтеза эфиров холестерина из ^3H -ацетата и свободного холестерина из ^{14}C -пальмитата, несколько усиливавшиеся у мышей с диабетом. Наиболее же выражено в этом органе угнеталось включение меченого ацетата в холестерин, меченого пальмитата в моно-, ди- и триацилглицериды. При этом не исключено, что нарушение синтеза холестерина из меченой уксусной кислоты могло быть связано с активацией 3-гидрокси-3-метилглутарил-КоА-(ГМГ-КоА)-редуктазы, катализирующей превращение ГМГ-КоА в мевалоновую кислоту, являющуюся лимитирующим звеном в биосинтезе холестерина из ацетата [11].

Таким образом, результаты проведенного исследования позволили установить, что состояние экспериментального сахарного диабета характеризуется существенными нарушениями липидного обмена не только в печени, занимающей одно из центральных мест в метаболизме липидов, но также и в других тканях организма, в частности в гемopoэтической. Проявления этих нарушений и в печени, и в гемopoэтических органах в большинстве случаев сходны и могут трактоваться как снижение скорости обновляемости отдельных липидных фракций и всех нейтральных липидов в целом. Вместе с тем заслуживает внимания вопрос о роли органов гемopoэза (в первую очередь селезенки) в патогенезе общих нарушений липидного обмена, свойственных сахарному диабету, например в механизме развития гипертриацилглицеридемии.

ЛИТЕРАТУРА

1. Биохимические методы исследования в клинике / Под ред. А. А. Покровского. — М., 1969.
2. Кемилева З. Виточковая железа. — М., 1984.
3. Кейте М. Техника липидологии. — М., 1976.
4. Кирякова А., Косов Д., Каверыкова Ю. и др. // Пробл. эндокринологии. — 1990. — № 6. — С. 25—29.
5. Козлов Ю. А., Лаврова В. С. // Успехи соврем. биол. — 1988. — № 3. — С. 505—520.
6. Козлов Ю. А., Локтиошина Т. А. // Пат. физиол. — 1992. — № 3. — С. 25—27.
7. Лейтес С. М. Проблемы регуляции обмена веществ в норме и патологии. — М., 1978.
8. Методы биохимических исследований / Под ред. М. И. Прохоровой. — Л., 1982.
9. Потемкин В. В. Эндокринология. — М., 1986.
10. Старкова Н. Р. Сахарный диабет. — М., 1988. — С. 23—25.
11. Холестериноз / Лопухин Ю. М., Арчаков А. И., Владимиров Ю. А. и др. — М., 1983.
12. Denton R. M., Tavare J. M. // Diabetes Annual. — Amsterdam, 1988. — P. 546—564.
13. Folch J., Lees M., Sloane Stanley G. H. // J. biol. Chem. — 1957. — Vol. 226, № 1. — P. 497—509.
14. Greco A. V., Mingrone G., Peruzzi E. et al. // Acta med. rom. — 1979. — Vol. 17, № 4. — P. 357—363.
15. Jones R. L., Peterson Ch. M. // Amer. J. Med. — 1981. — Vol. 70, № 2. — P. 339—352.
16. Kern Ph. A. // Mount Sinai J. Med. — 1987. — Vol. 54, № 3. — P. 245—252.
17. Laakso M., Pyörälä K., Voutilainen E. et al. // Amer. J. Epidemiol. — 1987. — Vol. 125, № 4. — P. 611—621.
18. McBrinn S., Collins P., Johnson A. et al. // Diabetologia. — 1991. — Vol. 34, Suppl. 2. — P. 23.
19. Zamorano A. F., Arnalich F., Ferro-Sanchez A. et al. // Med. Clin. — 1987. — Vol. 89, № 17. — P. 717—720.

Получила 24.05.93

METABOLISM OF NEUTRAL LIPIDS IN HEMOPHOETIC ORGANS AND IN THE LIVER OF MICE WITH ALLOXAN DIABETES

Yu. A. Kozlov, E. V. Saprykina, A. N. Baykov, V. V. Novitsky

Central Research Laboratory, Siberian Medical Institute, Tomsk

The metabolism of neutral lipids (free and ester-bound cholesterol, mono-, di- and triacylglycerides) was greatly impaired in liver, spleen, thymus tissues and ileocecal lymph nodes of BALB/c mice with subacute alloxan diabetes (content of sugar in blood was no less than 14 mmol/l) as shown by ^3H -acetate and ^{14}C -palmitate incorporation into the corresponding lipid fractions. The rate of neutral lipid turnover was specifically decreased in all the tissues studied. However, a considerable accumulation of these lipid fractions was found in thymus tissue. Incorporation of labelled palmitate into triacylglycerides was increased in the spleen but without obesity of the organ.

© А. Н. КОТЕРОВ, 1994

УДК 616.36+616.419+616.155.33+008.96-02:547.262+07

А. Н. Котеров

СОДЕРЖАНИЕ МЕТАЛЛОТИОНЕИНОВ В ПЕЧЕНИ, КОСТНОМ МОЗГЕ И ЛИМФОЦИТАХ КРЫС ПОСЛЕ ВВЕДЕНИЯ ЭТАНОЛА

Институт биофизики Минздрава РФ, Москва

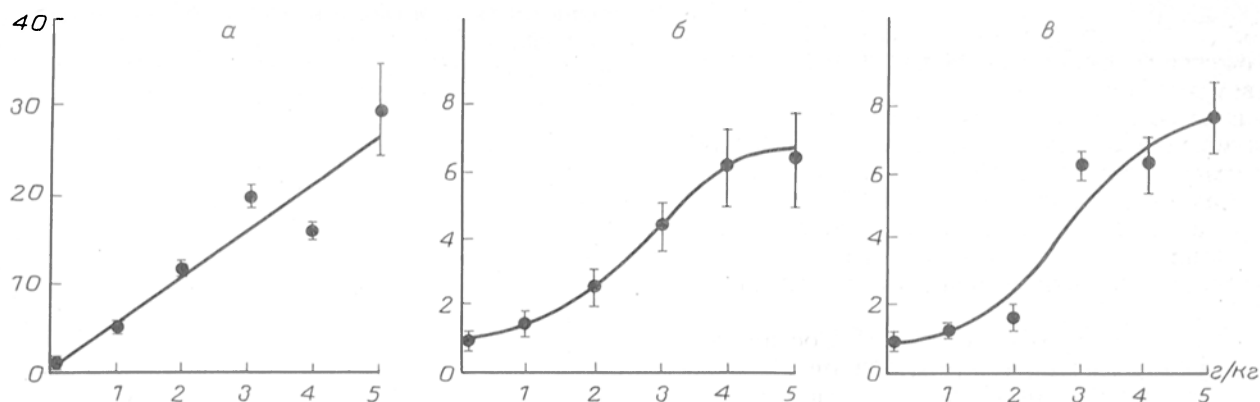
Металлотионсины (МТ) представляют собой низкомолекулярные белки, содержащие до 30% цистеина и способные связывать ионы тяжелых металлов [12]. Синтез МТ, являющихся стрессорными белками (или белками «острой фазы» [11]), индуцируется после различных воздействий токсической природы, что приводит к увеличению

резистентности биологических объектов [11, 12]. Показано, что низкомолекулярные спирты при введении грызунам повышают содержание МТ в печени [6, 17, 18], а этанол — как в печени, так и в поджелудочной железе [18]. В то же время этиловый спирт не обладал способностью индуцировать синтез МТ в почках и кишечнике мышей [18]. Для других клеток и тканей подобные исследования не проводились. Увеличение уровня МТ в тканях под влиянием алкоголей рассматривают как адаптивный ответ, приводящий к уменьшению токсичности этих органических веществ [6, 17, 18]. Так, нами показано, что экзогенный цинк-МТ при введении мышам снижает острую токсичность этанола [3]. Повышенный уровень МТ в печени после алкогольного отравления обусловливает увеличение резистентности крыс к ионам Cd^{2+} [13]. Поскольку данные об индукции этанолом синтеза МТ в тканях не отличаются полнотой (исследованы только пищеварительные органы и почки, причем не всегда отмечено изменение содержания МТ [6, 17, 18]), представляло интерес выяснить, обладают ли подобным адаптивным ответом к действию этилового спирта клетки, определяющие иммунную реактивность организма. В представленной работе показано, что этанол вызывает увеличение уровня МТ не только в печени, но и в костном мозге и лимфоцитах крыс.

Методика. Использовали беспородных белых крыс массой 300—350 г. Этанол (32% ректификат в физиологическом растворе) вводили внутривенно. Контрольным крысам инъецировали соответствующий объем физиологического раствора. Острую токсичность этанола определяли по Керберу [2]. Через 1 сут после алкогольного отравления животных забивали под эфирным наркозом. Лимфоциты получали из гепаринизированной крови с помощью центрифугирования в градиенте фиколи-верографина [1]. Получение костного мозга грызунов и подсчет в суспензии числа ядросодержащих клеток описаны нами ранее [4]. Содержание МТ в печени определяли кадмий-гемоглобиновым методом строго по методике [7] (использовали отечественный $^{109}\text{Cd}^{2+}$ («Изотоп») с удельной радиоактивностью 92 ГБк/мг и гемоглобин лошади фирмы «Sigma» (США)). В костном мозге и лимфоцитах МТ определяли по модифицированному нами методу [4], позволившему увеличить чувствительность оригинальной методики [7]. Подсчет радиоактивности осуществляли на счетчике «G-track» (Нидерланды). Содержание МТ (на 1 г печени или на 10^7 ядросодержащих клеток костного мозга или лимфоцитов) рассчитывали по формуле, приведенной в работе [7], исходя из способности этих белков связывать до 6 г-атом Cd^{2+} на 1 моль [7, 11, 12].

На каждую экспериментальную точку приходилось по 3—4 крысы.

Результаты и обсуждение. ЕД₅₀ этанола при внутривенном введении крысам составила 4,2 г/кг. Содержание МТ в печени, костном мозге и лимфоцитах контрольных крыс было равно $6,3 \pm 1,4$ мкг/г, 98 ± 26 и $18,6 \pm 5,5$ нг/ 10^7 клеток соответственно. По данным литературы, в печени интактных грызунов содержится от 6,5 мкг/г [14] до 28 [19] мкг/г МТ. Для кост-



Содержание МТ в печени (а), костном мозге (б) и лимфоцитах (в) крыс после введения этанола.

По оси абсцисс — доза этанола, г/кг; по оси ординат — степень изменения уровня МТ по сравнению с контролем.

ного мозга сведений нет, за исключением нашей работы [4], в которой показано, что уровень МТ у мышей составляет 126 ± 15 нг/ 10^7 ядродержащих клеток. Количество МТ в лимфоцитах определено только для клеток человека (20 — 30 нг/ 10^7 клеток) [9]. Таким образом, полученные нами значения близки к описанным в литературе.

Ранее продемонстрировано, что после введения грызунам этанола уровень МТ в печени увеличивается начиная с 4 ч после интоксикации, достигает максимума через 24 ч и снижается до нормы спустя 2 сут после воздействия [18], поэтому нами был выбран срок 24 ч после алкогольного отравления. На рисунке представлены результаты определения содержания МТ в печени, костном мозге и лимфоцитах крыс в условиях введения этанола. Видно, что спирт значительно повышает количество МТ в печени, причем наблюдается прямо пропорциональная зависимость от дозы алкоголя (см. рисунок, а). В костном мозге и лимфоцитах увеличение показателя выражено в значительно меньшей степени; при этом вплоть до дозы этанола, равной 2 г/кг, повышение относительно невелико, значительно возрастает при больших дозах и практически достигает насыщения после инъекции 3—5 г/кг алкоголя (см. рисунок, б, в). Показано, что после внутрижелудочного введения этанола в дозах до 3 г/кг уровень МТ в печени не увеличивается, а при дозе 5 г/кг отмечено 19-кратное его повышение [18]. В другой работе внутрибрюшинная инъекция крысам этанола (1,28 г/кг) вызывает 8-кратное увеличение содержания МТ в печени [17]. По нашим данным (см. рисунок, а), внутрибрюшинное введение этанола в дозе 1 г/кг вызывает 5,5-кратное, а 5 г/кг — 30-кратное повышение уровня МТ в печени. Возможно, большая степень индукции и линейная зависимость содержания МТ от дозы алкоголя, полученные нами и не обнаруженные в работе [18], связаны как с видом животных (крысы), так и со способом инъекции (внутрибрюшинный, а не внутрижелудочный).

Хотя механизм увеличения уровня МТ в тканях при введении спиртов не выяснен до конца, обнаружено, что подобные изменения в печени являются следствием синтеза этих белков de novo.

Ингибитор белкового синтеза — актиномицин D, введенный перед этанолом, предотвращал последующее повышение содержания МТ [18], а изопропанол (самый сильный индуктор синтеза МТ из низкомолекулярных спиртов [6]) увеличивал количество МТ мРНК в печени [17]. Можно предположить, что повышение уровня МТ в костном мозге и лимфоцитах также связано с их синтезом de novo, поскольку есть данные, что в ранние сроки после токсических воздействий эти белки не могут транспортироваться от одного органа к другому [16]. В то же время показано, что увеличение количества МТ в печени и почках приводит к некоторому повышению их уровня в плазме крови и моче [15]. Поэтому нельзя полностью исключить возможности транспортировки МТ из печени через кровь в клетки костного мозга и лимфоциты. Однако в условиях алкогольного отравления (5 г/кг) отсутствовали изменения количества МТ в почках и кишечнике и отмечено только слабое (в 1,7 раза) повышение содержания МТ в поджелудочной железе [18]. Способность костного мозга отвечать индукцией синтеза МТ на токсические воздействия продемонстрирована нами в опытах на мышах [4]. Актиномицин D, введенный животным перед CdCl₂, предотвращал синтез МТ в этом органе, индуцированный тяжелым металлом [4]. Сходные данные получены другими факторами на лимфоцитах человека [9].

Механизм индукции синтеза МТ спиртами неясен. Такая индукция не обусловлена метаболитом этанола ацетальдегидом, поскольку инъекция мышам пиразола (ингибитора ацетальдегидрогеназы) не подавляла синтез МТ в печени [18]. При инкубировании гепатоцитов крысы в течение 24 ч с этанолом не отмечено увеличения содержания МТ [6]. Таким образом, эффект спиртов реализуется, по-видимому, на уровне организма. Синтез МТ в тканях вряд ли обусловлен только увеличением концентрации спирта в крови. Эффект не связан также с выбросом катехоламинов, так как блокатор адренергических рецепторов не устраняет повышение алкоголяем уровнем МТ в печени [6], а адреналэктомия не предотвращает индукцию синтеза МТ изопропанолом [17]. Предполагают, что механизм влияния спиртов на синтез МТ объясняется гомеостазом цинка

и глюкокортикоидов [6, 17]. Известно, что алкогольное отравление приводит к мобилизации цинка из тканей, поступлению его в кровь и накоплению в печени [5, 6, 17]. Отмечено увеличение уровня кортикостерона в плазме мышей после введения этанола, однако кортикостерон, инъектированный животным, был менее сильным индуктором синтеза МТ по сравнению с алкоголем [6]. По-видимому, наиболее вероятная причина увеличения содержания МТ в тканях после алкогольного отравления — мобилизация цинка. Действительно, МТ, синтезированный в печени в условиях этанольной интоксикации, является цинк-МТ [18]. Поскольку цинк после введения спирта, поступающий из различных тканей, накапливается в печени [5], то в этом органе и наблюдается максимальная степень индукции синтеза МТ (см. рисунок). Возможно, что некоторое накопление цинка, поступающего из крови, наблюдается и в костном мозге, и в лимфоцитах, что повышает в них уровень МТ.

Биологическое значение увеличения содержания МТ в тканях заключается, по-видимому, в снижении токсичности как самого спирта, так и его метаболита ацетальдегида. Известно, что вещества, содержащие тиоловые группы, при введении грызунам снижают острую токсичность этанола [8, 10]. Нами показано, что таким же свойством обладает и очищенный препарат цинк-МТ [3]. Эффект тиоловых агентов связан с их способностью образовывать соединения с ацетальдегидом, что снижает токсичность последнего, усиливает его выведение и ускоряет метаболизм этанола [8, 10].

ЛИТЕРАТУРА

1. Агрба В. З., Тимановская В. В. // Методы культивирования клеток / Под ред. Г. П. Пинасва. — Л., 1988. — С. 299—309.
2. Бельский М. Л. Элементы количественной оценки фармакологического эффекта. — Л., 1963. — С. 49—52.
3. Котеров А. Н., Сазыкин А. Ю., Филиппович И. В. // Бюл. эксп. биол. — 1993. — № 1. — С. 39—40.
4. Котеров А. Н., Сазыкин А. Ю., Филиппович И. В. // Радиобиология. — 1993. — Т. 33, № 1. — С. 122—127.
5. Ahmed S. B., Russel R. M. // J. Lab. clin. Med. — 1992. — Vol. 100, № 1. — P. 211—217.
6. Bracken W. M., Klaassen C. D. // Toxicol. appl. Pharmacol. — 1987. — Vol. 87, № 2. — P. 257—263.
7. Eaton D. L., Toal B. F. // Ibid. — 1982. — Vol. 66, № 1. — P. 134—142.
8. Feo F., Pascale R., Garcea R. et al. // Ibid. — 1986. — Vol. 83, № 2. — P. 331—341.
9. Harley C. B., Menon C. R., Rachubinski R. A. et al. // Biochem. J. — 1989. — Vol. 262, № 3. — P. 873—879.
10. Hirayama C., Kishimoto Y., Wakushima T., Murawaki Y. // Biochem. Pharmacol. — 1983. — Vol. 32, № 2. — P. 321—325.
11. Kagi J. H. R., Schäffer A. // Biochemistry (Wash.). — 1988. — Vol. 27, № 23. — P. 8509—8515.
12. Karin M. // Cell. — 1985. — Vol. 41, № 1. — P. 9—10.
13. Kershaw W. C., Iga T., Klaassen C. D. // Toxicol. appl. Pharmacol. — 1990. — Vol. 106, № 3. — P. 448—455.
14. Nolan C. V., Shaikh Z. A. // Ibid. — 1986. — Vol. 85, № 2. — P. 135—144.
15. Nordberg G. F., Garvey J. S., Chang Ch. C. // Environ. Res. — 1982. — Vol. 28, № 1. — P. 179—182.
16. Onosaka S., Chierian M. G. // Toxicology. — 1982. — Vol. 23, № 1. — P. 11—20.
17. Swerdel M. R., Cousins R. J. // Proc. Soc. exp. Biol. (N. Y.). — 1984. — Vol. 175, № 4. — P. 522—529.
18. Waalkes M. P., Hjelte J. J., Klaassen C. D. // Toxicol. appl. Pharmacol. — 1984. — Vol. 74, № 2. — P. 230—236.
19. Waalkes M. P., Garvey J. S., Klaassen C. D. // Ibid. — 1985. — Vol. 79, № 3. — P. 524—527.

Поступила 26.06.93

CONTENT OF METALLOTHIONEINS IN THE LIVER, BONE MARROW AND LYMPHOCYTES OF ETHANOL-TREATED RATS

A. N. Koterov

Institute of Biophysics, Ministry of Health of the Russian Federation, Moscow

The levels of metallothioneins in the rat liver, bone marrow and lymphocytes were shown to be increased 24 hours after intraperitoneal administration of ethanol in doses of 1 to 5 mg/kg. There was a linear dependence of the hepatic levels of metallothioneins upon the dose of alcohol. The increase in the levels of metallothioneins was less pronounced in the bone marrow and lymphocytes than in the liver. The effect detected is likely to be associated with the redistribution of zinc during alcoholic intoxication. It is suggested that the increase in the pool of metallothioneins in the bone marrow and lymphocytes is an essential stage for protecting the cells that determine the body's immunity in intoxication.

© Т. В. СКОБЕЛЕВА, 1994

УДК 616.36+004.1-092.9-07:616.36-018.2-008.9

Т. В. Скобелева

МЕТАБОЛИЗМ ОСНОВНОГО ВЕЩЕСТВА СОЕДИНИТЕЛЬНОЙ ТКАНИ НА РАЗЛИЧНЫХ СТАДИЯХ РАЗВИТИЯ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОГО ЦИРРОЗА ПЕЧЕНИ

Центральный НИИ гастроэнтерологии, Москва

Одним из основных механизмов изменения обмена основного вещества соединительной ткани (СТ) при патологических состояниях, сопровождающихся развитием фиброза, служит изменение уровня гликозаминогликангидролаз (ГАГ-гидролаз), обеспечивающих последовательный распад молекулы гликозаминогликанов (ГАГ). В избыточном новообразовании СТ важная роль отводится как увеличению активности данных катаболических ферментов, так и ее снижению [17, 18, 22—24]. Исследование системы ГАГ—ГАГ-гидролазы на последовательных стадиях становления и формирования экспериментального цирроза печени позволяет уточнить механизм новообразования СТ при данном патологическом процессе.

Методика. В течение нескольких лет исследования проводили на 400 половозрелых крысах-самцах линии Вистар в одно и то же время года — с мая по октябрь. Цирроз печени воспроизводили подкожным введением CCl_4 в оливковом масле (1:1) в дозе 0,1 мл смеси на 100 г массы тела экспериментальных животных дважды в неделю в течение 3 нед, 2, 4 и 6 мес, что позволяло соответственно получать модель умеренного перинотального фиброза, формирующегося цирроза, сформированного компенсированного и декомпенсированного цирроза [27]. При работе с крысами не применяли механические зажимы типа карцангов. В качестве контроля для каждой группы использовали интактных животных из той же партии. Крыс забивали вскрытием сердца под гексеналовым наркозом. Кровь получали из сердца *ex tempore*, печень перфузировали ледяным 0,25 М раствором сахарозы,

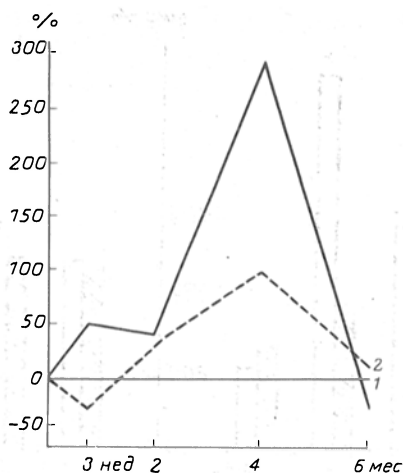


Рис. 1. Содержание ГК (в мкг%) в ткани печени и сыворотке крови в динамике формирования токсического цирроза печени у крыс.

Здесь и на рис. 2 и 3: по оси абсцисс — срок исследования; по оси ординат — показатели, % к интактному контролю этой же возрастной группы, принятому за 0. 1 — ГК в ткани печени; 2 — ГК в сыворотке крови.

гомогенизировали при 1000 об/мин. Исходный 10% гомогенат готовили на 0,25 М растворе сахарозы с содержанием 0,001 М натриевой соли ЭДТА pH 7,4. Для определения общей ферментной активности гомогенат разводили до требуемой концентрации и обрабатывали 0,2% раствором тритона X-100 [2].

Для оценки обмена СТ использовали определение уровня гексуроновых кислот (ГК) в ткани печени [12] и в сыворотке крови [13, 15], а также изменение активности 3 ГАГ-гидролаз: гиалуронидазы (гиалуронатгликангидролазы) [1, 14], β -глюкуронидазы [16, 19] и β -N-ацетилглюкозаминидазы [28] в сыворотке крови, и изменение общей активности этих ферментов в гомогенате ткани печени [2]. В общем гомогенате ткани печени определяли содержание белка [20]. Результаты обработаны статистически с применением критерия Стьюдента.

Результаты и обсуждение. Введение CCl_4 по указанной схеме позволяло получать токсический цирроз у экспериментальных животных [7, 8]. Нами были изучены 4 стадии развития поражения: хронического гепатита, формирующегося цирроза, сформированного цирроза и стадии декомпенсированного цирроза печени [9].

Для определения метаболизма основного вещества СТ печени изучали систему ГАГ — ГАГ-гидролазы в ткани печени и сыворотке крови у крыс на всех стадиях формирования и развития экспе-

риментального цирроза. Полученные результаты исследования как в ткани печени, так и в сыворотке крови показали неоднозначность механизмов новообразования основного вещества СТ на различных стадиях становления и прогрессирования хронического поражения печени. На начальной стадии развития поражения увеличение синтеза основного вещества было обусловлено стимулированием процесса новообразования продуктами деструкции в ответ на повреждение клеток гепатотоксином. При этом наряду с повышенным уровнем ГАГ в ткани печени отмечалась и увеличенная активность ГАГ-гидролаз в ткани печени и в сыворотке крови. Увеличение уровня ГАГ-гидролаз в этот период в сыворотке крови приводило к снижению содержания ГАГ в сыворотке крови ниже нормы (рис. 1.).

Для стадий формирующегося и сформированного цирроза был главным образом характерен процесс активного новообразования основного вещества вследствие увеличения активности мезенхимальных клеток как в ткани печени, так и в сыворотке крови на фоне резкого снижения каталитической активности ГАГ-гидролаз в ткани печени (рис. 2, а). При этом в сыворотке крови динамика данных ферментов в это время не была такой однозначной (рис. 2, б).

Таким образом, избыточный синтез и накопление СТ при формировании и развитии хронического поражения печени наблюдаются при сниженной активности ГАГ-гидролаз на фоне недостаточного резорбтивного действия каталитических ферментов. По-видимому, данный патологический процесс может быть остановлен или замедлен стимуляцией активности гиалуронидазы — фермента, начинающего распад молекулы ГАГ. Это предположение подтверждается работой [4], в которой при затяжном течении вирусного гепатита у больных с нормальной или сниженной активностью сывороточной гиалуронидазы проведен курс лечения лидазой — отечественным препаратом гиалуронидазного действия. Следует отметить, что практически у всех больных в данной группе наступило клиническое выздоровление со стойкой нормализацией содержания билирубина в крови, восстановлением работоспособности, нормализацией размеров печени, ее консистенции. Активность гиалуронидазы сыворотки крови у всех обследованных была нормальной как сразу после лечения, так и через год.

Таким же закономерным и постоянным, как значительное увеличение содержания ГК в ткани печени и сыворотке крови, при формировании

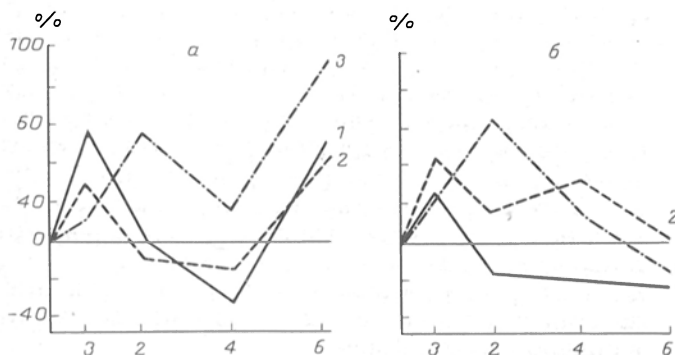
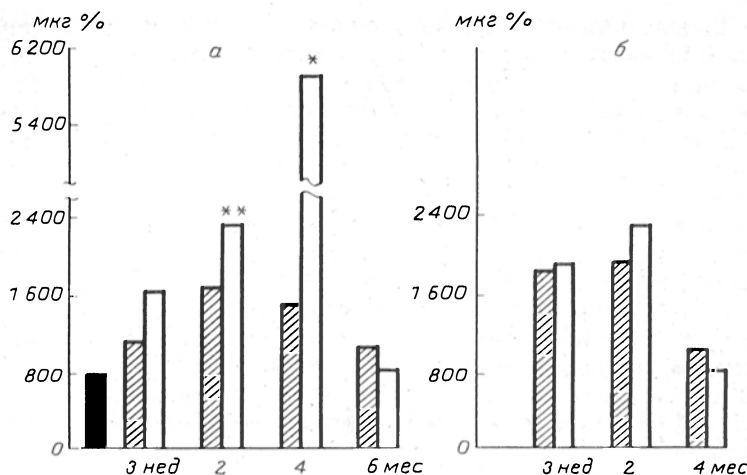


Рис. 2. Активность ГАГ-гидролаз в ткани печени (а) и сыворотке крови (б) в динамике формирования токсического цирроза печени у крыс.

1 — гиалуронидаза (в мкМ на 1 г ткани за 18 ч — а; в мкМ на 1 мл за 18 ч — б); 2 — β -глюкуронидаза (в мкМ на 1 г ткани за 1 мин — а; в мкМ на 1 мл за 1 мин — б); 3 — β -N-ацетилглюкозаминидаза (в мкМ на 1 г ткани за 1 мин — а; в мкМ на 1 мл за 1 мин — б).

Рис. 3. Содержание ГК в ткани печени в динамике формирования токсического цирроза у крыс в 2 экспериментах.

Темный столбик — исходный уровень; заштрихованные столбики — контрольная группа; белые столбики — опытная группа (введение CCl_4). Один крестик — $p \leq 0,03$, два — $p \leq 0,01$ по сравнению с контрольной группой животных.



цирроза и в стадии компенсированного цирроза в наших исследованиях было и значительное снижение уровня ГК в конечной стадии, при декомпенсации. Одной из причин резкого снижения содержания ГАГ в ткани печени в этот период, вероятно, являлось значительное увеличение в печени количества зрелого коллагена, полученное на той же модели формирования CCl_4 -цирроза [3]. Интенсивный синтез и накопление коллагена начинались на последнем этапе стадии компенсированного цирроза, а максимальных значений (более 400% относительно контроля) достигали в стадии сформированного декомпенсированного цирроза. Таким образом, интенсивный синтез основного вещества предшествовал синтезу коллагена, а максимальный уровень ГАГ, вероятно, служил одним из факторов, индуцирующих созревание коллагеновых волокон.

Из литературы известно, что по мере созревания и все более компактного расположения коллагеновых фибрилл и волокон количество хлопьевидного материала и микрофибрилл, состоящих в основном из гликопротеидов и протеогликанов, значительно уменьшается [6, 21]. Уменьшение количества хлопьевидного материала по мере созревания ткани, очевидно, связано с частичным разрушением протеогликанов и включением оставшихся протеогликанов в состав волокон [6, 10, 11, 21].

Кроме того, при анализе динамики содержания ГАГ в ткани печени при воздействии CCl_4 было установлено, что направленность изменений большей частью совпадала с динамикой данного показателя у нормальных животных, хотя уровень ГК при экспериментальном циррозе статистически достоверно был выше (рис. 3). Снижению содержания ГК в конце опыта в норме во всех опытах соответствовало снижение этого показателя в финальной стадии поражения CCl_4 у крыс. Исходя из полученных результатов, можно предположить, что функциональная активность СТ в норме могла влиять на сроки формирования, а возможно, и течение патологического процесса.

Как говорилось выше, изменение содержания ГАГ-гидролаз в ткани печени было волнообразным: повышение в ранние сроки становления и развития хронического поражения печени, снижение в стадии формирования компенсированного цирроза сначала до нормы, а затем и ниже. Максимальное снижение ферментной активности,

по-видимому, можно считать началом стадии декомпенсированного цирроза. Часть животных к этому сроку исследования (4 мес) погибали. Далее, к финальному сроку исследования (стадия декомпенсированного цирроза) часто отмечалось повторное увеличение активности ГАГ-гидролаз в ткани печени. В сыворотке крови для данных ферментов повторного увеличения активности на конечном сроке исследования не наблюдалось. Следует отметить, что хотя синтез гиалуронидазы происходит в паренхиме печени, а двух других ГАГ-гидролаз — в клетках СТ [25, 26], изменение их активности в процессе формирования экспериментального цирроза имело односторонний характер. При этом изменение активности других ферментов паренхимы, отражающих функциональную активность некоторых субклеточных структур гепатоцита (митохондрий, эндоплазматической сети, цитозоля, плазматических мембран), в сыворотке крови и ткани печени в целом имело ту же направленность, что и ферментов — маркеров лизосом — ГАГ-гидролаз [7—9]. Подобная синхронность функциональной активности различных органелл клеток паренхимы и СТ наводит на мысль об общих метаболических изменениях при гепатотоксических воздействиях.

Вероятно, в данном случае мы наблюдали те же закономерности, которые послужили основой для создания теории об общем адаптационном синдроме [5]. В ряде работ Г. Селье доказал, что ответы организма на стрессорное воздействие проявляются довольно стереотипной стандартной реакцией, проходящей в своем развитии три различные фазы: реакцию тревоги, стадию резистентности и стадию истощения. Динамика ГАГ-гидролаз в сыворотке крови четко отражает развитие данного адаптационно-компенсаторного процесса, т. е. повышение активности в начальные сроки эксперимента, определенная стабилизация в середине опыта и снижение активности всех 3 ГАГ-гидролаз в финальной стадии эксперимента. Однако в ткани печени как для данных ферментов — маркеров лизосом, так и для ферментов — маркеров других субклеточных структур клеток печени [7—9] минимальный уровень ферментной активности приходился не на 6-месячный, а на 4-месячный срок исследования, что позволяет сделать вывод о снижении к этому времени защитно-адаптационных функций печени, когда стадия компенсированного цирроза переходит в стадию декомпенсации.

Таким образом, данные наших исследований по динамике ряда ферментов — маркеров субклеточных структур клеток печени, как соединительнотканых, так и паренхимы, при формировании токсического хронического поражения подтверждают концепцию о стереотипности метаболических сдвигов как выражении одного из звеньев адаптационно-компенсаторных процессов. Эта неспецифическая защитно-адаптационная реакция организма, в которую вовлекаются клетки печени, оказывает прямое влияние на формирование диффузного хронического поражения печени, в частности на избыточный рост СТ. В свою очередь избыточный рост СТ влечет за собой ухудшение жизнедеятельности клеток печени и дальнейшее снижение ее защитно-адаптационных функций и соответственно организма в целом.

ЛИТЕРАТУРА

1. Виха И. В., Приваленко М. Н., Хорлин А. Л. // Вопр. мед. химии. — 1973. — № 1. — С. 90—95.
2. Приваленко М. Н., Скобеleva Т. В. // Там же. — 1983. — № 1. — С. 120—123.
3. Прошина Л. Я., Кузнецова Т. Ю. // Рукопись деп. в ВНИИ-ТИ. — № 3209 1982.
4. Свирид Г. М. // Врач. дело. — 1967. — № 10. — С. 101—102.
5. Селье Г. Очерки об адаптационном синдроме. — М., 1960.
6. Серов В. В., Шехтер А. Б. Соединительная ткань. — Л., 1981.
7. Скобеleva Т. В. // Московская конф. молодых ученых «Современные проблемы биохимии и физико-химической биологии»: Материалы. — М., 1984. — Ч. 1. — С. 100—103.
8. Скобеleva Т. В., Приваленко М. Н. // Пат. физиол. — 1986. — № 6. — С. 94—95.
9. Скобеleva Т. В. Особенности метаболизма соединительной ткани и паренхимы печени при экспериментальном циррозе: Автореф. дис. ... канд. биол. наук. — М., 1992.
10. Хилькиш А. М., Шехтер А. Б., Истраков М. П., Лемезов В. М. Коллаген и его применение в медицине. — М., 1976.
11. Шехтер А. Б. // Гистофизиология соединительной ткани. — Новосибирск, 1972. — Т. 1. — С. 51—53.
12. Bollet A. J., Anderson D. V., Simpson W. F. // J. clin. Invest. — 1958. — Vol. 37. — P. 858—863.
13. Bitter T., Muir H. M. // Analyt. Biochem. — 1962. — № 4. — P. 330—334.
14. Bonner W. M., Cantey E. Y. // Clin. chim. Acta. — 1966. — Vol. 13, № 6. — P. 746—752.
15. Dische Z. J. // J. biol. Chem. — 1947. — Vol. 167, № 1. — P. 189—198.
16. Fishman W. H., Kato K., Annstiss C., Green S. // Clin. chim. Acta. — 1967. — Vol. 15. — P. 435—447.
17. Hutterer F. // Biochim. biophys. Acta. — 1966. — Vol. 115. — P. 312—319.
18. Hutterer F. // Collagen Metabolism in the Liver. — New York, 1975. — P. 53—56.
19. Jungalvala F., Robins E. // J. biol. Chem. — 1968. — Vol. 243. — P. 4258—4266.
20. Lowry O., Rosebrough N., Farr A., Randall R. // Ibid. — 1951. — Vol. 193, № 1. — P. 265—275.
21. Morse D., Low F. // Amer. J. Anat. — 1974. — Vol. 140. — P. 237—262.
22. Popper H., Orr W. // Scand. J. Gastroent. — 1970. — Vol. 6. — P. 203—222.
23. Popper H. // Collagen Metabolism in the Liver. — New York, 1975. — P. 1—15.
24. Popper H. // Amer. J. Path. — 1977. — Vol. 87, № 1. — P. 227—229.
25. Pott G., Gerlach U. // Enzyme (Basel). — 1980. — Bd 25, № 6. — S. 394—406.
26. Pott G., Schneider M., Ackermann W., Gerlach U. // Med. Welt. — 1981. — Bd 32, № 3. — S. 75—78.
27. Rubin E., Hutterer F., Popper H. // Amer. J. Path. — 1963. — Vol. 42. — P. 715—724.
28. Weissmann B., Rowin G., Marshall J., Frederice D. // Biochemistry (Wash.). — 1967. — Vol. 6. — P. 207—214.

Поступила 12.06.93

METABOLISM OF THE CONNECTIVE TISSUE MATRIX DURING VARIOUS STEPS OF EXPERIMENTAL CIRRHOSIS DEVELOPMENT IN LIVER TISSUE

T. V. Skobeleva

Central Institute of Gastroenterology, Moscow

A system of GAG-hydrolase was studied in liver tissue and blood plasma during development of CCl₄-produced cirrhosis of liver tissue in series of experiments involving 400 adult rat males. Dissimilar pathways of the matrix formation, related to dynamics of the GAG-hydrolases activity, were detected within various steps of the chronic CCl₄-produced liver tissue impairments in these rats. Alterations in the enzymatic activity were stable and regular in each series of the experiment and correlated with dynamics of the adaptation-compensatory responses.

© Г. А. ГРИБАНОВ, Д. В. ИЛЬЯШЕНКО, 1994

УДК 616.831-008.939.15-091.818

Г. А. Грибанов, Д. В. Ильяшенко

ИЗМЕНЕНИЯ ФОСФОЛИПИДОВ СЕРОГО И БЕЛОГО ВЕЩЕСТВА ГОЛОВНОГО МОЗГА КРЫС В ДИНАМИКЕ ПОСМЕРТНОГО АУТОЛИЗА

Тверской государственный университет

Несмотря на все увеличивающийся интерес к проблемам биохимических изменений в здоровом, больном и умирающем мозгу, многие из них остаются пока не выясненными. Недостаточно разработаны теоретические, а также методологические аспекты аутолиза и смерти мозга. Вместе с тем этот вопрос имеет не только фундаментальное, но и важное прикладное значение в связи с решением ряда проблем танатогенеза, в том числе смерти и пересадки мозга, в судебной медицине [7, 10, 11].

Большой интерес вызывает изучение в аутолизирующемся мозгу превращений эндогенных фосфолипидов, поскольку фосфолипиды центральной нервной системы не только являются важнейшими структурными компонентами нейрональных мембран, но и несут существенную функциональную нагрузку, участвуя в проведении нервного импульса, регуляции активности многих ферментов, механизмах формирования памяти и др. [1, 8, 12, 13]. До сих пор имеется крайне мало сведений о характере аутолитической деградации фосфолипидов мозга. В ряде работ по исследованию липидного состава мозговой ткани на ранних стадиях ишемии, в ходе клинической смерти и при гипоксических состояниях отмечалась значительная лабильность фосфолипидного компонента, что сопровождалось главным образом уменьшением количества суммарных фосфолипидов и изменением их жирнокислотного состава [6, 7, 14, 15, 17, 18].

Следует отметить, что в этих и других работах были использованы различные экспериментальные модели и исследования проводились главным образом на уровне целого мозга или на отдельных его структурах.

В связи с этим, на наш взгляд, представляет определенный теоретический и практический интерес сравнительное изучение изменений фосфолипидов серого и белого вещества головного моз-

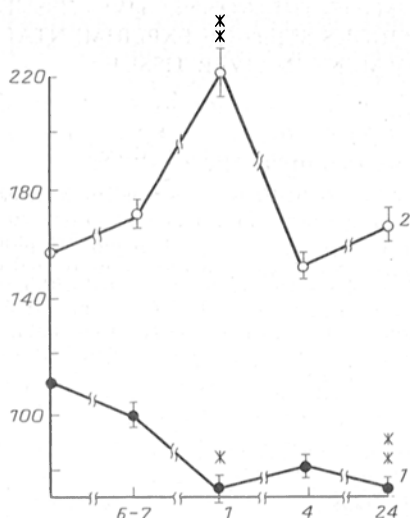


Рис. 1. Изменения содержания общих фосфолипидов в ткани серого (1) и белого (2) вещества головного мозга крыс при аутолизе.

По оси абсцисс — срок инкубации (6—7 мин, 1, 4, 24 ч); по оси ординат — содержание общих фосфолипидов, мг%. Здесь и на рис. 2: одна звездочка — $p < 0,05$, две — $p < 0,01$ относительно контроля (0 ч).

га как в ранние сроки посмертного аутолиза, близкие к периоду клинической смерти (6—7 мин, 1 ч), так и на более поздних этапах (4, 24 ч), когда можно ожидать значительных биохимических изменений в мозговой ткани.

Методика. Эксперименты проводили на безлинейных белых крысах-самцах массой 170—250 г, содержащихся на стандартном рационе. Крыс декапитировали под эфирным рауш-паркозом и быстро (в течение 20—35 с) извлекали мозг.

Остальные процедуры по выделению образцов серого и белого вещества и их последующее исследование в динамике аутолиза проводились, как описано ранее [2]. Выделенные образцы го-

могенизировали в смеси хлороформ — метанол (2:1 по объему). Экстракцию липидов проводили в течение 1,5 ч с последующим отмыванием экстрактов от нелипидных примесей по Фолчу [16]. Количественное определение фосфолипидов, их фракционирование с использованием микротонкослойной хроматографии на силикагеле и последующий количественный анализ отдельных фосфолипидных фракций проводили по методикам, описанным ранее [3, 4]. Результаты экспериментов обрабатывали статистически с использованием критерия Стьюдента [9].

Результаты и обсуждение. На рис. 1 приведены данные по изменению содержания общих фосфолипидов в ткани серого и белого вещества головного мозга крыс в ходе аутолиза. В сером веществе количество общих фосфолипидов достоверно снижалось к 1 ч инкубации до 65% от исходных величин и оставалось практически на том же уровне при последующей инкубации в течение суток. В белом веществе отмечалось возрастание количества суммарных фосфолипидов лишь к 1 ч аутолиза. В остальные сроки существенных изменений не наблюдалось.

Результаты исследований фосфолипидного состава ткани серого и белого вещества головного мозга крыс при аутолизе представлены на рис. 2. Как видно, через 6—7 мин после декапитации в сером веществе количество фосфатидилинозитов (ФХ) снижалось до 67%, количество фосфатидилэтаноламинов (ФЭА) — до 80% от исходных значений, параллельно увеличивалось содержание глицерофосфатов (ГЛФ) и лизофосфолипидов (ЛФЛ). Содержание остальных фракций фосфолипидов практически не изменялось.

Через 1 ч инкубации содержание ФХ продолжало снижаться, составив менее 50% от исходного. Вместе с тем количество ФЭА возросло, превысив на 23% исходные величины. Отмечалась тенденция к увеличению концентрации

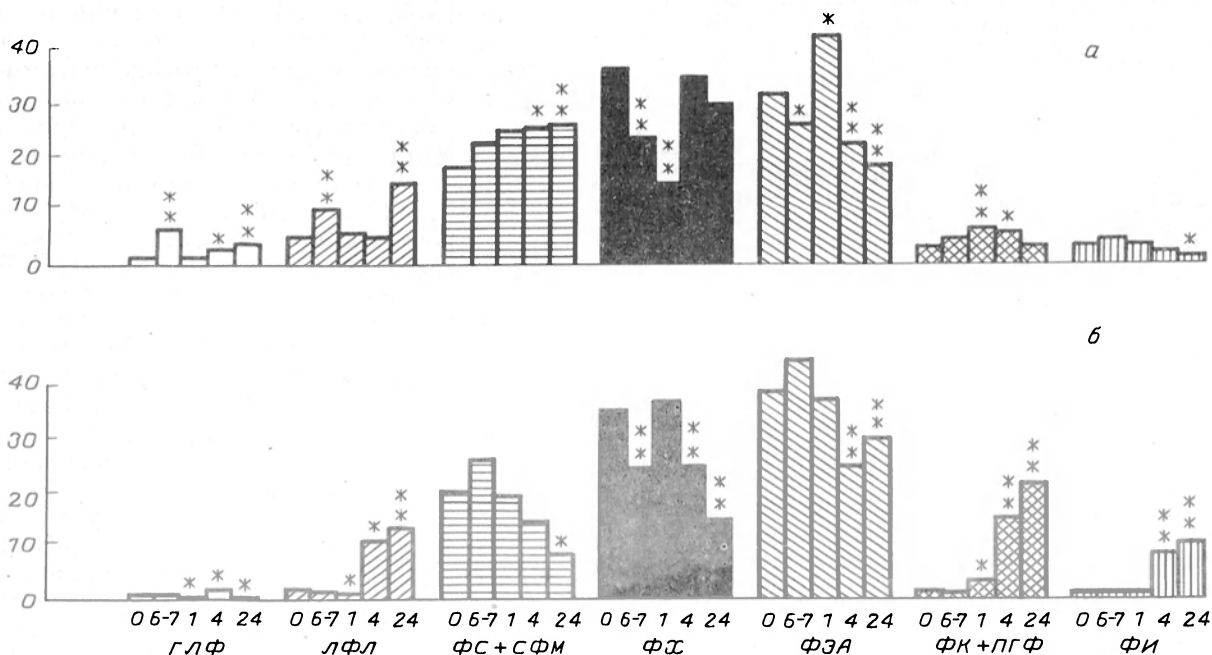


Рис. 2. Изменения соотношения отдельных фракций фосфолипидов в ткани серого (а) и белого (б) вещества головного мозга крыс в динамике аутолиза.

По осям абсцисс — фракции фосфолипидов, сроки инкубации (6—7 мин, 1, 4, 24 ч); по осям ординат — % от суммы фракций.

фосфатидилсеринов (ФС) + сфингомиелинов (СФМ), более чем в 2 раза возросла доля фосфатидных кислот (ФК) + полиглицерофосфатидов (ПГФ), а уровень ГЛФ и ЛФЛ приближался к исходным величинам.

К 4 ч в переживающей ткани мозга относительное содержание ФХ вновь возрастало до исходных значений, тогда как концентрация ФЭА снизилась на 30% от исходной. Содержание ЛФЛ и ФК + ПГФ оставалось практически таким же, как и к 1 ч аутолиза. Доля ГЛФ возрастала более чем в 2 раза относительно исходных значений, также нарастала концентрация ФС + СФМ.

Через 24 ч в аутолизующемся сером веществе головного мозга крыс наблюдалось увеличение содержания ФС + СФМ до 26% суммы фракций. Концентрация ФЭА продолжала резко снижаться, также снижалось более чем в 2 раза содержание фосфатидилинозитов (ФИ). Наряду с этим отмечено значительное возрастание количества продуктов распада фосфолипидов — ГЛФ и ЛФЛ, но в разной степени.

Как показано на рис. 2, б, через 6—7 мин после декантации в ткани белого вещества головного мозга крыс происходило уменьшение до 70% от исходных значений относительного содержания ФХ. К 1 ч инкубации концентрация ФХ, ФЭА и ФС + СФМ была близка к исходным данным, содержание ГЛФ и ЛФЛ достоверно снижалось в 2 раза и более. Через 4 ч аутолиза наблюдалось уменьшение количества ФХ, ФЭА и существенное возрастание концентрации ГЛФ и, особенно, ЛФЛ, ФК + ПГФ и ФИ.

Инкубация белого вещества мозга в течение суток сопровождалась дальнейшим прогрессивным снижением уровня ФХ до 15% и ФС + СФМ до 9% от суммы фракций. Уровень ФЭА был на 25% ниже исходных значений. Количество ГЛФ достоверно снизилось, а доля ЛФЛ, ФК + ПГФ и ФИ продолжала нарастать.

Таким образом, из представленных данных следует, что фосфолипидные профили изученных тканей серого и белого вещества в динамике посмертного аутолиза существенно различаются.

Несмотря на отличия в аутолитических перестройках фракционного состава, сравнительный анализ показывает, что наибольшим изменениям в сером и белом веществе головного мозга подвержены фракции ФХ, ФЭА, ГЛФ, ЛФЛ и частично ФС + СФМ и ФК + ПГФ. Причем большинство из этих фракций (особенно ФХ и ФЭА) меняется в колебательном режиме в зависимости от сроков аутолиза.

В сером веществе мозга в отличие от белого уже в ранние сроки (6—7 мин) наблюдаются значительные изменения в составе фосфолипидного компонента, сопровождающиеся снижением содержания основных фракций (ФХ, ФЭА) и увеличением продуктов распада фосфолипидов (ГЛФ и ЛФЛ), тогда как в белом веществе продукты гидролиза фосфолипидов накапливаются только к более поздним срокам (4 и 24 ч). Это характерно также и для ФК + ПГФ. Очевидно, основной причиной отмеченных изменений является повышение активности соответствующих эндогенных фосфолипаз, причем в сером веществе, как уже было указано, эти процессы протекают наиболее интенсивно на ранних (6—7 мин) и на значитель-

но более поздних (24 ч) сроках аутолиза, а в белом веществе начало активации фосфолипаз происходит только к 4 ч аутолиза.

Возрастание содержания ФХ в мозговой ткани к 4 и 24 ч инкубации в сером и к 1 ч в белом веществе после предшествующего его снижения может быть связано с возможной трансформацией $ФХ \leftrightarrow ФЭА$ [4, 5]. При этом не отмечается накопления продуктов гидролиза (ЛФЛ и ГЛФ). Увеличение содержания ФС + СФМ в сером веществе головного мозга крыс к 4 и 24 ч аутолиза происходит, вероятно, в результате образования реципрокной пары $ФС \leftrightarrow ФЭА$, поскольку количество ФС часто меняется обратно пропорционально содержанию ФЭА [5]. Резкое повышение относительной концентрации ФК + ПГФ, особенно в белом веществе на поздних этапах, сопровождающееся снижением доли ФХ, может объясняться возрастанием активности в динамике аутолиза фосфолипазы D, участие которой в распаде фосфолипидов обнаружено в тканях мозга [12].

Сопоставляя данные по изменению содержания ФК + ПГФ и ГЛФ, можно предположить, что возможными причинами таких превращений служит не только гидролитический распад фосфолипидов, но и другие реакции, в частности ацитилирование ГЛФ с образованием ФК и далее ПГФ. Возрастание содержания ГЛФ может быть также связано с образованием их из 3-фосфоглицеринового альдегида в результате усиления гликолитических процессов в ходе посмертного аутолиза (особенно в первые 6—7 мин) в сером веществе головного мозга крыс [8].

Полученные результаты позволяют предложить следующие схемы возможных взаимопревращений отдельных фосфолипидных компонентов головного мозга крыс в зависимости от сроков посмертного аутолиза (рис. 3).

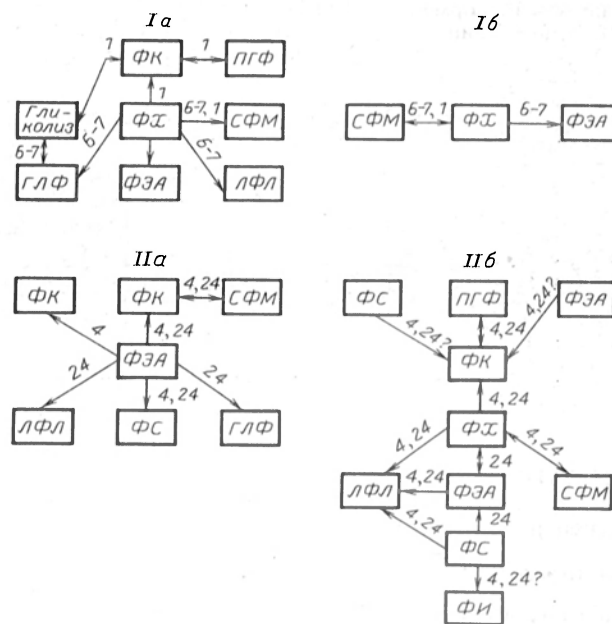


Рис. 3. Возможные метаболические взаимоотношения фосфолипидов серого и белого вещества головного мозга крыс в динамике посмертного аутолиза.

Ia — серое вещество, ранние сроки; Ib — белое вещество, ранние сроки; IIa — серое вещество, поздние сроки; IIb — белое вещество, поздние сроки. На стрелках: 6—7, 1, 4, 24 — срок аутолиза (6—7 мин, 1 ч — ранние сроки, 4, 24 ч — поздние сроки).

Таким образом, анализ представленных экспериментальных данных свидетельствует о том, что фосфолипиды серого и белого вещества головного мозга крыс в ходе посмертного аутолиза претерпевают ряд значительных и неоднотипных изменений, существенно зависящих от сроков аутолиза и основанных не только на гидролазных, но и на трансферазных, а также иных реакциях биотрансформации липидов, включая повторное (рециклическое) использование некоторых молекулярных компонентов (свободные жирные кислоты и др.). При этом в динамике посмертного аутолиза наблюдается не только параллельное участие данных механизмов в деградации эндогенных липидов, но и своего рода переключение одного типа реакции на другой, которое особенно проявляется к 1 и 4 ч аутолиза как в сером, так и белом веществе головного мозга.

Наличие такого сложного комплекса биохимических механизмов, возможно, является одной из причин неоднотипных и разновременных нарушений отдельных структур мозга при его гибели.

ЛИТЕРАТУРА

1. Бурлякова Е. Б. // Исследование памяти.— М., 1990.— С. 145—153.
2. Грибанов Г. А., Ильяшенко Д. В. // Вопр. мед. химии.— 1993.— № 2.— С. 43—45.
3. Грибанов Г. А., Сергеев С. А., Алексеев А. С. // Лаб. дело.— 1976.— № 12.— С. 724—727.
4. Грибанов Г. А. Исследование биохимических превращений липидов биологических структур при аутолизе: Дис. ... д-ра биол. наук.— Калинин, 1986.
5. Грибанов Г. А. // Успехи соврем. биол.— 1979.— Т. 87, № 1.— С. 16—32.
6. Замурцев О. П. // Биол. эксперим. биол.— 1984.— № 11.— С. 523—525.
7. Неговский В. А., Гурвич А. М., Золотокрылина Е. С. Пост-реанимационная болезнь.— М.— 1987.— С. 155—159.
8. Нейрохимия / Под ред. И. И. Прохоровой.— Л., 1979.
9. Плохинский И. А. Алгоритмы биометрии.— М., 1980.
10. Полежаев Л. В., Александрова М. А. Трансплантация тканей мозга в норме и патологии.— М., 1986.
11. Судебно-медицинское исследование трупа / Под ред. А. П. Громова, А. В. Капустина.— М., 1991.— С. 127—144.
12. Таранова И. П. Липиды центральной нервной системы при повреждающих воздействиях.— Л., 1988.
13. Чернявская Л. И., Архипова Г. В., Бурлякова Е. Б. // Нейрохимия.— 1989.— Т. 8, № 2.— С. 249—257.
14. Bazan N. C., Rodriguez L. E. // Advanc. Neurol.— 1980.— Vol. 28.— P. 197—205.
15. Fiskum G. J., Chanderbhan R., Posental R. E. // Free Radic. Biol. Med.— 1990.— № 1.— P. 94.
16. Folch J. J., Lees M. J., Sloane Stanley G. // J. Biol. Chem.— 1957.— Vol. 226.— P. 497—509.
17. Ikeda M., Busto R., Yoshida S. et al. // Brain Res.— 1988.— Vol. 459, № 2.— P. 344—350.
18. Webster G., Thompson R. // Natura.— 1965.— Vol. 498.— P. 74—75.

Поступила 15.07.93

ALTERATIONS IN PHOSPHOLIPIDS OF RAT BRAIN GREY AND WHITE SUBSTANCES DURING POSTMORTAL AUTOLYSIS

G. A. Gribanov, D. V. Ilyashenko

State University, Tver

Content of total phospholipids and their individual fractions, studied in rat brain grey and white substances during postmortal autolysis, was distinctly and dissimilarly altered in these tissues and the rate of alterations depended on time of incubation. Relative content of phosphatidyl serines+ sphingomyelins, phosphatidic acids+ polyglycerophosphatides in grey substance as well as of phosphatidyl inosites, phosphatidic acids+ polyglycerophos-

phatides in white substance were increased, while phosphatidyl inosites in grey substance and phosphatidyl serines+ sphingomyelins in white substance were decreased within later (4 and 24 hrs) periods of autolysis. Content of phosphatidyl cholines, phosphatidyl ethanolamines, glycerophosphates and lysophospholipids was also dissimilarly altered in brain grey and white substances both within early and later periods of autolysis. The schemes of metabolic interrelations between phospholipids of rat brain grey and white substances during autolysis are considered involving hydrolase, transferase and other reactions of lipids biotransformation. This multiple complex of biochemical reactions may be among the reasons responsible for dissimilar and time-dependent deteriorations of individual brain structures after death.

© Е. А. Севрюков, Л. П. Евсеев, 1994

УДК 616.69-008.831:577.152.111]-074

Е. А. Севрюков, Л. П. Евсеев

ВЫДЕЛЕНИЕ ЛАКТАТДЕГИДРОГЕНАЗЫ-С₄ ИЗ СПЕРМАТОЗОИДОВ ЧЕЛОВЕКА

НИИ урологии Минздрава РФ, Москва

Изоферменты лактатдегидрогеназы (ЛДГ₁₋₅) (КФ 1.1.1.27) находятся во всех органах и тканях человека и животных, в то время как изофермент ЛДГ-С₄ специфичен только для семенников и спермы [1, 3]. Непосредственным источником этого фермента являются клетки сперматогенеза и сперматозоиды [12]. ЛДГ₁₋₅ образуют субъединицы А (М) и В (Н), тогда как ЛДГ-С₄ — субъединицу С, которая кодируется отдельным геном [11, 13]. В сперматозоидах и семенниках присутствует не только гомотетрамер С₄, но и гетеротетрамеры, образованные из субъединиц А, В и С (например, у человека: АВС₂, А₂ВС и др. [9]). Некоторые из них имеют близкую с ЛДГ-С₄ электрофоретическую подвижность, что приводит к необходимости применения адекватных методов выделения, в частности иммуносорбции [10]. В описанных в литературе способах выделения ЛДГ-С₄ человека использовались два источника ЛДГ-С₄: сперма (ЛДГ-С₄ составляет 10—15% от общей активности ЛДГ) и семенники (ЛДГ-С₄ составляет 20% от общей активности ЛДГ [10, 4]). В данной статье описывается метод выделения ЛДГ-С₄ [10], в котором в качестве источника фермента использовались сперматозоиды человека. Активность ЛДГ-С₄ в сперматозоидах человека составляет около 50% от общей активности ЛДГ [1, 3, 9].

Методика. Из эритроцитов человека выделяли ЛДГ [8], иммунизировали кроликов и из полученной антисыворотки выделяли фракцию иммуноглобулинов, которые пришивали к трезилактивированной сефарозе 4В [6].

Оксапатсефарозу 4В получали пришиванием оксалата калия к аминогексилсефарозе 4В при помощи водорастворимого карбодиимида [7].

Активность ЛДГ определяли по изменению поглощения NADH при λ 340 нм. Реакционная среда содержала 0,05 М фосфатный буфер, pH 7,5, 0,6 мМ пируват натрия и 0,18 мМ NADH. За единицу активности принимали окисление 1 мкмоль NADH за 1 мин при температуре 25° С. Концентрацию белка определяли по Лоури [5].

Электрофорез в полиакриламидном геле и методика окраски для выявления активности ЛДГ описаны ранее [2].

Результаты и обсуждение. Эякулят человека центрифугировали при 3000 g в течение 15 мин при температуре 4° С, осадок промывали 10 mM фосфатным буфером pH 7,0 и вновь центрифугировали в тех же условиях. К осадку добавляли буфер, ресуспендировали и замораживали при -20° С на 2 ч, затем оттаивали при комнатной температуре. Замораживание—оттаивание (для разрушения сперматозоидов) повторяли еще один раз. Суспензию разрушенных сперматозоидов центрифугировали при 10 000 g и 4° С в течение 60 мин. Из супернатанта собирали белок высаливанием сульфатом аммония в интервале концентраций 30—70% полного насыщения, растворяли его в небольшом объеме 10 mM фосфатного буфера pH 7,0, 1 mM ЭДТА и 1 mM 2-меркаптоэтанола (этот буфер использовали на всех этапах выделения) и диализовали против этого же буфера в течение 48 ч при 4° С. Диализат центрифугировали при 10 000 g и 4° С в течение 30 мин, затем наносили на колонку с иммуносорбентом (0,5 × 8 см) и проводили элюцию исходным буфером до выхода с колонки ЛДГ-С₄; фермент элюировался в 3 объемах колонки без примесей других изоферментов ЛДГ (рис. 1, в). Элюат с ЛДГ-С₄ уравнивали до 0,5 M NaCl и наносили на колонку с оксаматсефарозой (0,5 × 4 см) по одному из колен U-образной трубки; через другое колено одновременно подавали 0,5 mM раствор NADH в исходном буфере с 0,5 M NaCl. Такой способ посад-

ки материала на колонку с оксаматсефарозой являлся необходимым условием прочной посадки ЛДГ-С₄ на сорбенте, а значит, и успешной элюции балластного белка без примеси выделяемого фермента [4]. После нанесения всего материала колонка была отмыта от несвязавшегося белка раствором 0,25 mM NADH, 0,5 M NaCl в исходном буфере. Использование 1 mM лактата в исходном буфере для элюции ЛДГ-С₄ с оксаматсефарозы [10] или только исходного буфера с 0,5 M NaCl [8] не привело к адекватной элюции фермента, так как элюция была продолжительна во времени и при этом использовались большие объемы. Для элюции ЛДГ-С₄ мы применили 0,63 mM пируват в исходном буфере с 0,5 M NaCl, что позволило элюировать фермент 3 объемами колонки.

В описанном способе выделения выход ЛДГ-С₄ составил 45%. Полученный гомогенный препарат фермента (см. рис. 1 и 2) имел удельную активность 163 ед. на 1 мг белка, которая была сравнима с удельными активностями других авторов: 146 ед. на 1 мг белка [4] и 125 ед. на 1 мг белка [10]. Очищенный препарат ЛДГ-С₄ хранился в буферном растворе (10 mM фосфатный буфер pH 7,0) сульфата аммония при концентрации 70% полного насыщения при 4° С в течение 1 года без потери активности.

Очищенный препарат ЛДГ-С₄, возможно, найдет применение при создании радиоиммунологических или иммуноферментных методов с целью

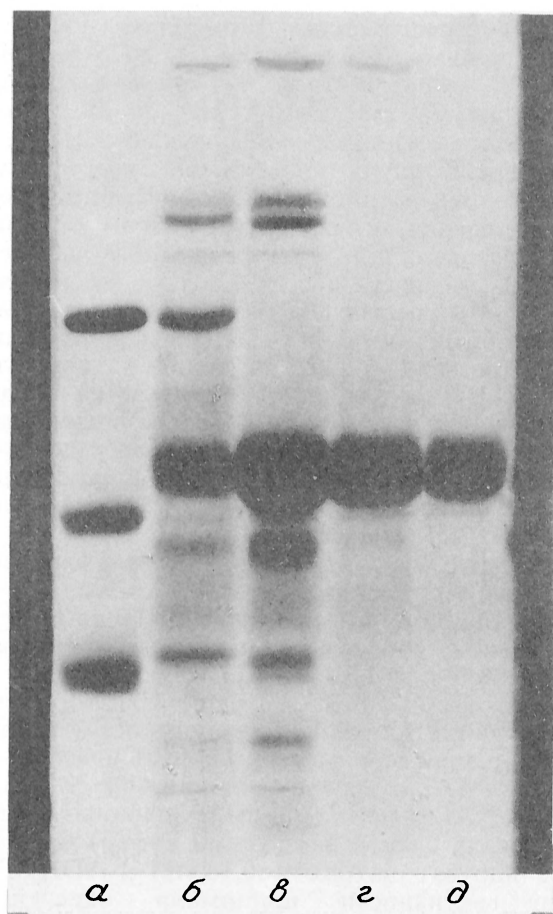


Рис. 1. Выделение ЛДГ-С₄. Электрофорез в 7,5% полиакриламидном геле, выявление активности фермента гистохимическим методом.

а—супернатант разрушенных сперматозоидов; б—после высаливания 30—70% сульфатом аммония; в—после иммуносорбента; г—после оксаматсефарозы.

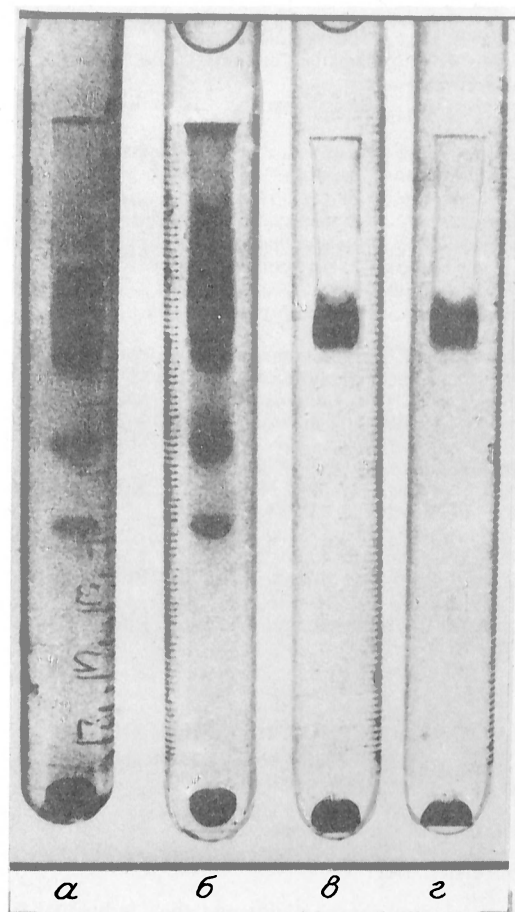


Рис. 2. Выделение ЛДГ-С₄. Электрофорез в 10% полиакриламидном геле с SDS. Окраска кумасси Р-250.

а—стандарты белков (миоглобин, химотрипсиноген, яичный альбумин); б—супернатант разрушенных сперматозоидов; в—после высаливания 30—70% сульфатом аммония; г—после иммуносорбента; д—после оксаматсефарозы.

диагностики некоторых заболеваний мужской репродуктивной системы (иммунологическое бесплодие, обтурационная аспермия и др.).

ЛИТЕРАТУРА

1. Blanco A., Zinkhan W. H. // Science.— 1963.— Vol. 139.— P. 601—602.
2. Dietz A. A., Lubrano J. // Analyt. Biochem.— 1967.— Vol. 20.— P. 246—257.
3. Goldberg E. // Science.— 1963.— Vol. 139.— P. 602—603.
4. Kolk A. J., Kuyk L., Boettcher B. // Biochem. J.— 1978.— Vol. 173.— P. 767—771.
5. Lowry O. H., Rosebrough N. J., Farr A. L., Randall R. J. // J. biol. Chem.— 1951.— Vol. 193.— P. 265—275.
6. Nilsson K., Mosbach K. // Biochem. biophys. Res. Commun.— 1981.— Vol. 102.— P. 449—457.
7. O'Carra P., Barry S., Corcoran E. // FEBS Lett.— 1974.— Vol. 43.— P. 163—168.
8. Prydyar E. M. // Clin. Chem.— 1984.— Vol. 30.— P. 1353—1357.
9. Skude G., von Eyben F. E., Kristiansen P. // Molec. gen. Genet.— 1984.— Vol. 198.— P. 172—174.
10. Tiowicharanont P., Svasti J. // Experientia (Basel).— 1980.— Vol. 36.— P. 37—38.
11. Zinkham W. H., Blanco A., Kupchik L. // Science.— 1963.— Vol. 142.— P. 1303—1304.
12. Zinkham W. H., Blanco A., Clowry J. // Ann. N. Y. Acad. Sci.— 1964.— Vol. 121.— P. 571—578.
13. Zinkham W. H., Blanco A., Kupchik L. // J. exp. Zool.— 1964.— Vol. 156.— P. 137—142.

Поступила 06.07.93

ISOLATION OF LACTATE DEHYDROGENASE-C₄ FROM HUMAN SPERMATOZOA

E. A. Sevryukov, L. P. Evseev

Institute of Urology, Ministry of Public Health of the Russian Federation, Moscow

Lactate dehydrogenase-C₄ (LDH) is a specific cell isoenzyme of spermatogenesis and spermatozoa of man and animals. Due to the lower levels of contaminating proteins, isolation of LDH C₄ from spermatozoa had a lot of advantages. LDH C₄ was isolated as follows: precipitation with ammonium sulfate, separation of LDH C₄ from other LDH isoenzymes using immunosorbents, purification from contaminating proteins of oxamate-Sepharose. Antibodies to LDH₁₋₃ immobilized on tressyl-Sepharose were used as immunosorbents. Elution of LDH C₄ from oxamate-Sepharose by means of lithium lactate appeared inadequate therefore LDH C₄ was eluted using 0.63 mM sodium pyruvate.

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 1994

УДК 616.36-008.939.15-02-07

К. Г. Карагезян, Л. М. Овсепян, К. Г. Адопц, А. Ю. Погосян

ВЛИЯНИЕ УКРИНОЛА НА ЛИПИДНЫЙ МЕТАБОЛИЗМ В ТКАНИ ПЕЧЕНИ

Институт молекулярной биологии АН Республики Армения, Ереван

В настоящее время большое значение придаетс-я изучению воздействия различных токсических веществ на организм. Одним из таких токсических веществ является укринол, который используется в производстве алюминисовой фольги.

В научной литературе практически отсутствует информация относительно токсического воздействия укринола на органы и системы организма.

Особый интерес, на наш взгляд, представляет изучение сдвигов в различных звеньях тканевого метаболизма на уровне клеток и их субцеллюлярных образований.

С этой точки зрения нам представилось интересным изучить изменения отдельных звеньев фосфолипидного обмена под действием укринола, ибо известно, что эффекты подобных соединений в первую очередь происходят на уровне мембран с обильно представленными в них индивидуальными фосфолипидами (ФЛ), являющимися основными структурными элементами данных субклеточных образований и играющими решающую роль в обеспечении статуса нормального функционирования клеток.

В то же время ненасыщенные ацильные остатки жирных кислот ФЛ подвергаются окислению молекулярным кислородом с образованием повышенных концентраций перекисных группировок, приводящих к нарушению гидрофобности взаимодействующих соединений и проявляющих таким образом свое мембранотоксическое действие, а в далеко зашедших случаях — и мембранолитический эффект.

Исходя из вышеизложенного, нами были приняты исследования по изучению качественного и количественного состава ФЛ, а также динамики процессов свободнорадикального окисления жирнокислотных концевых остатков ФЛ в гепатоцитах белых крыс на фоне токсического действия укринола.

Методика. Исследования проводили на 4 группах белых беспородных крыс обоего пола, содержащихся в условиях стандартного пищевого рациона вивария: 1-я — контрольная, 2-я — с введением 150 мг/кг укринола, 3-я — с введением 15 мг/кг укринола и 4-я — с введением 1,5 мг/кг укринола. Используемые концентрации укринола составляли $1/100$, $1/1000$ и $1/10000$ максимальной введенной дозы соответственно. Препарат вводили в течение 1, 3 и 6 мес перорально. Качественный и количественный состав ФЛ печени изучали методом одномерной восходящей хроматографии в тонком слое силикагеля с использованием системы растворителей хлороформ — метанол — аммиак (65:35:5). Пятна ФЛ идентифицировали с помощью соответствующих стандартов («Sigma», США).

Минерализацию липидного фосфора осуществляли в среде серной и азотной кислот с последующим расчетом количества неорганического фосфора (в мкг/мг сухого остатка) [3].

Содержание гидроксиперекисей липидов определяли с помощью цветной реакции с тиоцианатом аммония при максимуме поглощения 480 нм [2]. Об активности перекисного окисления липидов судили по содержанию малонового диальдегида (МДА), образующего с тиобарбитуровой кислотой окрашивание, интенсивность которого регистрировали спектрофотометрически при длине волны 535 нм [1]. Количество гидроксиперекисей и перекисей пересчитывали на 1 мг белка [4].

Результаты и обсуждение. Как показали результаты исследований (табл. 1), под влиянием укринола наблюдаются изменения в количественном составе индивидуальных ФЛ ткани печени,

Влияние различных доз укринола на содержание ФЛ в ткани печени (в мкг фосфора на 1 мг сухой ткани)

Исследованные ФЛ	Контроль	Длительность эксперимента								
		1 мес			3 мес			6 мес		
		150 мг/кг	15 мг/кг	1,5 мг/кг	150 мг/кг	15 мг/кг	1,5 мг/кг	150 мг/кг	15 мг/кг	1,5 мг/кг
Лизофосфатидилхолины	0,180±0,01	0,340±0,01	0,290±0,01	0,260±0,01	0,375±0,004	0,348±0,004	0,294±0,005	0,412±0,01	0,368±0,008	0,305±0,016
<i>p</i>		<0,25	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	=0,25	<0,001	<0,001	<0,001
Сфингомиелины	0,157±0,004	0,196±0,06	0,156±0,007	0,196±0,007	0,179±0,011	0,179±0,011	0,229±0,006	0,238±0,006	0,194±0,007	0,231±0,006
<i>p</i>		<0,01	>0,5	<0,001	<0,001	<0,1	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001
Фосфатидилсерины	0,156±0,002	0,192±0,002	0,164±0,002	0,164±0,004	0,155±0,002	0,155±0,002	0,165±0,001	0,175±0,004	0,161±0,005	0,172±0,007
<i>p</i>		<0,25	<0,5	<0,02	>0,5	>0,5	<0,5	<0,01	>0,5	<0,001
Фосфатидилинозитиды	0,216±0,004	0,272±0,006	0,234±0,002	0,227±0,002	0,278±0,002	0,239±0,007	0,241±0,003	0,299±0,002	0,253±0,001	0,252±0,001
<i>p</i>		<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,05	<0,001
Фосфатидилхолины	0,528±0,002	0,410±0,002	0,417±0,002	0,409±0,002	0,429±0,009	0,433±0,006	0,406±0,09	0,439±0,04	0,441±0,002	0,432±0,001
<i>p</i>		<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,25	<0,001	<0,001	<0,001
Фосфатидилэтанолamines	0,423±0,002	0,500±0,003	0,467±0,006	0,430±0,002	0,522±0,009	0,510±0,002	0,416±0,003	0,536±0,02	0,528±0,02	0,518±0,007
<i>p</i>		<0,001	<0,001	<0,25	<0,001	<0,001	<0,25	<0,001	<0,001	<0,001
Кардиолипиды	0,282±0,003	0,237±0,002	0,240±0,0013	0,230±0,002	0,216±0,003	0,235±0,002	0,244±0,004	0,227±0,001	0,329±0,002	0,319±0,002
<i>p</i>		<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,002	<0,001	<0,001	<0,001

находящиеся в прямой зависимости от дозировки яда и времени его экспозиции. Описанные отклонения оказываются наиболее ярко выраженными на фоне 6-месячного введения укринола в дозе 150 мг на 1 кг массы. Они проявляются в виде увеличения количества сфингомиелинов, фосфатидилсеринов и фосфатидилинозитидов, а также параллельного уменьшения содержания фосфатидилхолинов и кардиолипидов.

Примечательно, что укриноловое отравление сопровождается также заметным увеличением в печени количества лизофосфатидилхолинов, что может быть обусловлено, с одной стороны, активацией фосфолипазы A_2 , а другой — ингибированием реакций фосфатидогенеза, связанным с ослаблением функциональной активности ферментных систем, катализирующих ацилтрансферазные реакции.

Отмеченная выше чувствительность мембран клеток печени к интенсификации процессов перекисеобразования со значительным выходом токсических продуктов липидного перекисления сопровождается деструктивными изменениями мембранных структур со всеми вытекающими из этого последствиями.

Проведенные нами исследования показали (табл. 2 и 3), что низкие концентрации укринола даже при длительном введении лишь в незначительной степени воздействуют на интенсивность реакций перекисеобразования, заметно усиливающуюся под влиянием средних и высоких концентраций яда в течение 3 и 6 мес.

Таблица 2

Влияние введения различных доз укринола на содержание гидроперекисей липидов в ткани печени белых крыс

Длительность эксперимента	Доза укринола, мг/кг	Содержание гидроперекиси A_{490} на 1 мг белка	<i>p</i>
Контроль		0,335±0,002	
1 мес	150	0,542±0,012	<0,001
	15	0,469±0,03	<0,01
	1,5	0,440±0,011	<0,01
3 мес	150	0,676±0,02	<0,001
	15	0,649±0,014	<0,001
	1,5	0,535±0,0013	<0,001
6 мес	150	0,692±0,013	<0,001
	15	0,658±0,009	<0,001
	1,5	0,628±0,01	<0,001

Обобщая полученные нами результаты, можно заключить, что низкие концентрации укринола фактически не вызывают в гепатоцитах каких-либо заметных изменений липидного обмена. В отличие от этого средние и высокие концентрации препарата приводят к достаточно глубоким деструктивным нарушениям в изученных звеньях тканевого метаболизма, что в целом позволяет отнести укринол к категории ядов среднетоксического действия с широким спектром влияния, что, однако, со временем может стать причиной формирования необратимых нарушений обмена веществ.

В целях профилактики и защиты организма от поражающего действия укринола, стимулирования иммунных свойств и поддержания его нормального статуса рекомендуется включать в рацион питания служащих предприятий данного профиля курс антиоксидантной терапии в виде комбинированного применения витаминов Е, С и иммуномодуляторов различной природы.

ЛИТЕРАТУРА

1. Владимиров Н. А., Арчаков А. И. Перекисное окисление липидов в биологических мембранах.— М., 1972.— С. 241—243.
2. Романова Л. А., Стальная И. Д. // Современные методы в биохимии.— М., 1977.— С. 64—66.
3. Bartlett G. R. // J. biol. Chem.— 1959.— Vol. 234.— P. 466—467.
4. Lowry O. H., Rosebrough N. J., Farr A. L., Randall R. J. // Ibid.— 1951.— Vol. 193.— P. 265—275.

Поступила 24.07.93

Таблица 3

Влияние введения различных доз укринола на перекисное окисление липидов в ткани печени белых крыс

Длительность эксперимента	Доза укринола, мг/кг	МДА, мкмоль на 1 г ткани	<i>p</i>
Контроль		0,662±0,01	
1 мес	150	1,039±0,04	<0,001
	15	0,908±0,03	<0,001
	1,5	0,830±0,02	<0,01
3 мес	150	1,297±0,07	<0,001
	15	1,110±0,03	<0,001
	1,5	0,974±0,02	<0,01
6 мес	150	1,950±0,03	<0,001
	15	1,463±0,02	<0,001
	1,5	1,215±0,03	<0,001

Alterations in content of phospholipids as well as dynamics of lipid free-radical oxidation were studied in the hepatocytes of the rats poisoned with various doses of the toxic agent ucrinol within 1,3 and 6 months. Low concentrations of the toxin (1.5 mg/kg) did not cause any detectable alterations of the patterns studied. However, higher concentrations of ucrinol (15-150 mg/kg) produced markedly pronounced destructions which were dose- and time-dependent.

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 1994

УДК 615.849.1.015.251.015.44.07

В. Г. Владимиров, С. Н. Лебедев, А. Е. Антущевич

ВЛИЯНИЕ ЦИСТАМИНА НА ОБРАЗОВАНИЕ И ВОССОЕДИНЕНИЕ ПОСТЛУЧЕВЫХ ОДНОНИТЕВЫХ РАЗРЫВОВ В ДНК

НИИ военной медицины Минздрава РФ, Санкт-Петербург

Механизмы действия радионпротекторов на ДНК — субстрата, определяющего выживание клеток после облучения, остаются чаще далеко не ясными [2]. В частности, не утихают дискуссии о роли радиозащитных препаратов, и прежде всего серосодержащих соединений, в защите важнейших биосубстратов от косвенного воздействия ионизирующих излучений в условиях организма [1]. В настоящей работе изучали кинетику возникновения и ликвидации однонитевых разрывов в ДНК лимфоцитов крови крыс, облученных в разных дозах без защиты и на фоне действия цистамина — одного из наиболее эффективных серосодержащих радионпротекторов. При этом исследовали также некоторые показатели, отражающие состояние перекисного окисления липидов и активность антирадикальной системы в лимфоцитах, имея в виду в качестве конечной цели получение данных, которые позволили бы оценить роль окисляющих радикалов в реализации противолучевого эффекта радионпротектора.

Методика. Опыты были поставлены на белых крысах-самцах разведения питомника «Рапполово» АМН РФ массой тела 180—220 г. Животных облучали γ -квантами ^{137}Cs в дозах 6, 8, 10 и 12 Гр (при мощности дозы 1,9 Гр/мин). Цистамина дигидрохлорид в дозе 60 мг на 1 кг массы тела (в расчете на основание) вводили внутривенно за 20 мин до лучевого воздействия. Кровь, полученную у животных из брюшинной артерии, разводили в 4 раза охлажденным PBS-буфером (0,14 М NaCl, 2,7 мМ KCl, 8,1 мМ K_2HPO_4 , 1,5 мМ KH_2PO_4 ; pH 7,2), содержащим гепарин в конечной концентрации 20 ЕД/мл. Все последующие операции выполняли при 0° С.

Лимфоциты из крови выделяли в градиенте фикола — верографин с плотностью 1,08 г/мл [7], трижды отмывали буфером вышеуказанного состава и разводили до требуемой конечной концентрации.

В опытах *in vitro* действие аскорбината β -меркаптоэтиламина (МЭА) на лимфоциты (напомним, что цистамин в этих условиях не проникает

в клетки) изучали в конечной концентрации $5 \cdot 10^{-3}$ М. После внесения радионпротектора суспензию клеток инкубировали в течение 20 мин при 37° С. Затем лимфоциты облучали (при 0° С), после чего дважды промывали охлажденной средой 199 и вновь инкубировали при 37° С в течение 6 ч в среде с 10% гомологичной крысиной сывороткой при pH 7,2.

Количество однонитевых разрывов в тяжах ДНК определяли по методу [3]. Для этого к 0,2 мл суспензии клеток добавляли 2 мл лизирующего раствора (0,04 М NaOH, 0,01 М NaH_2PO_4 и 0,9 М NaCl; pH 11,7) и помещали пробирку на баню на 10 мин при 20° С в темноте. По окончании лизиса добавляли нейтрализующий раствор (смесь 0,034 М HCl и 0,24 М калий-фосфатного буфера с 8 М мочевиной в соотношении 1:1) до pH 6,8. Для образования одно- и двуспиральных фрагментов ДНК через 10 с после нейтрализации лизат обрабатывали ультразвуковым излучением в течение 15 с с помощью диспергатора УЗДН-1 при частоте 22 кГц и силе тока 0,3 А. ДНК выделяли из клеточных лизатов методом хроматографии на гидроксиланатите. Одно- и двунитевые фрагменты ДНК элюировали с гидроксиланатитом соответственно 0,24 и 0,48 М калий-фосфатным буфером, содержащим 8 М мочевины и 10^{-3} М ЭДТА. ДНК осаждали и тщательно отмывали от солей, гасящих флюоресценцию. О количестве ДНК во фракциях судили по интенсивности флюоресценции комплекса дигидрохлорида 3,5-диаминобензойной кислоты с дезоксирибонуклеотидами [11]. Измерение флюоресценции производили с помощью спектрофлюориметра MPF-4 («Hitachi», Япония) при длинах волн возбуждения и испускания соответственно 410 и 505 нм. Количество разрывов в ДНК рассчитывали по методу [10].

О процессах перекисного окисления в лимфоцитах судили по накоплению одного из конечных продуктов деградации липидов — малонового диальдегида [14]. Активность супероксиддисмутазы (КФ 1.15.1.1) определяли по методу [12].

Результаты обрабатывали по методу Финнера — Стьюдента для малых выборок.

Результаты и обсуждение. Опыты показали, что из лимфоцитов, выделенных из крови необлученных животных, с помощью использованных методов удается получить до 90—95% ДНК, находящейся в двуспиральной форме. Этот уровень и был принят нами за исходный, а количество разрывов в нитях ДНК — за 0. При облучении в использованном диапазоне доз, как это следует из литературы [8], в ДНК образуются в основном однонитевые разрывы.

Анализ результатов экспериментов по исследованию динамики развития структурных изменений в ДНК после облучения крыс показывает, что этот процесс во всех случаях принципиально одноконтинентен и имеет фазовую природу (см. таблицу). Наиболее значительно увеличивалось число разрывов в ДНК, выделенной из лимфоцитов через 5 мин после облучения животных. По прошествии 1 ч пассивность молекул ДНК за счет включения ДНК-репаративных систем [4] практически восстанавливается. Однако к 3 ч структурные изменения возобновляются вновь — это волна так называемых

Условия опыта	Срок после облучения					
	5 мин	1 ч	3 ч	6 ч	12 ч	24 ч
Контроль — облучение 6 Гр	$2,3 \pm 0,16$	$0,1 \pm 0,06$	$1,4 \pm 0,12$	$0,8 \pm 0,14$	$1,6 \pm 0,16$	$1,0 \pm 0,16$
Цистамин + облучение 6 Гр	$1,3 \pm 0,15^*$	$0,1 \pm 0,04$	$0,3 \pm 0,15^*$	$1,4 \pm 0,12$	$0,7 \pm 0,19$	$0,6 \pm 0,15$
Контроль — облучение 8 Гр	$2,7 \pm 0,19$	$0,1 \pm 0,08$	$2,1 \pm 0,13$	$1,0 \pm 0,16$	$1,7 \pm 0,16$	$2,3 \pm 0,19$
Цистамин + облучение 8 Гр	$1,5 \pm 0,16^*$	$0,1 \pm 0,06$	$1,0 \pm 0,18^*$	$1,6 \pm 0,16$	$1,0 \pm 0,12$	$0,7 \pm 0,13^*$
Контроль — облучение 10 Гр	$3,2 \pm 0,31$	$0,3 \pm 0,06$	$2,5 \pm 0,21$	$0,9 \pm 0,12$	$1,0 \pm 0,14$	$2,6 \pm 0,32$
Цистамин + облучение 10 Гр	$1,4 \pm 0,32^*$	$0,2 \pm 0,08$	$1,0 \pm 0,20^*$	$1,1 \pm 0,12$	$1,6 \pm 0,21^*$	$0,8 \pm 0,23^*$
Контроль — облучение 12 Гр	$4,9 \pm 0,34$	$0,2 \pm 0,06$	$3,6 \pm 0,23$	$2,6 \pm 0,16$	$2,3 \pm 0,23$	$3,4 \pm 0,34$
Цистамин + облучение 12 Гр	$1,8 \pm 0,32^*$	$0,1 \pm 0,06$	$2,2 \pm 0,23^*$	$2,2 \pm 0,19$	$1,8 \pm 0,18$	$1,0 \pm 0,32^*$

Примечание. Звездочка — $p < 0,05$ по отношению к облученному контролю; число животных в каждом опыте равно 10.

вторичных или пострепаративных разрывов [5]. В количественном отношении для соответствующей дозы облучения она выражена в меньшей степени, чем в первом случае; 6-часовой срок характеризуется некоторым снижением степени поврежденности ДНК. Однако в этом случае это может свидетельствовать не только о вторичной активации восстановительных процессов, но и о частичной элиминации клеток с деградированными молекулами. Несмотря на недостоверность этих изменений, тем не менее есть основания настаивать на их наличии, поскольку они прослеживаются во всех сериях опытов. К 24 ч степень поврежденности структуры ДНК вновь несколько увеличивается, достигая примерно такого же уровня, который имел место при 3-часовом сроке исследования.

Рассмотрим более подробно результаты, полученные в ранний (5 мин) срок после облучения, поскольку в этом случае разрывы в нитях ДНК являются практически только следствием непосредственного (прямого и косвенного) воздействия ионизирующих излучений на биосубстрат. Как видно из рис. 1, а, прирост первичных повреждений ДНК находится в достаточно строгой прямой зависимости от дозы облучения, и она распространяется вплоть до дозы 10 Гр. При дальнейшем увеличении дозы облучения до 12 Гр происходит резкое возрастание числа разрывов в ДНК, что может рассматриваться как результат включения дополнительных механизмов в формирование повреждений структуры ДНК. По-видимому, в этих условиях в тканях и клетках облученного организма резко возрастает концентрация свободнорадикальных соединений и как следствие этого происходит интенсификация цепных окислительных реакций. В целом зависи-

мость числа разрывов в ДНК от дозы облучения может быть аппроксимирована к экспоненциальному выражению вида:

$$N = e^{0,12D}$$

где N — число разрывов; D — доза облучения.

Как следует из рис. 1, б, в более поздний (24 ч) срок исследования отмечается практически линейная зависимость доза — эффект. В данном случае появление повреждений ДНК уже нельзя связать только с непосредственным воздействием ионизирующих излучений, поскольку к этому времени существенно повышается активность гидролитических ферментов (в частности, нуклеаз), а также развиваются другие постлучевые метаболические сдвиги.

Определенную роль в «допорожении» молекул ДНК могут играть продукты перекисного окисления липидов, которые образуются в клетках и тканях не только в момент, но и вскоре после облучения. Об этом свидетельствуют и данные об активации перекисного окисления, что проявлялось в накоплении в клетках одного из конечных продуктов перекисидации липидов — малонового диальдегида. Через 2 ч после лучевого воздействия количество этого метаболита увеличилось почти в 3 раза, а к 6 ч — более чем в 4,5 раза по сравнению с нормой (рис. 2). И только к концу 1-х суток интенсивность перекисного окисления липидов снижалась. Одновременно в лимфоцитах повышалась активность супероксиддисмутазы — фермента, являющегося одним из элементов антиоксидантной защиты клеток.

В последующем изучили радиозащитный эффект цистамина, обращая особое внимание на те сроки, в которые были получены наиболее значи-

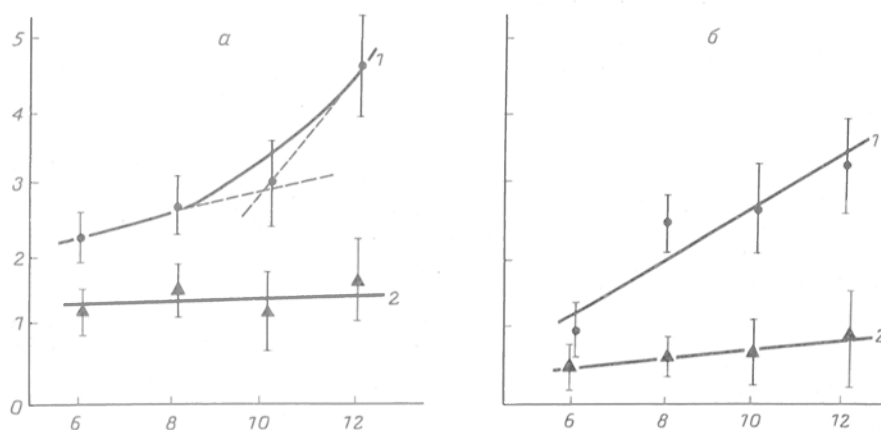


Рис. 1. Влияние цистамина на количество одонитевых разрывов в ДНК, выделенной из лимфоцитов крови через 5 мин (а) и 24 ч (б) после облучения крыс в различных дозах.

Здесь и на рис. 2 и 3: 1 — контроль (облучение), 2 — цистамин + облучение. По осям абсцисс — доза облучения, Гр; по осям ординат — число разрывов на $2,3 \cdot 10^9$ Д ДНК.

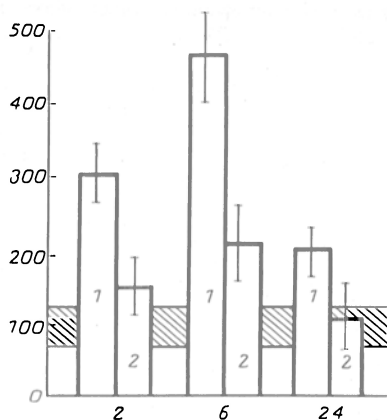


Рис. 2. Влияние цистамина на содержание малонового диальдегида в лимфоцитах крови крыс, облученных в дозе 8 Гр.

По оси абсцисс — срок после облучения, ч; по оси ординат — содержание малонового диальдегида, %.

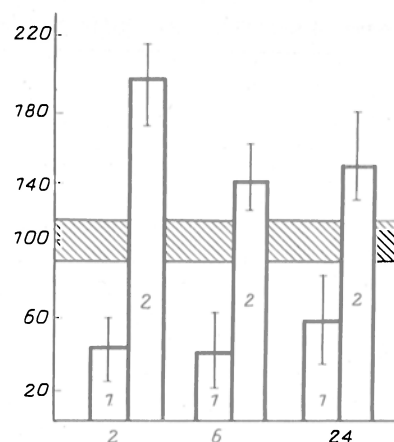


Рис. 3. Влияние цистамина на активность супероксиддисмутазы в лимфоцитах крови крыс, облученных в дозе 8 Гр.

По оси абсцисс — срок после облучения, ч; по оси ординат — активность супероксиддисмутазы, %.

тельные повреждения структуры макромолекул ДНК. Как показали опыты, через 5 мин после воздействия ионизирующих излучений в дозах от 6 до 12 Гр в ДНК, выделенной из лимфоцитов защищенных животных, возникает в среднем на 40—60% меньше односторонних разрывов по сравнению с облученным контролем. Неожиданным оказалось то обстоятельство, что по мере увеличения дозы облучения эффект защиты не уменьшался, а, наоборот, возрастал. Такого рода результаты, по-видимому, являются не случайными, так как находят свое подтверждение и в исследованиях других авторов. В частности, в работе [9] отмечено (в известных дозовых пределах облучения) увеличение степени защиты от применения МЭА по мере возрастания дозы воздействия (эффект оценивался по количеству разрывов ДНК в эндотелиальных клетках капилляров головного мозга крыс). Нам представляется, что подобного рода результаты следует связывать прежде всего с выраженными у серосодержащих радиопротекторов антиоксидантными свойствами [6]. Антиоксидантной мощности цистамина, вероятно, вполне достаточно, чтобы инактивировать основную массу образующихся при облучении в биосреде окисляющих радикалов и предотвратить тем самым их повреждающий эффект. А поскольку по мере роста дозы облучения поражающая роль окисляющих радикалов, по-видимому, возрастает, то становится понятным и соответствующее увеличение противолучевого эффекта. Эта точка зрения подтверждается экспериментальными данными, показывающими, что профилактическое введение цистамина животным сопровождается снижением содержания малонового диальдегида. Антиоксидантный эффект цистамина обусловлен, кроме того, и активацией супероксиддисмутазы (рис. 3).

Однако подобное объяснение механизма защиты не приложимо к радиозащитному эффекту, наблюдаемому спустя 24 ч, несмотря на все его сходство с вышеописанным с точки зрения кинетики и зависимости от дозы. Следует помнить, что через 1 сут в периферической крови у защищенных животных происходит существенная смена лимфоцитов и экспериментатор имеет дело практически уже с иной популяцией клеток, нежели в ранние сроки исследования. Причем этому

процессу способствует не только постлучевая гибель клеточных элементов, но и стрессовый эффект самого радиопротектора. Известно, например, что цистамин, вводимый в защитных дозах, вызывает выброс клеток крови из депо. Возможна и другая версия, она связана со снижением в крови у защищенных животных активности нуклеаз, которые, как известно, способствуют реализации повреждающего действия ионизирующих излучений в структурах ДНК. Нельзя также не обратить внимания и на 6-часовой срок исследования, поскольку в этом случае, как правило, не обнаруживали защиты, хотя полученная разница в средних величинах между контрольными и опытными сериями и недостоверна. Думается, что это может быть связано с отсроченностью эффекта защиты и действием цистамина на этот срок, может быть, правильнее сопоставлять с соответствующим 3-часовым контролем.

Чтобы уточнить некоторые положения выдвинутых гипотез, были поставлены эксперименты с облучением взвеси лимфоцитов *in vitro*. Эти опыты показали, что степень поврежденности молекул ДНК, полученной через 5 мин (рис. 4), выражена в значительно большей степени, чем в ДНК, выделенной из клеток, облученных в условиях *in vitro* в такой же дозе (12 Гр), и исследованной в соответствующий срок. Одним из объяснений выявленных различий может служить

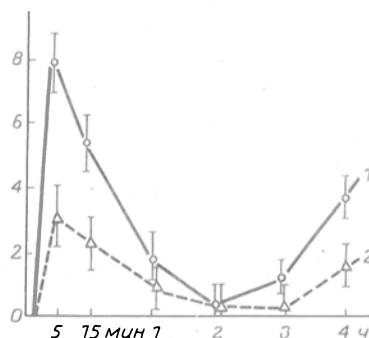


Рис. 4. Влияние МЭА ($5 \cdot 10^{-3}$ М) на количество односторонних разрывов в ДНК, выделенной из облученных *in vitro* в дозе 12 Гр лимфоцитов крови.

1 — контроль (облучение); 2 — МЭА + облучение. По оси абсцисс — срок постлучевой инкубации; по оси ординат — число разрывов на $2,3 \cdot 10^9$ ДНК.

наличие процессов репарации, которые в условиях организма протекают достаточно энергично уже в момент облучения. При облучении же суспензии клеток *in vitro* (а оно проводилось при 0° С) процессы воссоединения разрывов ДНК будут, естественно [13], замедлены. Другим отличием являлось то, что время восстановления первичных разрывов наступает не к концу 1 ч, а через 2 ч. С запозданием развивается и волна вторичных разрывов. При применении радиопротектора была получена принципиально такая же картина, что и в экспериментах *in vitro*. Через 5 мин в суспензии лимфоцитов, предварительно проинкубированных с МЭА, регистрируется отчетливое положительное влияние радиопротектора. В анализируемых образцах формируется в среднем на 60% меньше разрывов, чем в облученном контроле. Выраженность волны вторичных разрывов в этих пробах проявилась слабее.

Итак, в данной постановке опыта, когда были исключены опосредованные органотропные эффекты (например, такие, как изменение состава клеточной популяции и влияние защитных факторов стрессового характера), подтверждается наличие у цистамина и его аналога — МЭА противолучевого действия как от непосредственного воздействия ионизирующих излучений, так и от повреждающего эффекта окисляющих радикалов на биосубстрат.

Таким образом, все вышеизложенное свидетельствует в пользу предположения, согласно которому ДНК является одним из важнейших субстратов, участвующих в развитии повреждающего эффекта ионизирующих излучений. При этом процесс формирования нарушений структуры ДНК носит фазовый характер. Кроме того, полученные экспериментальные данные позволяют утверждать, что механизм защитного действия цистамина реализуется на молекулярном уровне и обеспечивает защиту ДНК как от прямого, так и от опосредованного действия радиации. В настоящее время еще трудно говорить о доли участия каждого из этих механизмов в реализации противолучевого эффекта, однако роль антиоксидантных свойств серосодержащих радиопротекторов в защите, как нам представляется, несомненна.

ЛИТЕРАТУРА

1. Владимиров В. Г., Джаракян Т. К. Радиозащитные эффекты у животных и человека. — М., 1982.
2. Владимиров В. Г., Красильников И. И., Арапов О. В. Радиопротекторы: структура и функция. — Киев, 1989.
3. Газиев А. И., Малахов В. А., Смирнова Ю. Д., Комар В. Е. Методика оценки поврежденности и репарации ДНК в клетках животных и человека: Метод. рекомендации. — Пущино, 1981.
4. Кожановская Я. К., Фоменко А. А., Сирота Н. П., Газиев А. И. // Радиобиология. — 1989. — Т. 29, № 1. — С. 8—12.
5. Рябченко Н. И. Радиация и ДНК. — М., 1979.
6. Свистунович Д. А., Гудцова К. В. // Радиобиология. — 1989. — Т. 29, № 1. — С. 3—7.
7. Хейфец Х. Б., Абакин В. А. // Лаб. дело. — 1973. — № 10. — С. 579—581.
8. Bradley M. O., Kohn K. W. // Nucl. Acids Res. — 1979. — Vol. 7, № 3. — P. 793—804.
9. Cerda H., Rosander K. // Radiat. Res. — 1983. — Vol. 95, № 2. — P. 317—326.
10. Kanter P. M., Schwartz H. S. // Analyt. Biochem. — 1979. — Vol. 97, № 1. — P. 77—84.
11. Kissane I. M., Robins E. // J. biol. Chem. — 1958. — Vol. 233, № 1. — P. 184—188.

12. Misra H. P., Fridovich K. // Ibid. — 1972. — Vol. 247. — P. 3170—3174.
13. Ormerod M. G., Stevens U. // Biochim. biophys. Acta. — 1971. — Vol. 232, № 1. — P. 72—82.
14. Ushiyama M., Michara M. // Analyt. Biochem. — 1978. — Vol. 86, № 1. — P. 271—273.

Поступила 07.10.93

EFFECT OF CYSTAMINE ON DEVELOPMENT AND REPAIR OF THE IRRADIATION—PRODUCED BREAKS IN SINGLE—STRAND DNA

V. G. Vladimirov, S. N. Lebedev, A. E. Antushevich

Institute of Military Medicine, St. Petersburg

Content of breaks in single-strand DNA, activity of superoxide dismutase and concentration of malonic dialdehyde were studied in blood lymphocytes of irradiation-impaired rats after treatment with cystamine. Cystamine decreased the effects of irradiation as showed all the patterns studied. The protective action exhibited by the drug in radiation shielding of DNA involved both direct and indirect effects.

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 1994

УДК 616.36-018.1-008.939.15-39]-092.9-07

К. Т. Алматов, Д. Т. Мирталипов, Х. Н. Мусаев, О. Т. Джамалова, Д. А. Азимов

ВЛИЯНИЕ ПЕРЕКИСНОГО ОКИСЛЕНИЯ ЛИПИДОВ НА ЛИПИДНЫЙ И ФОСФОЛИПИДНЫЙ СОСТАВ МЕМБРАН МИТОХОНДРИЙ ПРИ ТЕПЛОВОЙ ИНКУБАЦИИ

Институт зоологии АН Республики Узбекистан, Ташкент

Свободнорадикальное окисление составляет необходимое звено таких жизненно важных процессов, как перенос электронов многими флавиновыми ферментами, окислительное фосфорилирование в митохондриях. Перекисное окисление липидов (ПОЛ), постоянно протекая в клеточных и субклеточных мембранах, меняет их липидный состав, оказывая тем самым влияние на активность липидзависимых мембранно-связанных ферментов.

В предыдущей работе нами было показано, что инкубация митохондрий печени крысы при 37° С сопровождается изменениями в их фосфолипидном составе; уменьшением содержания основных фосфолипидов — фосфатидилхолина (ФХ), фосфатидилэтаноламина (ФЭА), кардиолипина (КЛ) и их лизопродуктов, а также увеличением содержания фосфатидной кислоты (ФК) и лизофосфатидной кислоты (ЛФК) [2, 11]. Важную роль в этих процессах играют митохондриальные фосфолипазы А₂, D, C [1, 2, 5, 10], лизофосфолипазы А₁, D [2, 5] и триглицеридлипаза [2, 9]. Эти ферменты, локализуясь в обеих мембранах митохондрий, участвуют в регуляции жирнокислотного и фосфолипидного состава митохондрий и контролируют скорость обновления митохондриальных липидов. В последнее время внимание исследователей сосредоточено на выяснении связи между эффективностью гидролиза липидов мембранными липолитическими ферментами и интенсивностью ПОЛ. Полученные данные свидетельствуют об активирующем действии ПОЛ на фосфолипазу А [4, 7, 14], но имеются и проти-

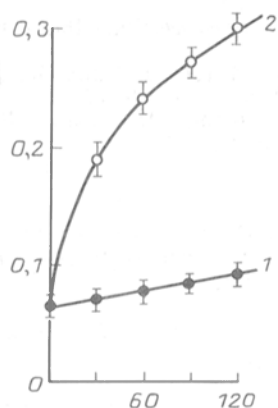


Рис. 1. Влияние индукторов ПОЛ на накопление МДА в митохондриях печени при 37° С.

По оси абсцисс — время (в мин); по оси ординат — оптическая плотность усл. ед. (при 532 им). 1 — контроль, 2 — в присутствии 20 мкМ FeSO_4 и 20 мкМ аскорбата. Среда инкубации: KCl 150 мМ, NaH_2PO_4 1 мМ, трис-HCl-буфер 5 мМ, pH 7,4. Содержание белка 1,6 мг/мл.

воположные сведения [3]. В связи с этим изучение роли ПОЛ в гидролизе отдельных фракций липидов и фосфолипидов митохондрий эндогенными липолитическими ферментами представляет самостоятельный интерес.

Методика. Митохондрии выделяли из печени крыс-самцов массой 200—250 г методом дифференциального центрифугирования [15] в среде, содержащей 250 мМ сахарозы, 5 мМ трис-HCl-буфер, pH 7,4 (2—4° С). Липиды из митохондрий экстрагировали по методу [8] с последующим хроматографированием и количественным анализом материала по [6]. Интенсивность ПОЛ митохондрий оценивали по накоплению малонового диальдегида (МДА) [12]. Концентрацию белка митохондрий определяли по Лоури [14].

Результаты и обсуждение. На рис. 1 представлены данные о накоплении МДА в митохондриях печени в присутствии и отсутствии индукторов ПОЛ. Аутоокисление липидов митохондрий в процессе инкубации при 37° С отличалось от их переокисления, индуцированного прооксидантами, не только по количеству МДА, но и по кинетике накопления этого продукта. Видно, что в первом случае накопление продуктов ПОЛ в митохондриях происходило в течение 120 мин инкубации с относительно постоянной скоростью, тогда как при индуцированном ПОЛ наиболее интенсивное накопление МДА наблюдалось в течение 50—60 мин инкубации.

На рис. 2 представлены данные регистрации липидного состава митохондрий печени, инкубированных в различных условиях. Инкубация митохондрий в течение 120 мин при 37° С (в отсутствие индукторов ПОЛ) приводила к уменьшению содержания суммарных фракций фосфолипидов на 16% (рис. 2, а, кривая 1) и повышению концентрации свободных жирных кислот (СЖК) на 420% (рис. 2, б, кривая 1) от исходного уровня. Это согласуется с данными литературы о наличии в митохондриях фосфолипазы Λ_2 [2, 10]. Аналогичная картина была выявлена для митохондрий, инкубированных в тех же условиях с прооксидантами (см. рис. 2, а, б, кривые 2). Это позволяет предположить, что в условиях опыта деградация митохондриальных фосфолипидов осуществляется в основном по пути их гидролиза фосфолипазой Λ_2 .

Что касается других фракций анализируемых липидов, следует отметить, что в ходе инкубации в отсутствие прооксиданта происходит увеличение содержания моноглицеридов в 3 раза (рис. 2, г, кривая 1) и снижение содержания

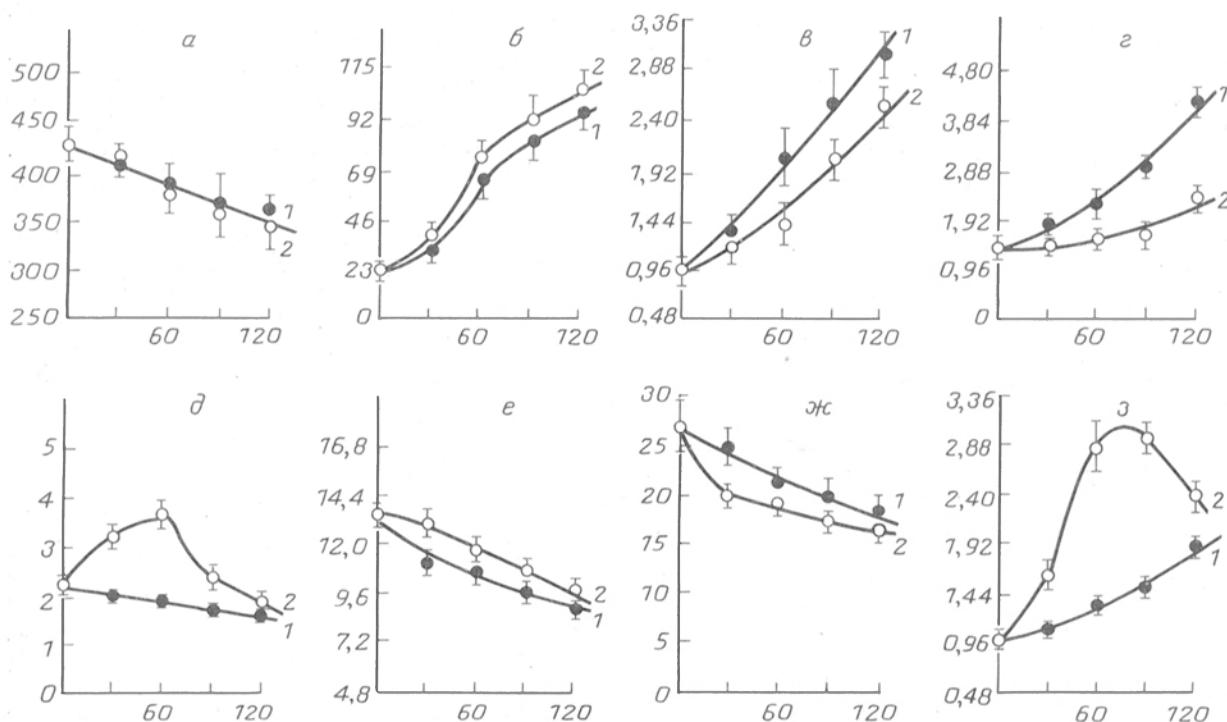


Рис. 2. Влияние индукторов ПОЛ на липидный состав мембран митохондрий при 37° С.

Здесь и на рис. 3, 4 по оси абсцисс — время инкубации (в мин); по оси ординат — содержание исследуемых веществ (в мкг на 1 мг белка). а — суммарная фракция фосфолипидов, б — СЖК, в — СЖК и их метиловые эфиры, г — моноглицериды, д — диглицериды, е — триглицериды, ж — холестерин, з — эфиры холестерина. 1 — контроль, 2 — в присутствии FeSO_4 (20 мкМ) и аскорбата (20 мкМ).

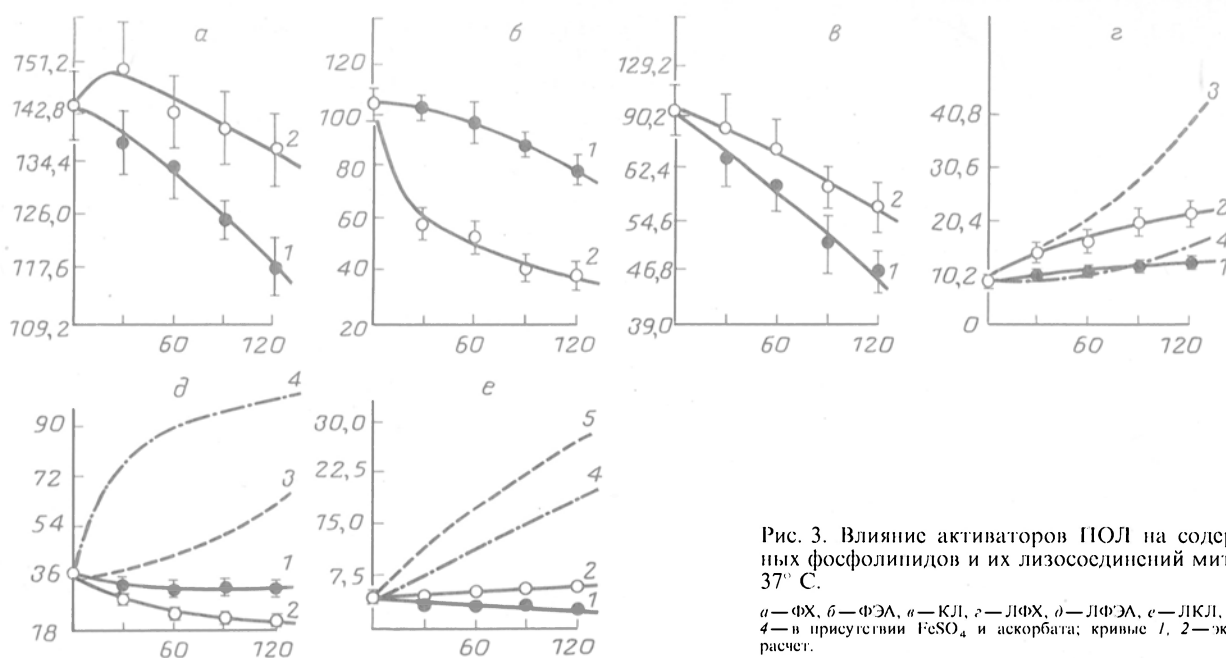


Рис. 3. Влияние активаторов ПОЛ на содержание основных фосфолипидов и их лизосоединений митохондрий при 37° С.

a—ФХ, *б*—ФЭА, *в*—КЛ, *г*—ЛФХ, *д*—ЛФЭА, *е*—ЛКЛ, 1, 3—контроль, 2, 4—в присутствии FeSO₄ и аскорбата; кривые 1, 2—эксперимент, 3, 4—расчет.

диглицеридов и триглицеридов в 1,31 и 1,36 раза соответственно от исходного уровня (рис. 2, *д, е*, кривые 1). Иная картина была выявлена для митохондрий, инкубированных прооксидантами: замедление накопления моноглицеридов (см. рис. 2, *г*, кривая 2) и снижение гидролиза триглицеридов (см. рис. 2, *е*, кривая 2). При этом в начале инкубации содержание диглицеридов заметно растет, а затем в ходе инкубации постепенно уменьшается (см. рис. 2, *д*, кривая 2). При низком уровне ПОЛ в ходе инкубации в митохондриях происходит уменьшение содержания холестерина и увеличение концентрации эфиров холестерина (рис. 2, *ж, з*, кривые 1), а прооксидант усугубляет эти изменения (см. рис. 2, *ж, з*, кривые 2). В ходе инкубации в отсутствие индукторов ПОЛ происходит накопление метиловых эфиров жирных кислот (в 2,33 раза в течение 120 мин), а прооксидант незначительно подавляет этот процесс (рис. 2, *в*).

На рис. 3 приведены результаты исследования динамики содержания отдельных фракций основных фосфолипидов и их лизосоединений в двух вариантах эксперимента. При низком уровне ПОЛ в течение 120 мин инкубации содержание ФХ, ФЭА и КЛ снижалось в 1,18, 1,25 и 1,33 раза соответственно от исходного уровня (рис. 3, *а, б, в*, кривые 1). Иная картина была выявлена для митохондрий, инкубированных с прооксидантами. При этом содержание ФХ в начале инкубации незначительно повышалось, а затем возвращалось к исходному уровню. Незначительное снижение содержания ФХ наблюдалось только в конце инкубации (см. рис. 3, *а*, кривая 2). Прооксидант заметно тормозил гидролиз КЛ (см. рис. 3, *в*, кривая 2), но значительно ускорял гидролиз ФЭА (см. рис. 3, *б*, кривая 2). Так, если в отсутствие прооксиданта в течение 120 мин при 37° С содержание КЛ и ФЭА уменьшалось в 1,33 и 1,25 раза, то в его присутствии — в 1,19 и 1,64 раза соответственно от исходного уровня.

В результате гидролиза митохондриальных фосфолипидов эндогенной фосфолипазой парал-

лельно со снижением их содержания должно происходить эквивалентное накопление соответствующих лизофосфолипидов. Так, судя по убыли основных фосфолипидов в отсутствие индукторов ПОЛ, можно было ожидать, что содержание лизофосфатидилхолина (ЛФХ) должно было возрасти в 4,8 раза, лизофосфатидилэтаноламина (ЛФЭА) — в 1,6 раза и лизокардиолина (ЛКЛ) — в 6 раз (рис. 3, *г, д, е*, кривые 3). Однако экспериментальные данные не согласуются с этими расчетами. При этом уровень ЛФХ увеличивается всего в 1,5 раза от исходного, а содержание ЛФЭА и ЛКЛ уменьшается (см. рис. 3, *г, д, е*, кривые 1). Это несоответствие между убылью основных фосфолипидов и их лизосоединений связано с повышением активности эндогенной лизофосфолипазы А₁ мембран митохондрий [2, 5]. Добавление к суспензии митохондрий прооксиданта ускоряло снижение содержания ЛФЭА и тормозило гидролиз других фракций лизоформ фосфолипидов (см. рис. 3, *г, д, е*, сравните кривые 1, 3 и 2, 4). Следовательно, уровень ПОЛ в митохондриях регулирует активность их эндогенной фосфолипазы А₂ и лизофосфолипазы А₁. Прооксиданты значительно повышают активность митохондриальной фосфолипазы А₂ и лизофосфолипазы А₁ в отношении ФЭА и ЛФЭА, но заметно ингибируют в отношении других фракций основных фосфолипидов и их лизосоединений.

В ходе инкубации при 37° С в отсутствие индукторов ПОЛ происходит интенсификация накопления фосфатидилсерина (ФС) — в 1,39 раза и сфингомиелина (СФМ) — в 1,64 раза, а прооксидант ускоряет синтез данных фосфолипидов в 1,83 и 1,97 раза соответственно от исходного уровня (рис. 4, *а, д*, сравните кривые 1 и 2). Тепловая инкубация приводит к росту содержания ФК и ЛФК в митохондриальных мембранах (рис. 4, *в, г*, кривые 1), этот рост заметно стимулируется прооксидантами (см. рис. 4, *в, г*, кривые 2), особенно на начальном этапе инкубации митохондрий. Так, если в условиях аутоокисления в течение 120 мин инкубации митохондрии уровень ФК и ЛФК рас-

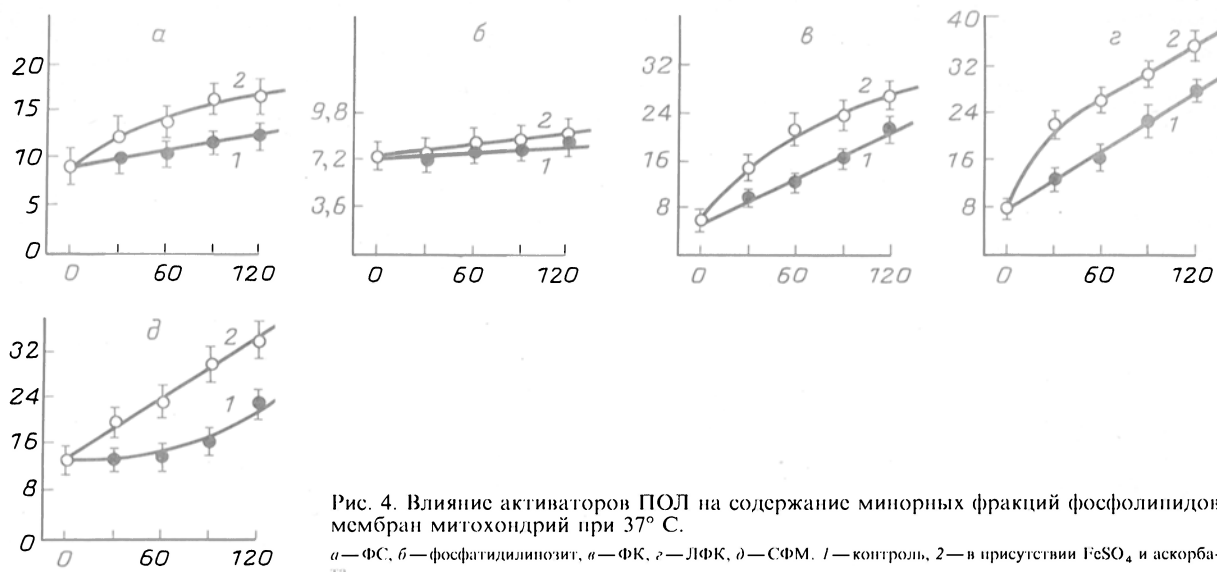


Рис. 4. Влияние активаторов ПОЛ на содержание минорных фракций фосфолипидов мембран митохондрий при 37° С.

а—ФС, б—фосфатидилинозит, в—ФК, г—ЛФК, д—СФМ. 1—контроль, 2—в присутствии FeSO_4 и аскорбата.

тет в 3,9 и 3,7 раза, то в присутствии индукторов ПОЛ—в 4,5 и 4,7 раза от исходного. Можно заключить, что прооксиданты активируют гидролитическую активность митохондриальной фосфолипазы D.

Полученные результаты дают основание считать, что, во-первых, ПОЛ усиливает активность митохондриальной фосфолипазы A_2 только лишь в отношении ФЭА, во-вторых, этот фосфолипид гидролизует фосфолипазой D. В результате содержание ФЭА уменьшается, а уровень СЖК и ФК значительно растет. В-третьих, образующиеся под действием фосфолипазы A_2 ЛФЭА также гидролизуются лизофосфолипазой A_1 и фосфолипазой D, о чем свидетельствуют уменьшение фракций ЛФЭА и повышение ЛФК. Образование ЛФК может происходить также под действием фосфолипазы A_2 .

Возникает вопрос о причинах ускорения накопления ФС, СФМ, моноглицеридов, эфиров холестерина, метиловых эфиров жирных кислот и уменьшения накопления ди- и триглицеридов, холестерина, а также торможения гидролиза ФХ, КЛ и их лизосоединений в процессе инкубации митохондрий при 37° С с индукторами ПОЛ. Наблюдаемые изменения, на наш взгляд, являются прямым следствием энзиматических реакций метилирования и декарбоксилирования, протекающих в митохондриях печени [2]. Можно допустить, что при усилении ПОЛ в митохондриях печени замедляется превращение ФС и ФЭА (реакция декарбоксилирования) и ускоряется превращение ФЭА в ФХ (реакция метилирования). Уточнение механизма этих превращений в мембране митохондрий требует специальных исследований. Таким образом, ПОЛ в мембране митохондрий приводит к значительным изменениям липидного и фосфолипидного состава: ускорению гидролиза ФЭА и ЛФЭА, повышению синтеза ФС, ФК, ЛФК, СФМ, диглицеридов и эфиров холестерина, торможению гидролиза ФХ, КЛ и их лизосоединений.

ЛИТЕРАТУРА

1. Алматов К. Т., Гирбатая О. П., Ходжаева Н. И. и др. // Укр. биохим. журн.—1987.—Т. 59, № 4.—С. 93—96.

2. Алматов К. Т. Механизмы развития повреждений мембран митохондрий и роль липолитической системы: Дис. ... д-ра биол. наук.—Ташкент, 1990.
3. Балева С. С., Касонова Т. А., Русанов Э. М., Казан В. Е. // Бюл. экспер. биол.—1985.—№ 2.—С. 129—136.
4. Брустовский Н. П., Егорова М. В., Гогвадзе Б. Г. // Биол. мембраны.—1991.—Т. 8, № 9.—С. 907—911.
5. Гирбатая О. П., Мурталипов Д. Т., Алматов К. Т., Рахимов М. М. // Укр. биохим. журн.—1988.—Т. 60, № 9.—С. 23—28.
6. Каргаполов А. В. // Биохимия.—1981.—Т. 46, № 3.—С. 691—697.
7. Марзоев А., Мурталипов Д. Т., Алматов К. Т. // Бюл. экспер. биол.—1987.—№ 1.—С. 35—38.
8. Кейте М. Техника липидологии.—М., 1975.—С. 74—77.
9. Мурталипов Д. Т. Фосфолипиды мембран митохондрий печени при аллоксановом диабете и роль эндогенных липолитических ферментов в их модификации: Дис. ... канд. биол. наук.—Ташкент, 1990.
10. Рахимов М. М., Гирбатая О. П., Зиятдинова Р. и др. // Биохимия.—1988.—Т. 53, № 9.—С. 1486—1495.
11. Рахимов М. М., Алматов К. Т., Касимова Г. М., Гирбатая О. П. // Там же.—1989.—Т. 54, № 6.—С. 948—955.
12. Стальная И. Д., Иришвили Т. Г. // Современные методы в биохимии/Под ред. В. И. Ореховича.—М., 1977.—С. 66—68.
13. Koyama T., Zhu M.-Y., Shong L. O. et al. // Jap. J. Physiol.—1990.—Vol. 40, № 5.—P. 635—649.
14. Lowry O. H., Rosebrough N. J., Farr A. L., Randall R. J. // J. biol. Chem.—1951.—Vol. 193, № 2.—P. 265—275.
15. Schneider W. C., Hogeboom G. H. // Cancer Res.—1951.—Vol. 11.—P. 1—22.

Поступила 30.07.93

IMPACT OF LIPID PEROXIDATION ON THE LIPID AND PHOSPHOLIPID COMPOSITION IN THE MITOCHONDRIAL MEMBRANE DURING THERMAL INCUBATION

K. T. Almatov, D. T. Mirtalipov, Kh. N. Musaev,
O. T. Dzhamalova, D. A. Azimov

Institute of Zoology and Parasitology, Uzbek Republic's Academy of Sciences, Tashkent

Alterations in the content of lipids and phospholipids were studied in rat liver mitochondrial membranes after long-term heating at 37°, pH 7.4, using FeSO_4 -ascorbate as inducers of lipid peroxidation. Under these conditions, activation of lipid peroxidation in mitochondrial membranes led to a marked increase in the rate of hydrolysis of phosphatidylethanolamine and lysophosphatidylethanolamine, to elevated synthesis of phosphatidylserine, sphingomyelin, phosphatidic and lysophosphatidic acids, diglycerides and cholesterol esters as well as to inhibit hydrolysis of phosphatidylcholine, cardiolipin and their lyso-derivatives.

Ж. В. Антонова, О. А. Вировец, М. М. Ганпаров

ВЛИЯНИЕ РАЗЛИЧНЫХ ВИДОВ СУХОКРАХМАЛЬНОЙ ПАТОКИ НА ТЕМПЫ УТИЛИЗАЦИИ ГЛЮКОЗЫ В ЛИПИДНЫЕ, УГЛЕВОДНЫЕ И БЕЛКОВЫЕ КОМПОНЕНТЫ ПЕЧЕНИ КРЫС

Институт питания РАМН, Москва

В последние десятилетия за рубежом и в СНГ широко используются продукты ферментативного расщепления крахмала и его фракций с целью создания продуктов детского и специализированного питания [7]. Это связано с тем, что потребность в медленноусвояемых и растворимых углеводах, являющихся прекрасным продуктом для больных диабетом и ожирением, очень высока. В то же время общепринятое представление о крахмале в составе продуктов как о медленноусвояемом углеводе оказалось сильно упрощенным [6, 7].

Большое разнообразие природных крахмалов обусловлено не только их источниками (зерновые, клубневые, бобовые, некоторые фрукты), но также различиями размеров, форм и составов их крахмальных гранул [6]. Физико-химические и пищевые свойства крахмалов, в частности темпы переваривания и усвоения, зависят не только от их природы и структуры, но и в целом от химического состава и физических свойств пищевых продуктов, что справедливо и для других углеводов [2, 8].

Целью настоящей работы являлось изучение влияния двух образцов модифицированных крахмалов, сухой кукурузной патоки, на утилизацию меченой глюкозы в липиды, гликоген и белки печени.

Методика. Работа выполнена на крысах-самцах линии Вистар с начальной массой тела в 1-й группе $79 \pm 2,2$ г, во 2-й $80 \pm 2,1$ г и в 3-й $83 \pm 3,2$ г.

Животные получали рацион, содержащий 56% углеводов, 18% белка, 26% жиров (подсолнечное масло и лярд в соотношении 1:1) по калорийности и необходимое количество витаминов, макро- и микроэлементов [3].

Крысы 1-й, контрольной, группы получали в качестве единственного источника углеводов кукурузный крахмал, 2-й группы — рацион, в котором крахмал был полностью заменен на сухую кукурузную патоку (НИИ крахмалопаточной промышленности), 3-й — сухокрахмальную патоку (фирма «Церестар», Франция).

Сухокрахмальная патока импортного производства (СКП) содержала 0,5% свободной глюкозы от общего количества углеводов, 6,1% дисахаридов в виде мальтозы; олигосахара и полимеры от 3 и более глюкозных остатков составляли 93,4%. Сухокрахмальная патока отечественного производства (декстрин-мальтоза — ДМ) содержала 4,3% свободной глюкозы от общего количества углеводов, 69,0% мальтозы и 26,7% олигосахаров.

В день забоя в 9.00—9.15 ч каждой крысе 1-й, 2-й и 12 животным 3-й группы внутривенно

вводили по 1 мл инъекционной смеси $6\text{-}^3\text{H}$ - и $6\text{-}^{14}\text{C}$ -глюкозы. Остальным 12 крысам 3-й группы (СКП в качестве углеводов) внутривенно вводили по 1 мл смеси $6\text{-}^3\text{H}$ - и $1\text{-}^{14}\text{C}$ -глюкозы.

В расчетах проводили нормирование результатов, т. е. умножение полученных данных на коэффициент, соответствующий введению по 100 мКи каждого из радиоактивно меченных индикаторов животному массой 300 г. При расчете отношения $^3\text{H}/^{14}\text{C}$ введена поправка на величину этого отношения в введенной смеси изотопов.

Крыс декапитировали под эфирным наркозом через 0,5, 1, 2 и 3 ч после введения изотопной метки. Выделение белков, общих липидов и гликогена печени, их определение и измерение радиоактивности проводили по ранее описанной методике [4]. Выделение триглицеридов печени крыс проводили общепринятым методом на колонке с силикагелем (L 100/250) с проверкой чистоты разделения методом тонкослойной хроматографии.

Результаты и обсуждение. Как видно из табл. 1, замена крахмала на две разновидности сухокрахмальной патоки — ДМ и СКП — в экспериментальном рационе не влияла на рост животных. Следует отметить также, что от характера углеводов пищи не зависело и содержание гликогена и липидов в печени животных (табл. 2).

Динамика выведения $6\text{-}^{14}\text{C}$ -глюкозы из сыворотки крови подтверждает отсутствие ошибки при внутривенном введении индикаторной метки: во всех 3 экспериментальных группах животных выведение меченой глюкозы из сыворотки крови было одинаковым (рис. 1).

Наибольшие различия при потреблении двух образцов сухокрахмальной патоки (ДМ и СКП) в сравнении с контрольной крахмальной диетой наблюдались при оценке включения меченой глюкозы в липиды и белки печени. Приняв количество радиоактивности, включившейся суммар-

Таблица 1

Ростомассовые показатели крыс при кормлении крахмалом и сухой крахмальной патокой в течение 30 дней

Вид углеводов в рационе	Масса тела, г		
	начальная	на 10-й день эксперимента	конечная
Крахмал ($n=12$)	$79 \pm 2,2$	$121 \pm 2,9$	$238 \pm 6,4$
ДМ ($n=12$)	$80 \pm 2,1^*$	$115 \pm 5,5^*$	$234 \pm 7,4^*$
СКП ($n=24$)	$83 \pm 3,2^*$	$115 \pm 3,8^*$	$257 \pm 6,3^*$

Примечание. Здесь и в табл. 2 звездочка — различия недостоверны.

Таблица 2

Содержание липидов и гликогена (в мг на 1 г сырой ткани печени) в печени крыс

Вид углеводов в рационе	Липиды	Гликоген
Крахмал ($n=12$)	$49,0 \pm 2,4$	$38,0 \pm 5,3$
ДМ ($n=12$)	$47,0 \pm 1,7^*$	$36,0 \pm 4,4^*$
СКП ($n=24$)	$44,7 \pm 1,9^*$	$35,0 \pm 3,2^*$

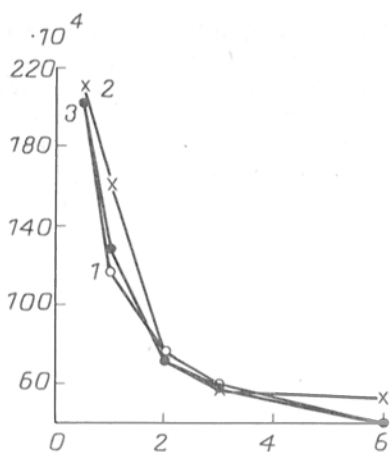


Рис. 1. Скорость выведения ^{14}C -глюкозы из сыворотки крови крыс.

Здесь и на рис. 2, 4, 5 по оси абсцисс — часы; по оси ординат — рас/мин в 1 мл.

но в белки, липиды и гликоген, выделенные из данного количества ткани печени, за 100%, определили долю радиоактивности, включившуюся в каждую из этих фракций, в процентах от этой суммы. Полученные результаты приведены в табл. 3.

Из табл. 3 видно, что в гликоген печени включается лишь от 0,5 до 1,4% от суммарной радиоактивности глюкозы. Эта величина оставалась такой же низкой во всех изучавшихся рационах. Около 98—99% от суммарной радиоактивности глюкозы включается в белки и липиды. На распределение метки между белками и липидами оказывал существенное влияние источник углеводов в пище.

$6\text{-}^{14}\text{C}$ -глюкоза включалась в общие липиды печени в большем количестве у крыс, получавших контрольный крахмальный рацион, в то время как включение $6\text{-}^{14}\text{C}$ -глюкозы в липиды печени при кормлении ДМ и СКП достоверно снижалось. При этом включение $6\text{-}^{14}\text{C}$ -глюкозы в липиды печени при кормлении ДМ по сравнению с СКП было ближе к контрольным значениям (рис. 2). Кормление ДМ и СКП также уменьшало включение $6\text{-}^{14}\text{C}$ -глюкозы в гликоген печени в сравнении с контролем. Наглядно эти закономерности представлены на рис. 3.

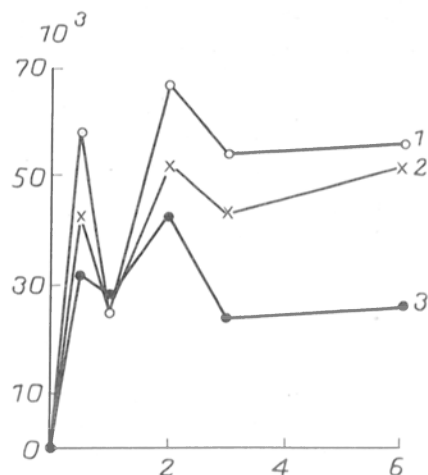


Рис. 2. Включение $6\text{-}^{14}\text{C}$ -глюкозы в липиды печени крыс.

По оси ординат — рас/мин в 100 мг сырой ткани печени. Обозначения те же, что на рис. 1.

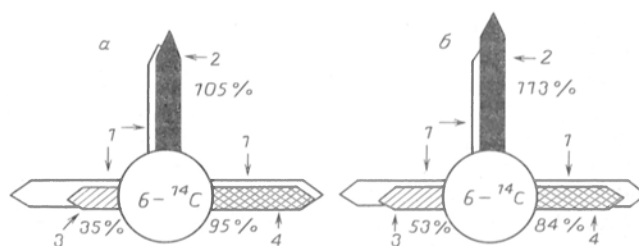


Рис. 3. Включение $6\text{-}^{14}\text{C}$ -глюкозы в % от контроля в липиды, белки и гликоген печени крыс.

а — ДМ; б — СКП. 1 — доля включения радиоактивности при кормлении крыс крахмалом (контроль), принята за 100%; 2 — белки; 3 — гликоген; 4 — липиды.

При использовании $6\text{-}^3\text{H}$ -глюкозы для синтеза липидов печени выявлено, что доля включения $6\text{-}^3\text{H}$ -глюкозы в случае кормления двумя разновидностями модифицированных крахмалов достоверно увеличивается, причем включение $6\text{-}^3\text{H}$ -глюкозы в липиды печени в группе с ДМ ближе к контрольным значениям, чем в группе с СКП (рис. 4).

Отношение $^3\text{H}/^{14}\text{C}$ неоднократно использовалось нами [1, 3, 4] для оценки сдвигов

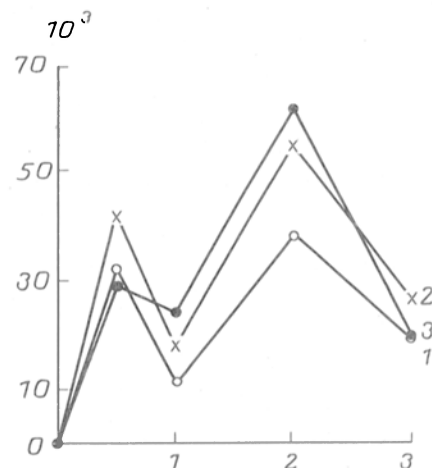


Рис. 4. Включение $6\text{-}^3\text{H}$ -глюкозы в общие липиды печени крыс.

Обозначения те же, что на рис. 2.

Таблица 3

Распределение радиоактивности (в %) из меченой глюкозы между липидами, белками и гликогеном печени крыс, содержащихся на рационах с разным углеводным составом

Изотоп	Вид углеводов в рационе	Белки	Общие липиды	Гликоген
$6\text{-}^{14}\text{C}$	Контроль — крахмал ($n=12$)	$56,3 \pm 2,4$	$42,3 \pm 1,7$	$1,40 \pm 0,4$
	ДМ ($n=12$)	$59,0 \pm 2,4$	$40,5 \pm 1,5$	$0,50 \pm 0,2$
	СКП ($n=24$)	$63,3 \pm 1,4$	$35,4 \pm 1,4$	$0,75 \pm 0,3$
		$p < 0,05$	$p < 0,01$	$p < 0,01$
$6\text{-}^3\text{H}$	Контроль — крахмал ($n=12$)	$66,5 \pm 1,5$	$32,5 \pm 1,5$	$1,00 \pm 0,4$
	ДМ ($n=12$)	$52,2 \pm 1,7$	$47,0 \pm 2,2$	$0,80 \pm 0,3$
	СКП ($n=24$)	$46,9 \pm 1,3$	$51,8 \pm 2,8$	$1,30 \pm 0,4$
		$p < 0,05$	$p < 0,01$	$p < 0,01$

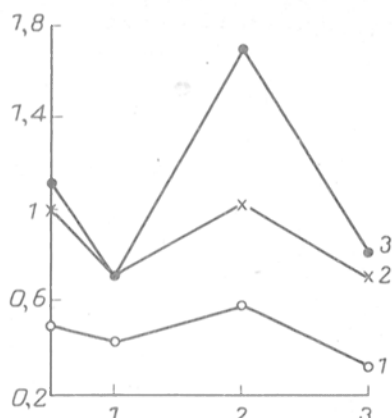


Рис. 5. Отношение $^3\text{H-C}/^{14}\text{C}$ в липидах печени крыс.
По оси ординат — $^3\text{H}/^{14}\text{C}$. Обозначение то же, что на рис. 1.

метаболических процессов, вызванных употреблением различных углеводов в пище. На рис. 5 наглядно представлен метаболический сдвиг при кормлении двумя типами патоки.

Экспериментальные данные, полученные при использовании $6\text{-}^{14}\text{C}$ -глюкозы в качестве предшественника для синтеза белков, гликогена и липидов печени имеют определенную связь с теми данными, которые получены нами при использовании $1\text{-}^{14}\text{C}$ -глюкозы в предыдущих экспериментах [1]. Связь заключается в различной степени использования этих двух предшественников для синтеза некоторых структур печени, что в свою очередь связано с определенным соотношением пентозофосфатного и гликолитического путей утилизации глюкозы в организме.

В рамках описываемого эксперимента 12 животным 3-й группы (углевод — СКП) была введена изотопная смесь $1\text{-}^{14}\text{C}$ - и $6\text{-}^3\text{H}$ -глюкозы. Другим 12 животным этой группы была введена смесь $6\text{-}^{14}\text{C}$ - и $6\text{-}^3\text{H}$ -глюкозы. Это позволило рассчитать отношение $6\text{-}^{14}\text{C}/1\text{-}^{14}\text{C}$ в триглицеридах печени крыс, получавших эту сухокрахмальную патоку, которые составляли $7,82 \pm 1,8$, $2,35 \pm 0,25$ и $2,78 \pm 1,42$ через 0,5, 1 и 2 ч соответственно.

Углерод из положения 6 глюкозы включается в триглицериды печени в гораздо большем количестве, чем углерод из положения 1. Это является следствием того, что $1\text{-}^{14}\text{C}$ -глюкоза частично используется на образование CO_2 по пентозофосфатному пути, поэтому отношение $6\text{-}^{14}\text{C}/1\text{-}^{14}\text{C}$ в определенной степени может рассматриваться как показатель соотношения пентозофосфатного и гликолитического путей метаболизма глюкозы. Регуляция последнего имеет большое значение для жизнедеятельности клеток, особенно в тех, где интенсивно синтезируются липиды (адипоциты, гепатоциты), так как пентозофосфатный путь является поставщиком НАДФ $\cdot \text{H}_2$ для синтеза жирных кислот [5].

Результаты эксперимента свидетельствуют, что продукты, полученные путем расщепления крах-

малов, могут вызывать сдвиги в метаболизме глюкозы в организме. При этом ДМ, богатая дисахарами, в частности мальтозой, вызывает меньшие отклонения в липидном обмене, чем СКП, богатая олигосахарами и полимерами, содержащими от 3 и более глюкозных остатков.

Различие во включении углерода из положения 1 в положение 6 глюкозы при замене крахмала на сухокрахмальную патоку указывает на сдвиг соотношения пентозофосфатного и гликолитического путей в сторону увеличения активности последнего.

Таким образом, использование продуктов переработки крахмала в качестве источника углеводов в питании здоровых и больных людей, включая детей первого года жизни, должно операться на данные о темпах утилизации углеводов, что в свою очередь зависит от содержания моно-, дисахаридов и полимеров с большим количеством глюкозных остатков.

ЛИТЕРАТУРА

1. Антонова Ж. В., Вировец О. А., Ганпаров М. М. // *Вопр. питания*.— 1992.— № 1.— С. 53—55.
2. Вировец О. А., Ганпаров М. М., Шпитанков М. И. // *Там же*.— 1990.— № 1.— С. 49—52.
3. Ганпаров М. М., Вировец О. А., Соколов А. И., Мальцев Г. Ю. // *Там же*.— 1986.— № 3.— С. 46—50.
4. Ганпаров М. М., Вировец О. А., Тарасова И. Б. // *Там же*.— 1987.— № 3.— С. 41—44.
5. Крю Ж. // *Биохимия*.— Л., 1978.— С. 333—335.
6. Bornet F., Champ M. et al. // *Cah. Nutr. Diet.*— 1990.— Vol. 25, № 4.— P. 254—262.
7. Yeung D. L. // *Heinz Nutritional Data*.— Pittsburgh, 1990.— P. 24—25.
8. Szepesi B., Michaelis O. F. // *Progr. Biochem. Pharmacol.*— 1986.— Vol. 21.— P. 192—214.

Поступила 31.03.93

EFFECT OF DIFFERENT TYPES OF DRY STARCH SYRUP ON THE RATES OF GLUCOSE UTILIZATION INTO RAT LIVER LIPID, CARBOHYDRATE, AND PROTEIN COMPONENTS

Zh. V. Antonova, O. A. Virovets, M. M. Gapparov

Institute of Nutrition, Russian Academy of Medical Sciences, Moscow

Effect of a diet, containing dextran maltose and dry starch syrup, on some patterns of liver tissue metabolism were studied in young Wistar rats within 30 days. The animals of Control Group 1 were kept on a diet containing corn starch as a source of carbohydrates; in Group 2 the starch was replaced by the dry starch syrup enriched with disaccharides and especially with maltose; the dry starch syrup added into the Group 3 diet containing mainly oligosaccharides and polymers with high levels of glucose residues. The label mixtures of $6\text{-}^3\text{H}$ - and $6\text{-}^{14}\text{C}$ -glucose as well as of $6\text{-}^3\text{H}$ - and $1\text{-}^{14}\text{C}$ -glucose were administered into the animals on the day of death. Analysis of the findings has shown that the products of starch hydrolysis may the specific parameters of glucose metabolism. Incorporation of the label into liver tissue lipids was similar to the control values in the group of animals kept on a diet enriched with maltose as compared with group 3. The glycolytic pathway of glucose utilization was more activated than the pentosephosphate pathway after substituting starch for dry starch syrup as shown by differences in the rates of carbon incorporation at positions 1 and 6 of a glucose molecule.

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 1994

УДК 616-002-056.3-07:616.155.34-037

С. Г. Пушко, В. Л. Доценко, Е. А. Нешкова,
Л. А. Горячкина, Н. М. Ненашева

УЧАСТИЕ НЕЙТРОФИЛОВ В ПАТОГЕНЕЗЕ АЛЛЕРГИЧЕСКОГО ВОСПАЛЕНИЯ: ИНГИ- БИТОРНО-ПРОТЕАЗНЫЙ ИНДЕКС В ОЦЕН- КЕ И ПРОГНОЗИРОВАНИИ АТОНИЧЕСКИХ ЗАБОЛЕВАНИЙ

Российская медицинская академия последипломного обуче-
ния, Москва

Как известно, в патогенезе аллергических реакций, протекающих по типу гиперчувствительности немедленного типа (ГНТ), так называемых атоний, активную роль играет калликреин-кининовая система плазмы крови. Активация этой ключевой для протеолитических ферментов плазмы (ферментов свертывания, фибринолиза, компонентов комплемента) системы может в значительной мере влиять на состояние больных через освобождение в плазме крови вазоактивных пептидов, расширяющих капилляры, увеличивающих их проницаемость, усиливающих спазм гладкой мускулатуры бронхов [2, 22].

Одним из важных путей активации калликреин-кининовой системы плазмы крови при аллергических реакциях является, очевидно, ее взаимодействие с лейкоцитарными факторами, освобождающимися при активации клеток-эффекторов по IgE-зависимому механизму. «Секрет» обогащенных сенсибилизированными базофилами лейкоцитов в опытах *in vitro* непосредственно активирует фактор Хагемана и связанные с этим ферменты реакции [11].

Активация калликреин-кининовой системы и связанных с ней протеолитических систем плазмы крови не является единственной патогенетически значимой реакцией со стороны активированных нейтрофилов в развитии реакций ГНТ. Накопление значительного количества активированных нейтрофилов в очагах немедленных аллергических реакций в значительной мере обуславливает признаки атонии, а в некоторых случаях способствует формированию «шокового» органа [4, 14].

Одним из протеолитических ферментов нейтрофилов, во многом определяющим патогенетические свойства активированного нейтрофила, является эластаза. Этот фермент, содержащийся в азурофильных гранулах, предназначен для протеолитического расщепления фагоцитированных клеткой объектов, однако при определенных условиях дегрануляционной активности нейтрофилов попадает во внеклеточную среду. Лейкоцитарная эластаза — сериновая протеиназа с очень широкой субстратной специфичностью, способная расщеплять многие биологические субстраты, в том числе факторы свертывания и фибринолиза

[9, 13, 18, 19], компоненты комплемента [9], транспортные белки [15], иммуноглобулины [12] и, наконец, основное вещество — коллагеновые и эластиновые волокна соединительной ткани [10, 16, 17, 21]. Показано, что эластаза стимулирует секрецию слизи в респираторном тракте [23], в том числе при аллергических реакциях [24].

Эластаза, являясь маркерным ферментом дегрануляционной стадии активации нейтрофилов, в плазме крови или других биологических жидкостях может служить диагностическим и прогностическим признаком глубокой воспалительной реакции.

Целью настоящей работы являлась оценка информативности определения эластазоподобной активности в плазме крови больных атониями как объективного признака участия нейтрофилов в патогенезе заболевания.

В результате анализа полученных величин активности эластазо- и трипсиноподобных протеиназ, а также уровня антитриптической активности предложен ингибиторно-протеазный индекс (ИПИ) как показатель степени тяжести патологического процесса.

Методика. Обследовано 65 больных, находящихся на лечении в аллергологическом стационаре. Всем больным проводилось общеклиническое и специфическое аллергологическое обследование, исследование функции внешнего дыхания в период обострения и ремиссии (у больных атонической бронхиальной астмой).

Больные были разделены на группы.

1-ю группу составил 21 больной поллинозом (аллергическим риноконъюнктивитом без легочных проявлений) в возрасте от 18 до 45 лет: 17 обследованы в состоянии обострения в сезон палинации, 7 — не только в период обострения, но и ремиссии вне сезона палинации. 4 больных было обследовано лишь в фазу ремиссии вне сезона палинации.

2-ю группу составили 36 больных атонической бронхиальной астмой, обусловленной пылевой сенсибилизацией, аллергией к домашней пыли или их сочетанием. Возраст больных, как и в 1-й группе, от 18 до 45 лет. 27 больных были обследованы как в фазу ремиссии (вне периода палинации), так и в фазу обострения; 3 больных — в состоянии ремиссии и 6 — в фазу обострения. 32 больных наряду с астмой имели также проявления аллергического риноконъюнктивита.

28 больных с атонической бронхиальной астмой получали препарат дитек («Boehringer Ingelheim», Германия) в виде ингаляций аэрозоля, из них 10 больных — в терапевтической дозировке (по 2 дыхательные дозы 4 раза в день) в течение 2 нед с последующей постепенной отменой препарата; эти больные обследовались в фазу обострения и через 2 нед от начала применения препарата. 18 больных получали препарат в той же дозировке в течение 4 нед с постепенной последующей отменой препарата и обследовались

как до назначения дитека, так и через 1, 2 и 4 нед от начала применения препарата. У больных с тяжелой и среднетяжелой степенью астмы препарат назначался в первые 3—7 дней совместно с ксантиновыми производными. Среди больных атонической бронхиальной астмой 20 больных имели легкую, 13 — среднетяжелую и 3 — тяжелую степень заболевания.

В 3-ю группу вошло 8 больных с атоническим дерматитом, у 3 из них данное заболевание сочеталось с поллинозом без легочных проявлений. Все больные были обследованы как в момент обострения, так и в период ремиссии. Возраст больных также был в пределах 18—45 лет.

Больные всех указанных групп не имели выявленных сопутствующих заболеваний, сопровождающихся воспалительным процессом.

Общую трипсиноподобную активность сыворотки крови определяли, используя ВАЕЕ (этиловый эфир N- α -бензоил-L-аргинина) в качестве субстрата [7, 25]. Антитриптическую активность (α -1 ПИ) в сыворотке крови определяли методом [1]. Для определения эластазоподобной активности сыворотки крови использовали ВОС-Ala-ONp (терт-бутоксикарбонил-L-аланин-паранитрофениловый эфир) в качестве субстрата [5, 26].

Препарат лейкоцитарной эластазы получен методом, описанным в [3].

Результаты и обсуждение. Результаты определения суммарной протеолитической активности сериновых протеиназ трипсинового типа у больных поллинозом без легочных проявлений (ПОЛ), с атонической бронхиальной астмой (ЛБА) и с атоническим дерматитом (ЛД) приведены в таблице. В таблице суммированы данные по антипротеолитическому потенциалу и эластазоподобной активности сыворотки крови тех же групп больных.

Суммарная активность протеолитических ферментов, расщепляющих ВАЕЕ в сыворотке крови больных атоническими заболеваниями во всех исследованных группах, практически не отличалась от соответствующей величины в сыворотке крови лиц контрольной группы (360 ± 20 мЕ/мл). В 1-й группе (ПОЛ) была отмечена минимальная величина ВАЕЕ-эстеразной активности ($318,4 \pm 50,8$ мЕ/мл). По мере появления признаков бронхиальной астмы (2-я группы больных — ЛБА) ВАЕЕ-эстеразная активность возрастала ($380,3 \pm 30,0$ мЕ/мл). Максимальное значение этот суммарный показатель имел у больных 3-й группы — ЛД ($405 \pm 8,32$ мЕ/мл), что могло сви-

детельствовать об определенной тенденции к активации протеолитических процессов в плазме крови у этих больных.

Наблюдаемая тенденция к увеличению общей протеолитической активности плазмы крови сопровождалась направленным в обратную сторону изменением антитриптического потенциала плазмы крови. Рассматривая антитриптическую активность плазмы как потенциальную емкость α -1-протеиназного ингибитора — главного ингибитора сериновых протеиназ плазменного и клеточного происхождения [20], мы пришли к заключению о значительном уменьшении его активности в направлении: ПОЛ ($26,9 \pm 3,1$ ИЕ/мл) → ЛБА ($21,2 \pm 2,0$ ИЕ/мл) → ЛД ($19,11 \pm 4,7$ ИЕ/мл).

Наблюдаемые изменения показателей суммарной протеолитической активности и потенциальной активности α -1-ПИ, очевидно, типичны для плазмы крови при хроническом воспалении, если рассматривать уменьшение антитриптического потенциала плазмы как следствие интенсивного его потребления активными плазменными и клеточными протеиназами.

Подтверждению данного положения служит третий показатель, измеренный в плазме крови обследованных больных (см. таблицу): эластазоподобная (ВОС-Ala-ONp-эстеразная) активность. Как видно из таблицы, данная активность в 1,7 раза превышала норму у больных ПОЛ и в 2,4 раза у больных ЛД. Повышение эластазоподобной активности сыворотки крови обследованных больных может свидетельствовать об активации у них полиморфноядерных лейкоцитов и активно протекающих в плазме крови и тканях процессах нейтрофильной дегрануляции с освобождением лейкоцитарной эластазы.

Фаза ремиссии у всех обследованных больных сопровождалась снижением эластазоподобной активности плазмы, хотя этот показатель все-таки превышал норму в 1,3—1,7 раза ($210 \pm 23,9$ мЕ/мл у ПОЛ и $266,3 \pm 24,2$ мЕ/мл у ЛД). Снижение эластазоподобной активности сопровождалось повышением уровня α -1-ПИ у больных ЛБА и ЛД.

Для объективизации оценки степени сбалансированности антипротеолитической и протеолитической системы сыворотки крови мы предложили ИПИ, численно равный отношению антитриптического потенциала (ИЕ/мл) к эластазоподобной активности (Е/мл). ИПИ, рассчитанный для лиц

Суммарная трипсиноподобная (ВАЕЕ-эстеразная), эластазоподобная (ВОС-Ala-ONp-эстеразная), антитриптическая активность и ИПИ сыворотки крови больных ($M \pm m$)

Обследование		Обострение					Ремиссия							
		n	BAEE-эстеразная активность, мЕ/мл	BOC-эстеразная активность, мЕ/мл	анти триглицеридная активность, ИЕ/мл	ИПИ	n	BAEE-эстеразная активность, мЕ/мл	p	BOC-эстеразная активность, мЕ/мл	p	анти триглицеридная активность, ИЕ/мл	p	ИПИ
Контроль		5	360 ± 20	160 ± 10	29,9 ± 1,2	187,0	5	360 ± 20		160 ± 10		29,9 ± 1,2		187,0
ПОЛ	p	17	318,4 ± 50,8 > 0,05	267,9 ± 19,6 *** < 0,001	26,9 ± 3,1 > 0,05	100,4	11	328 ± 60,0 > 0,05	> 0,05	210,6 ± 23,9 > 0,05	> 0,05	24,1 ± 5,3 > 0,05	> 0,05	114,2
ЛБА		33	380,3 ± 20,0 > 0,05	283,5 ± 19,6 *** < 0,001	21,2 ± 2,0 < 0,001	74,9	30	374,3 ± 27,6 > 0,05	> 0,05	223,9 ± 12,6 < 0,001	< 0,01	24,2 ± 2,1 < 0,05	> 0,05	108,1
ЛД	p	8	405,8 ± 83,2 > 0,05	380,3 ± 20,8 *** < 0,001	19,11 ± 4,7 = 0,05	50,3	8	490,3 ± 71,6 > 0,05	> 0,05	266,3 ± 24,2 < 0,01	< 0,01	25,5 ± 6,1 > 0,05	> 0,05	95,9

Примечание. p < 0,01 между показателями разных групп: * — между показателями данной и 1-й групп, ** — данной и 2-й групп, *** — данной и 3-й групп.

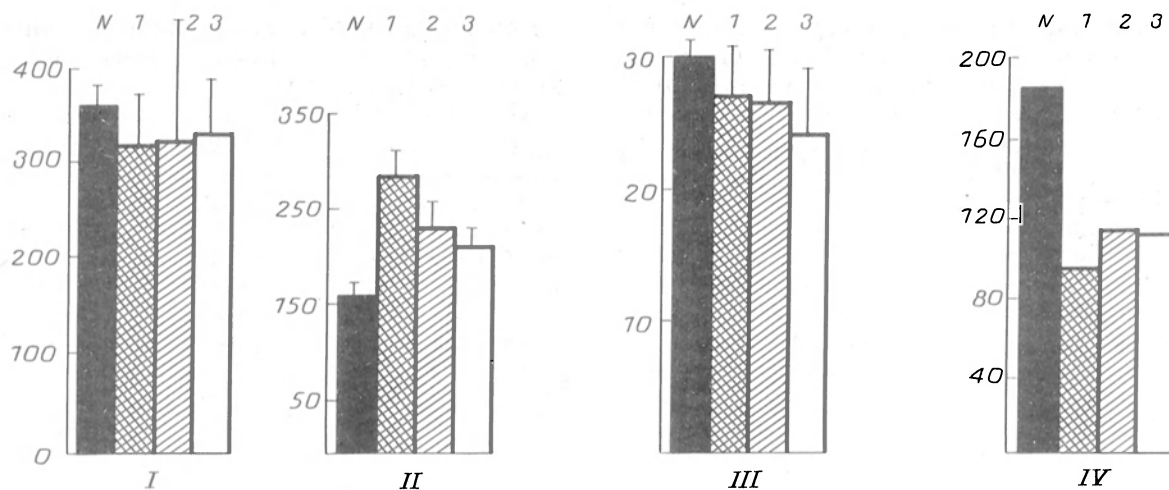


Рис. 1. Суммарная активность трипсино-, эластазоподобных протеиназ, антитриптический потенциал и ингибиторно-протеазный индекс сыворотки крови больных.

Здесь и на рис. 2 по осям значения ВАЕЕ-эстеразной активности в мЕ/мл (I), ВОС-эстеразной активности в мЕ/мл (II), антитриптической активности в ИЕ/мл (III), ингибиторно-протеазный индекс (IV). N—норма, ПОЛ при выраженных (1), стертых проявлениях (2) и ремиссии (3).

контрольной группы, составил 187,0. Значения ИПИ сыворотки крови больных ПОЛ, АБА и АД, как видно из таблицы, ниже ИПИ лиц контрольной группы соответственно в 1,9, 2,4 и 3,7 раза, что, по-видимому, свидетельствует о наличии значительного дисбаланса между протеолитической и антипротеолитической системами плазмы крови, усиливающегося в направлении ПОЛ (100,4) → АБА (74,9) → АД (50,3).

В ремиссию ИПИ у больных всех групп возрастает, не достигая, однако, нормы, что свидетельствует, очевидно, об отсутствии полной сбалансированности в системе протеолиз—антипротеолиз у больных с атоическими заболеваниями даже в фазу ремиссии.

Углубленный анализ состояния больных ПОЛ и разделение их на подгруппы с выраженными и стертыми проявлениями болезни позволили более детально охарактеризовать описанные выше протеолитические свойства их сывороток крови. На рис. 1 представлены гистограмма ВАЕЕ-эстеразной, трипсиноподобной, ВОС-эстеразной (эластазоподобной), антитриптической активности и ИПИ плазмы крови больных ПОЛ в подгруппах: 1-я—выраженные клинические проявления, 2-я—стертые клинические проявления и 3-я—ремиссия. Действительно, уровень общей трипсиноподобной активности сыворотки крови очень мало отличался от нормы во всех 3 группах больных. Уровень эластазоподобной активности, напротив, у больных 1-й группы с выраженными проявлениями аллергического риноконъюнктивального синдрома возрастал по сравнению с нормой в 1,8 раза. У больных со стертыми проявлениями эта активность была в 1,4 раза выше нормы, оставаясь повышенной даже в период клинической ремиссии. Антитриптический потенциал плазмы крови практически не отличался от нормы. ИПИ у больных с выраженными клиническими проявлениями ПОЛ был существенно ниже нормы (95,4). ИПИ больных со стертыми проявлениями аллергического риноконъюнктивита практически не отличался от значений ИПИ в фазу ремиссии. Этот факт позволяет предположить зависимость между величиной ИПИ (следова-

тельно, степенью дисбаланса в системе протеолиз—антипротеолиз) и тяжестью клинических проявлений атоического заболевания.

Анализ протеолитической активности и ингибиторного потенциала у больных с атоической бронхиальной астмой в зависимости от степени тяжести течения заболевания подтвердил и прояснил полученные у больных ПОЛ закономерности.

На рис. 2 приведены гистограммы ВАЕЕ- и ВОС-эстеразной активности, а также антитриптического потенциала и значений ИПИ больных тяжелой, среднетяжелой и легкой формами клинических проявлений в фазу обострения и ремиссии болезни.

Как и в случае ПОЛ, трипсиноподобная активность плазмы не отличалась от показателей нормы во всех подгруппах, тогда как эластазоподобная активность оказалась в 2,7 раза выше нормы в подгруппе тяжелой АБА, в 2,1 раза при среднетяжелой АБА и в 1,4 раза при легкой форме заболевания. В фазу ремиссии болезни увеличение эластазоподобной активности по подгруппам сохранялось, хотя абсолютные значения активностей были значительно ниже, чем в фазу обострения (см. рис. 2, б).

Антитриптический потенциал сыворотки крови больных во всех подгруппах в фазу обострения (см. рис. 2, а) был снижен на 20—30% по сравнению с нормой, что подтверждает отмеченную ранее закономерность обратной зависимости уровня ингибиторного потенциала от активности нейтрофилов и, в частности, от величины эластазоподобной активности плазмы. В фазу ремиссии уровень ингибитора у больных легкой и среднетяжелой формами менялся незначительно, тогда как у больных тяжелой формой повышался почти в 2 раза, что, по всей вероятности, можно объяснить уменьшением пресса со стороны инактивирующего и истощающего действия активных нейтрофилов на α -1-ПИ. Наибольший дисбаланс между клеточными эластазоподобными протеиназами и плазменным антитриптическим потенциалом характерен для больных тяжелой формой АБА (ИПИ 55,3), наименьший

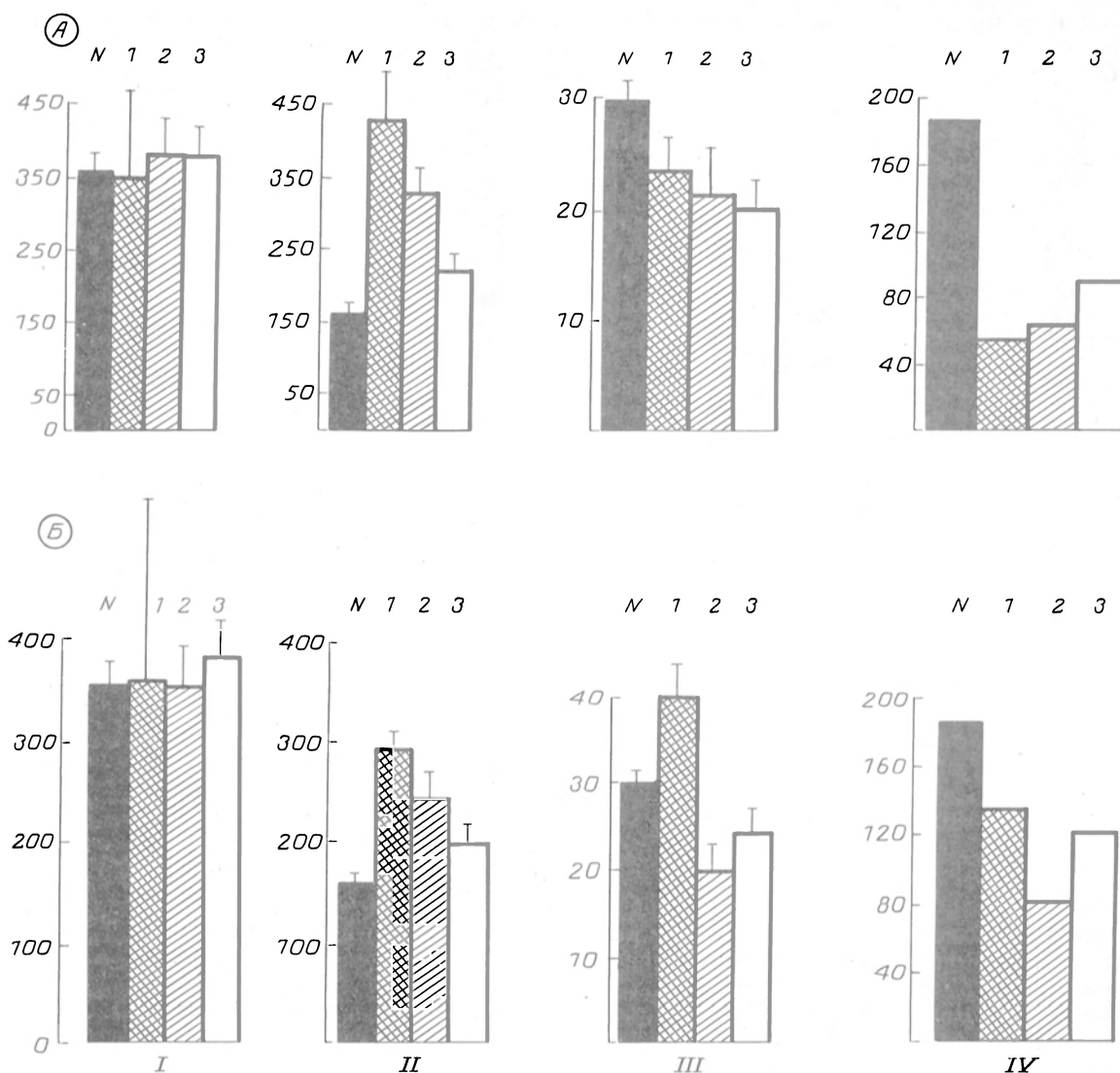


Рис. 2. Суммарная активность трипсино- и эластазоподобных протеиназ, антитриптический потенциал и ингибиторно-протезный индекс крови больных.

АБА тяжелой (1), среднетяжелой (2), легкой (3) форм в фазе обострения (А) и ремиссии (Б).

(ИПИ 91,9)—легкой формой заболевания. В ремиссию равновесие в системе протеиназы—ингибиторы частично восстанавливается, однако ИПИ не достигает величины, соответствующей норме (контрольная группа).

Терапия АБА препаратом дитек, проведенная в течение 2—4 нед, показала, что улучшение состояния больных с учетом данных физикального обследования, показателей функции внешнего дыхания, а также их самочувствия сопровождалось резким (в течение 1-й недели) снижением эластазоподобной активности при высокой стабильности остальных показателей сыворотки крови больных, в том числе антитриптического потенциала плазмы (рис. 3). При последующем лечении уровень эластазоподобной активности практически не изменялся.

Для выяснения механизма влияния дитека на эластазоподобную активность сыворотки крови изучили воздействие одного из его компонентов (динатриевого хромогликата—ДНХГ) непосредственно на препарат лейкоцитарной эластазы. На рис. 4 приведены результаты такого определения,

свидетельствующие о том, что ДНХГ подавляет активность лейкоцитарной эластазы и увеличивает эффект в зависимости от дозы, хотя максимальное количество заингибированной эластазы не превышает 50% от исходной активности. Очевидно, прямое действие препарата на нативную лейкоцитарную эластазу является одной из составляющих его терапевтического эффекта при АБА, при этом 20 мг ДНХГ подавляется 1,93 МЕ эластазы. Интересно, что антитриптический потенциал плазмы крови при этом практически не изменяется.

Сбалансированность в системе протеолиз—антипротеолиз, очевидно, наступала также в течение 1-й недели применения препарата—за это время ИПИ плазмы крови больных резко повышался—с 76,6 до 116,8. В течение 2-й недели данный показатель несколько снижался—до 97,7 и в течение 2 последующих недель практически не менялся (92,3 в конце 4-й недели применения препарата).

В более ранней работе мы показали, что при атониях (поллинозах как с легочными проявлениями

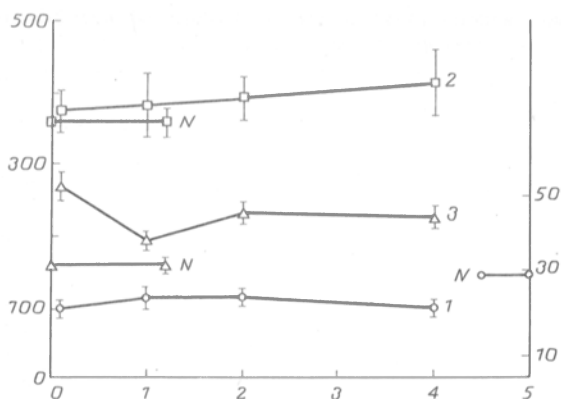


Рис. 3. Влияние препарата дитек на антитриптическую активность (1), трипсино- (2) и эластазоподобную активность (3) плазмы крови больных АБА.

По горизонтальной оси — время (в нед.), по левой вертикальной оси — ВАЕЕ- и ВОС-эстеразная активность (в мЕ/мл), по правой вертикальной оси — антитриптическая активность (в ИЕ/мл). N — норма.

ями, так и без таковых, острая крапивница) происходит активация калликреин-кининовой системы, сопровождающаяся увеличением активности калликреина и снижением содержания прекалликреина [2]. Известно, что калликреин-кининовая система регулирует активность как свертывающей, так и фибринолитической систем со значительным преобладанием активности последней [6]. Однако, как показывают результаты этой работы, высокая активность калликреина почти не повлияла на уровень суммарной ВАЕЕ-эстеразной активности плазмы у больных атопиями. Тенденция к повышению трипсиноподобной активности плазмы могла быть отмечена лишь у больных АБА и АД. Столь высокая стабильность сериновой трипсиноподобной активности плазмы крови у таких больных объясняется, очевидно, полной сбалансированностью основных сериновых протеиназ плазмы крови и соответствующих плазменных ингибиторов.

Наши результаты свидетельствуют об активации нейтрофилов при атопиях и высоком уровне эластазоподобной активности в плазме крови

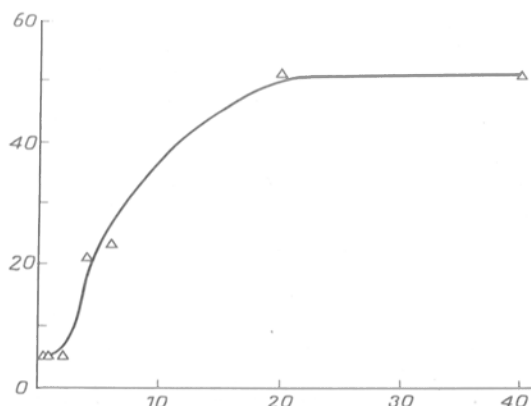


Рис. 4. Воздействие динамического хромоглоката на лейкоцитарную эластазу in vitro.

По оси абсцисс — доза ингибитора (проба), мг; по оси ординат — ингибирование лейкоцитарной эластазы, %. Активность эластазы по MeOSucAlaAlaProValpNa составляла 1,33 Е/мл при изменении в следующих условиях: 900 μ л (0,9 мл) 0,1 М трис-НСl-буфера pH 7,5; 0,5 М NaCl; 100 μ л субстрата в конечной концентрации $0,3 \cdot 10^{-3}$ М; 25° С.

всех групп больных, особенно в фазе обострения при клинически тяжелой форме болезни. Как известно, лейкоцитарная эластаза, поступающая во внеклеточное пространство при дегрануляции активированных лейкоцитов, может усугубить тяжесть состояния больных стимулирующим воздействием на секрецию слизи в респираторном тракте [22, 23].

Полученное в данной работе соответствие между степенью выраженности заболевания и эластазоподобной активностью плазмы крови делает возможным использование этого показателя как объективного признака при обследовании больного и контроля за лечением.

Результаты исследований позволяют предложить ИПИ как объективный критерий в оценке степени тяжести патологического процесса.

ЛИТЕРАТУРА

- Нартикова В. Ф., Пасхина Т. С. // *Вопр. мед. химии.* — 1974. — № 4. — С. 494.
- Ненасева Н. М., Доценко В. Л., Горячкина Л. А., Яровая Г. А. // *Там же.* — 1986. — № 5. — С. 106—111.
- Нешкова Е. А., Доценко В. Л., Ларионова Н. И. // *Биохимия.* — 1994. — Т. 58, № 10. — С. 23—26.
- Пазюк Е. А., Маянский А. И. // *Тер. арх.* — 1981. — № 11. — С. 88—91.
- Парфенкова Г. А., Оглоблина О. Г., Дomba Г. Ю. // *Кардиология.* — 1989. — № 9. — С. 94—96.
- Пасхина Т. С. // *Биохимия.* — 1976. — Т. 41. — С. 1347—1352.
- Пасхина Т. С., Шрайбер М. И., Яровая Г. А. и др. // *Вопр. мед. химии.* — 1972. — № 2. — С. 137—145.
- Фрадкин В. А. Диагностика аллергии реакциями нейтрофилов крови. — М., 1985.
- Brown M. S., Harpel P. S. // *J. biol. Chem.* — 1982. — Vol. 257. — P. 9849—9854.
- Campbell E. J., Campbell M. A. // *J. cell. Biol.* — 1988. — Vol. 106. — P. 354.
- Dotson V. L., Nenasheva N. M., Neshkova E. A. et al. // *Advanc. exp. Med. Biol.* — 1989. — Vol. 247. — P. 515—521.
- Eckle L., Kolb G., Havemann K. // *Scand. J. Immunol.* — 1991. — Vol. 34. — P. 359—364.
- Eckle L., Seitz R., Egbring R. et al. // *Biol. Chem. Hoppe-Seyler.* — 1991. — Vol. 372. — P. 1007—1014.
- Georgitis J. W., Stone B. D., Gottschlich G. // *Int. Arch. Allergy.* — 1991. — Vol. 96, № 3. — P. 231—237.
- Hammond G. L., Smith C. L., Paterson H. A. M., Sibbald W. J. // *J. clin. Endocr. Metab.* — 1990. — Vol. 71. — P. 34—39.
- Janoff A., Zeligs J. D. // *Science.* — 1968. — Vol. 161. — P. 702—704.
- Janusz M. J., Doherty N. S. // *J. Immunol.* — 1991. — Vol. 146. — P. 3922—3928.
- Jochum M., Lander S., Heimburger N., Fritz H. // *Hoppe-Seyler's Z. physiol. Chem.* — 1981. — Bd 362. — S. 103—112.
- Kleniewski J., Donaldson V. // *J. exp. Med.* — 1988. — Vol. 167. — P. 1895—1908.
- Laurell C. B., Eriksson S. // *Scand. J. clin. Lab. Invest.* — 1963. — Vol. 15. — P. 132—190.
- Maimardi C. L., Dixit S. N., Kang A. U. // *J. biol. Chem.* — 1980. — Vol. 255. — P. 5435—5441.
- Proud D., Kaplan A. D. // *Ann. Rev. Immunol.* — 1988. — Vol. 6. — P. 49—83.
- Schooster A., Antje J., Veki I., Nade J. A. // *Amer. J. Physiol.* — 1992. — Vol. 262, Pt 1. — P. L. 86—L. 91.
- Tabachnik E., Schuster A., Gold W. M., Nodel J. A. // *J. appl. Physiol.* — 1992. — Vol. 73, № 2. — P. 695—700.
- Trauschold I., Werle E., Ziegler-Rudee G. // *Biochem. Pharmacol.* — 1967. — Vol. 16. — P. 59.
- Visser L., Blout E. R. // *Biochim. biophys. Acta.* — 1972. — Vol. 268, № 1. — P. 257—260.

INVOLVEMENT OF NEUTROPHILS IN PATHOGENESIS OF ALLERGIC INFLAMMATION. EVALUATION AND PROGNOSIS OF ATOPIC DISEASES BY MEANS OF THE INHIBITORY-PROTEASE INDEX

S. G. Puzhko, V. L. Dotsenko, E. A. Neshkova, L. A. Goryachkina, N. M. Nenashcheva

Russian Medical Academy for Postgraduate Training of Physicians, Moscow

Total trypsin-like (BAEE esterase), elastase-like (BOC esterase) and antitryptic activities were studied in blood serum of patients with atopic diseases. The elastase-like activity was increased in blood serum of all the patients examined during the acute period of the disease; the enzyme activation depended on the pathology severity and clinical picture manifestations. The increase in blood plasma total proteolytic activity correlated with reverse alteration in blood antitryptic potential. The data obtained suggest that activation of neutrophils occurred in atopic diseases, thus the rate of elastase-like activity in blood might be used as an objective pattern in examination of patients and in checking of treatment course. The developed inhibitory-protease index may serve also as a criterion in evaluation of the pathological state severity.

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 1994

УДК 616.832.522-07:616.74-008.939.6-091.8

Л. И. Ковалев, А. И. Худайдамов, М. А. Галюк, С. С. Шишкин, А. С. Ниязбекова, И. Н. Гелашвили, И. А. Завалишин

ИЗУЧЕНИЕ БЕЛКОВОГО СОСТАВА СКЕЛЕТНОЙ МЫШЦЫ ЧЕЛОВЕКА ПРИ БОКОВОМ АМИОТРОФИЧЕСКОМ СКЛЕРОЗЕ

Медико-генетический научный центр РАМН, Москва, НИИ неврологии РАМН, Москва

Боковой амиотрофический склероз (БАС) — тяжелое прогрессирующее заболевание центральной нервной системы, характеризующееся поражением сегментарно-ядерных мотонейронов спинного мозга и мозгового ствола, а также корковых двигательных клеток и пирамидных трактов. Заболевание чаще регистрируется как спорадическое, хотя описаны и семейные случаи [3, 9]. В каталоге Мак-Кьюсика выделено 6 менделирующих форм БАС: 3 аутосомно-доминантных (по каталогу Мак-Кьюсика № 10540, 10550 и 10555) и 3 аутосомно-рецессивных (№ 20510, 20520 и 20525) [7]. Недавно на 21-й хромосоме был картирован ген одной аутосомно-доминантной (№ 10540) формы БАС [7, 8]. Результаты исследования антигенов HLA при спорадических случаях БАС также свидетельствуют о роли наследственных факторов в развитии данного заболевания [3, 7]. Однако вопросы патогенеза БАС остаются недостаточно изученными по настоящее время. Одно из ведущих клинических проявлений БАС — выраженные мышечные атрофии, сопровождающиеся нарушениями в структурно-молекулярной организации мышечной ткани и соответственно качественными и количественными изменениями спектра белков в пораженной мышечной ткани, обусловленными нарушениями регуляторной функции.

В последние годы для изучения первичных или иных генетически детерминированных дефектов продуктов генной экспрессии и выявления их связи с этиологией и патогенезом заболеваний широкое распространение получил метод двухмерного электрофореза [4, 5].

Образцы скелетной мышцы, использованные для анализа двухмерным электрофорезом

Наименование мышцы	Пол	Возраст, годы	Диагноз
m. gastrocnemius dextra (n=5)	М. 40—55 Норм		
m. gastrocnemius dextra	М.	52	БАС, шейно-грудная форма, стадия генерализации
	М.	49	То же
	М.	31	» »
	М.	41	» »
	Ж.	52	БАС, бульбарная форма, стадия генерализации
m. gastrocnemius sinistra	М.	53	БАС, шейно-грудная форма, стадия генерализации
	М.	42	То же
m. triceps sinistra	М.	32	То же

В настоящей работе проведено изучение изменений полипептидного состава скелетной мышцы человека при БАС методом двухмерного электрофореза.

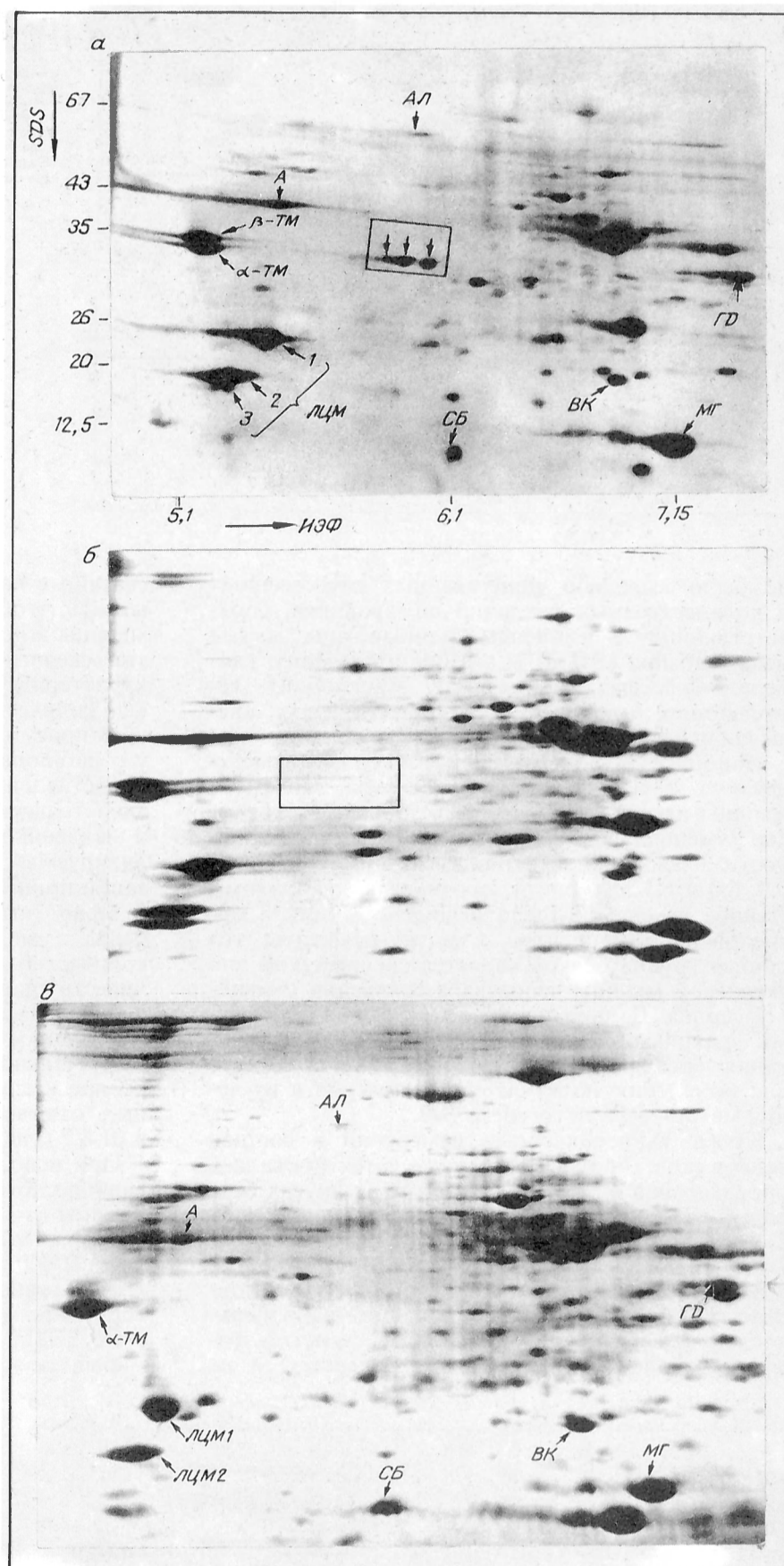
Методика. В работе использовали биоптаты скелетной мышцы от больных БАС и материал, полученный после операций по поводу травм (норма). Клиническая характеристика и виды анализируемых образцов скелетной мышцы представлены в таблице. До исследования образцы хранили при -70°C . Приготовление образцов для фракционирования двухмерным электрофорезом и фракционирование двухмерным электрофорезом по О'Фареллу с некоторыми модификациями проводили, как описано ранее [10]. В отдельной серии экспериментов изоэлектрофокусирование (ИЭФ) проводили в неравновесных условиях и прекращали при наборе 1700 В/ч. Визуализацию белков проводили окрашиванием гелей кумасси голубым R-250 [6]. Анализ распределения фракций на двухмерных электрофореграммах проводили визуально, используя модифицированный метод Каминга [2].

Результаты и обсуждение. При проведении сравнительного анализа белкового состава скелетной мышцы человека m. gastrocnemius в норме и биоптатов m. gastrocnemius и m. triceps, полученных от больных БАС, основные закономерности распределения белковых фракций на двухмерных электрофореграммах сохранялись постоянными.

На рис. 1 представлены двухмерные электрофореграммы белков миокарда и скелетной мышцы человека в норме ($n=5$) и при БАС ($n=8$) с обозначением некоторых из известных белков скелетной мышцы. Идентификация белков на двухмерных электрофореграммах основана на ко-электрофорезе белков скелетной мышцы и миокарда человека, ряд фракций которого ранее был идентифицирован посредством иммуноблоттинга, секвенирования белков и коэлектрофореза с чистыми препаратами белков [1]. При анализе

Рис. 1. Двухмерные электрофореграммы мышечных белков человека.

a—*m. gastrocnemius* в норме; *б*—*m. gastrocnemius* при БАС; *в*—миокард в норме с обозначениями некоторых из известных белков. Слева—значения молекулярных масс (в кД), соответствующие положению белков-стандартов; внизу—пределы значений градиента pH. *A*—актин; *АЛ*—альбумин; *ТМ*—тропомиозин; *МГ*—миоглобин; *ЛЦМ*—легкая цепь миозина; *ГД*—глицераль-3-фосфатдегидрогеназа; *ВК*— α -цепь В-кристаллина; *СБ*—белок, связывающий жирные кислоты. Белки, исчезающие при БАС (мол. м., кД/рI—35/5,9, 35/6,0, 35/6,1), отмечены стрелками и выделены квадратом.



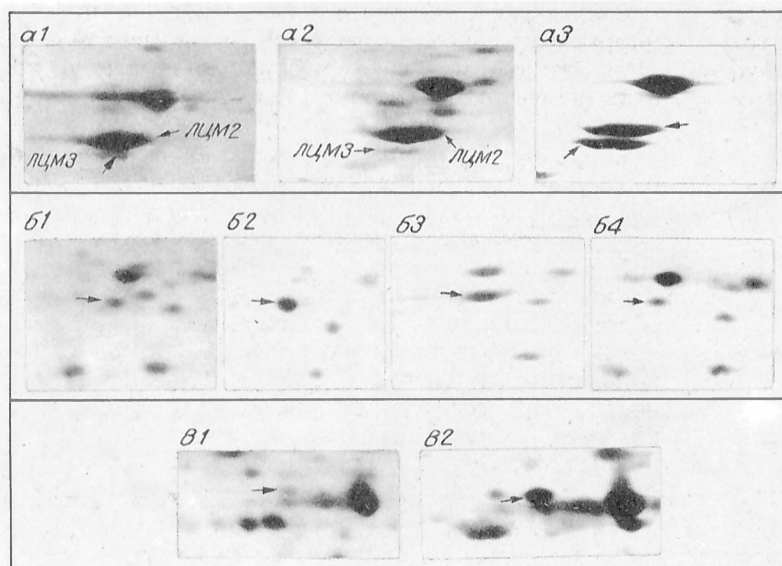


Рис. 2. Фрагменты двухмерных электрофореграмм с белками, имеющими изменения у больных БАС.

a—нормальная скелетная мышца, зона ЛЦМ; *a2*, *a3*—варианты изменений количественной представленности ЛЦМ 2 и 3 у разных больных; *b*—изменения представленности белка с мол. м. 29 кД (6,1; отмечен стрелкой); *b1*—норма, сердечная мышца; *b2*—норма, скелетная мышца; *b3*—БАС, промежуточный вариант между сердечной и скелетной мышцей; *b4*—БАС, сердечный тип представленности белка; *a*—изменения представленности белка с мол. м. 30 кД (6,7); *a1*—норма; *a2*—БАС.

не было выявлено существенных качественных и количественных различий во фракциях, соответствующих α - и β -цепям тропомиозина, легкой цепи миозина (ЛЦМ) 1, актину, альбумину, глицераль-3-фосфатдегидрогеназе, миоглобину, гемоглобину, α -цепи В-кристаллина и белку, связывающему жирные кислоты.

Наиболее специфичным и характерным изменением в составе белкового спектра скелетной мышцы при БАС явилось исчезновение или резкое уменьшение количественной представленности 3 белковых фракций с мол. м. 35 кД и рI 5,9, 6,0 и 6,1 (см. рис. 1, обозначены квадратом). Данное изменение было выявлено у всех 8 обследованных пациентов. Следует отметить, что данная группа белков является специфичной для скелетной мышцы человека в сравнении с мышцей сердца. Дальнейшая работа с этими белковыми фракциями, и в первую очередь их идентификация через секвенирование, представляет интерес для выявления молекулярных маркеров и изучения механизмов патогенеза БАС.

Кроме вышеописанных изменений в составе белков скелетной мышцы, также детектировалась определенная вариабельность в ряде других белковых фракций, в частности во фракциях ЛЦМ 2 и 3. У разных больных соотношение ЛЦМ 2 и 3 менялось как по сравнению с нормой, так и между собой (рис. 2, *a*), может быть обусловлено генетически детерминированной вариабельностью содержания разных типов скелетно-мышечных волокон (быстрых и медленных) и не

связано с патогенезом заболевания. Следует отметить, что в анализируемых образцах скелетной мышцы в норме обычно преобладает медленный тип скелетно-мышечных волокон, для которых характерны наличие ЛЦМ 1 и 2 и только следовые количества ЛЦМ 3. У больных БАС в 2 случаях присутствовал вариант, близкий к норме, но у 6 наблюдалась значительно более выраженная представленность ЛЦМ 3, что может служить свидетельством изменения количества быстрых и медленных скелетно-мышечных волокон в анализируемых мышцах и соответственно генерализации процесса.

Было также отмечено увеличение количества белка с мол. м. 29 кД (рI 6,1). У 4 больных количество данной фракции соответствовало количеству данного белка, представленного в мышце сердца человека, у 4 других сохранялось промежуточное количество между мышцей сердца и нормальной скелетной мышцей (рис. 2, *b*). Умеренное увеличение, варьирующее у разных больных, отмечено также для белка с мол. м. 30 кД и рI 6,7 (рис. 2, *b*).

При использовании в первом направлении неравновесного варианта ИЭФ образцов скелетной мышцы ($n=4$) в анализ попадает дополнительно ряд фракций белков с щелочными значениями рI (рис. 3). Количество одной из таких фракций оказалось резко увеличенным у 2 пациентов, и оно коррелировало с повышенной представленностью ЛЦМ 3, что, вероятно, сможет являться маркером генерализации процесса.

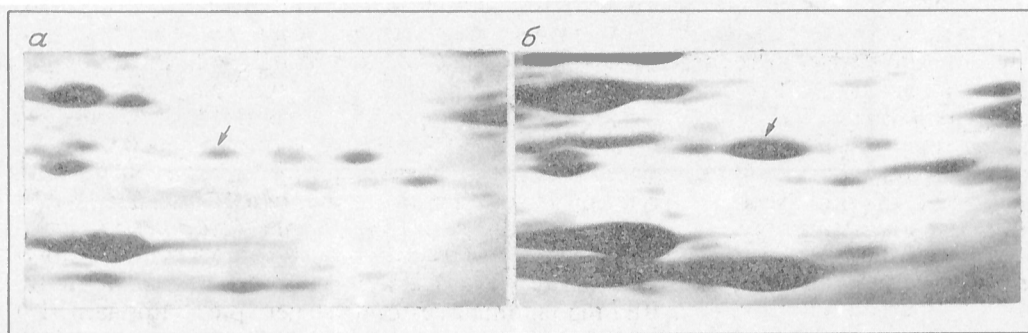


Рис. 3. Фрагмент двухмерной электрофореграммы белков скелетной мышцы.

Изменение количественной представленности белка с мол. м. 25 кД, детектируемого при неравновесном варианте ИЭФ (отмечен стрелкой). *a*—норма; *b*—БАС.

Таким образом, из анализируемого спектра белков скелетной мышцы при БАС отмечаются изменения не более чем в 5% из них, и только изменения одной группы явились специфическими при БАС.

Работа выполнена при финансовой поддержке ГНТП «Приоритетные направления генетики» (грант 6.53).

ЛИТЕРАТУРА

1. Лантев А. В., Шишкин С. С., Егоров И. А. и др. // Молекул. биол.—1994.—Т. 28, № 1.—С. 13—16.
2. Пуляева Е. В., Ковалев Л. И., Цветкова М. И. и др. // Биохимия.—1990.—Т. 55.—С. 489—498.
3. Хондакарпан О. А., Бунина Т. Л., Завалишин И. А. Боковой амиотрофический склероз.—М., 1978.
4. Шишкин С. С., Калинин В. Н. Медицинские аспекты биохимической и молекулярной генетики.—М., 1992.
5. Celis J. E., Bravo R. Two-Dimensional Gel Electrophoresis of Proteins. Methods and Applications.—New York, 1984.
6. Fairbanks G., Steck T. L., Wallach F. H. // Biochemistry (Wash.).—1971.—Vol. 10.—P. 2606—2617.
7. McKusick V. A. Mendelian Inheritance in Man: Catalog of Autosomal Dominant, Autosomal Recessive and X-Linked Phenotypes.—8-th Ed.—Baltimore, 1988.
8. Rosen D. P., Siddique T., Patterson D. // Nature.—1993.—Vol. 362.—P. 59—62.
9. Strong M. J., Hudson A. J., Alford W. G. // Canad. J. neurol. Sci.—1991.—Vol. 18, № 3.—P. 45—88.
10. Tsvetkova M. N., Kovalev L. I., Laptev A. V. et al. // Electrophoresis.—1991.—Vol. 12, № 3.—P. 576—578.

Поступила 21.07.93

PROTEIN COMPOSITION OF HUMAN SKELETAL MUSCLE IN LATERAL AMYOTROPIC SCLEROSIS

L. I. Kovalev, A. I. Khudaydatov, M. A. Galyuk, S. S. Shishkin, A. S. Niyazbekova, I. N. Gelashvili, I. A. Zavalishin

Medico-Genetic Research Centre, Institute of Neurology, Russian Academy of Medical Sciences, Moscow

Protein composition of human skeletal muscle impaired with lateral amyotrophic sclerosis was studied by means of two-dimensional electrophoresis. Some protein fractions were altered. Characteristic property of all the preparations studied proved to be disappearance of three protein fractions of 35 kDa molecular mass and with pI 5.9, 6.0 and 6.1.

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 1994

УДК 616.379-008.64-07: 616.155.1-008.931

Н. И. Шоно, С. Э. Рабинович, Л. В. Платонова, Т. Г. Джозева

ДВЕ ФОРМЫ АЛЬДОЗОРЕДУКТАЗЫ В ЭРИТРОЦИТАХ БОЛЬНЫХ ИНСУЛИНЗАВИСИМЫМ САХАРНЫМ ДИАБЕТОМ

Московская медицинская академия им. И. М. Сеченова

Альдозоредуктаза (альдитол: NADP^+ -оксидоредуктаза, АР; К.Ф. 1.1.1.21) катализирует реакцию восстановления глюкозы до многоатомного спирта сорбитола, используя в качестве второго субстрата восстановленную форму NADP . Эта реакция является началом так называемого сорбитолового пути утилизации глюкозы в организме человека и животных [11]; второй реакцией является окисление сорбитола во фруктозу, катализируемое вторым ферментом данного пути — L-сорбитолдегидрогеназой (К.Ф. 1.1.1.14) [19].

В физиологических условиях скорость функционирования сорбитолового пути незначительна [10]. Однако при диабете интенсивность этого пути значительно возрастает. Особенно это касается инсулиннезависимых тканей, поскольку проникновение в них глюкозы определяется уровнем гликемии и не зависит от инсулина. При этом инсулиннезависимые ткани способны утилизировать до 30% всей глюкозы, потребляемой клеткой [19].

Рядом авторов показано увеличение уровня сорбитола и фруктозы при сахарном диабете у человека в эритроцитах, хрусталике, спинномозговой жидкости, нервах [3, 8, 10, 13]. Неспособность этих соединений диффундировать через клеточную мембрану является биохимической основой развития ряда осложнений сахарного диабета: катарактогенеза, ретинопатии, полинейропатии и нефропатии [10, 13].

АР является ключевым ферментом сорбитолового пути, определяющим скорость его функционирования [10]. Этот фермент обнаружен практически во всех инсулиннезависимых тканях человека и животных: мозге, нервах, аорте, эритроцитах, плаценте, хрусталике, почках и мышцах, откуда он к настоящему времени выделен и очищен практически до гомогенного состояния [8, 9, 12—16, 20]. Достаточно хорошо изучены физико-химические и кинетические свойства АР. Однако работ, касающихся свойств и функционирования АР при сахарном диабете, очень мало. Известно, что в условиях гипергликемии происходит активация АР в эритроцитах человека [18], однако детального исследования этого факта не проведено. Поэтому изучение свойств АР у больных сахарным диабетом является достаточно актуальной задачей.

В качестве источника для исследования данного фермента у больных сахарным диабетом как наиболее удобного объекта нами были выбраны эритроциты, представляющие собой пример инсулиннезависимой ткани.

Целью настоящей работы являлось изучение свойств АР в эритроцитах больных инсулинзависимым сахарным диабетом (ИЗСД) в сравнении со свойствами этого фермента у здоровых лиц.

Методика. В работе использовали эритроциты здоровых доноров (контроль) и больных ИЗСД различной тяжести.

Обследовано 14 здоровых лиц и 12 больных ИЗСД в возрасте от 18 до 52 лет с длительностью заболевания от 6 мес до 22 лет. Доза получаемого инсулина составила от 0,55 до 0,80 Ед/кг, величина суточной гликемии — 5,11—15,8 мМ. У всех больных течение заболевания сопровождалось микроангиопатиями различной локализации.

Свежую гепаринизированную кровь, собранную натощак, центрифугировали 10 мин при 3000 g. Далее все операции проводили при 4° С. Осажденные эритроциты трижды промывали в 5 объемах буферного раствора, состоящего из 1 объема 0,1 М калий-фосфатного буфера pH 7,4 и 9 объемов физиологического раствора. Отмытые эритроциты гемолизировали в 4 объемах 0,01 М калий-фосфатного буфера pH 6,2, содержащего 5 мМ β -меркаптоэтанол (буфер А), и диализовали против 100 объемов буфера А в течение ночи. Диализованный гемолизат центрифугировали 1 ч

при 10 000 g. Супернатант наносили на колонку (1,5 × 30 см) с ДЭАЭ-целлюлозой (ДЭ-52), предварительно уравновешенной буфером А. Для освобождения от посторонних белков, включая гемоглобин, колонку промывали 10 объемами буфера А. АР элюировали 30 мМ NaCl в буфере А, альдегидредуктазу II — 100 мМ NaCl в том же буфере. Контроль за выходом ферментов с колонки осуществляли по их активностям.

Во фракциях, полученных при элюции, количество белка оценивали по оптической плотности при 280 нм, а содержание гемоглобина — по оптической плотности при 415 нм.

Активность АР определяли по скорости окисления NADPH при 340 нм при 37° С. Реакцию проводили в 0,01 М калий-фосфатном буфере pH 6,2 непосредственно в кювете спектрофотометра. Инкубационная смесь объемом 2 мл содержала 10 мМ D-глюкозы или D, L-глицеральдегида, 0,1 мМ NADPH, 0,4 М (NH₄)₂SO₄, 5 мМ β-меркаптоэтанол и соответствующее количество фермента. Реакцию начинали добавлением субстрата. В качестве контроля использовали смесь, содержащую все компоненты, кроме фермента. За единицу ферментативной активности принимали такое количество фермента, которое катализирует окисление 1 мкмоль NADPH за 1 мин. Удельную активность выражали в единицах активности, отнесенных к величине оптической плотности при 280 нм.

Активность альдегидредуктазы II также определяли в 0,01 М калий-фосфатном буфере pH 6,2, содержащем 15 мМ D-глюкуроната натрия, 0,1 мМ NADPH и соответствующее количество фермента, объем реакционной смеси 2 мл. За единицу ферментативной активности принимали количество фермента, катализирующее окисление 1 мкмоль NADPH за 1 мин при 37° С.

Гликозилированный гемоглобин (Hb A_{1c}) определяли методом аффинной хроматографии при использовании в качестве сорбента борфенилагарозы [5].

Кинетические константы K_m и V_{max} рассчитывали, используя метод Лайнуивера — Берка.

Статистическую обработку результатов проводили на микрокалькуляторе МК-54 с использованием статистических программ [4].

В работе использовали ДЭАЭ-целлюлозу (ДЭ-52, «Whatman», Англия), D-глюкозу («Reanal», Венгрия), D, L-глицеральдегид («Sigma», США), NADPH («Reanal», Венгрия), D-глюкуронат натрия («Sigma», США), β-меркаптоэтанол («Aldrich», США). Остальные реактивы отечественного производства.

Результаты и обсуждение. Для изучения свойств и кинетических характеристик АР нами был использован фермент, выделенный и частично очищенный из эритроцитов доноров и больных ИЗСД. Одной из целей частичной очистки фермента являлась необходимость его освобождения из избытка гемоглобина, так как определять активность АР непосредственно в гемолизате эритроцитов не представляется возможным. Это связано с неферментативным взаимодействием гемоглобина с одним из субстратов реакции — D-глюкозой или D, L-глицеральдегидом в присутствии NADPH [7]. Для отделения АР от гемоглобина и других посторонних белков использо-

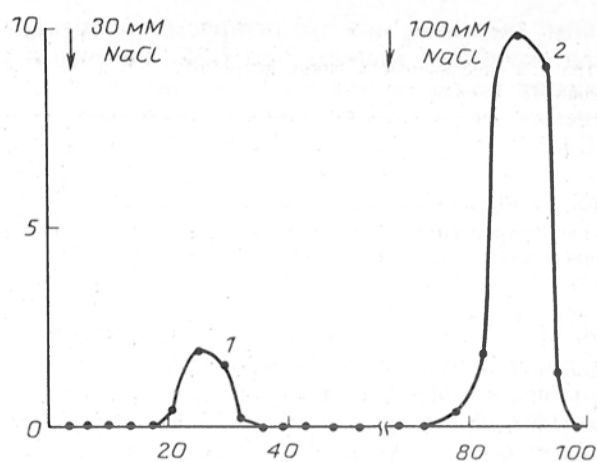


Рис. 1. Профиль элюции с ДЭАЭ-целлюлозы АР и АР II из эритроцитов доноров.

1 — пик активности АР; 2 — пик активности АР II. По оси ординат — величина ферментативной активности (в мЕ); по оси абсцисс — объем элюата (в мл).

вали ионообменную хроматографию на ДЭАЭ-целлюлозе [15]. После элюции АР с ионообменника в растворе фермента остается незначительное количество гемоглобина, которое не влияет на ход ферментативной реакции [8].

Из данных литературы известно, что при элюции АР из гемолизата эритроцитов с ДЭАЭ-целлюлозы буферами различной ионной силы наряду с данным ферментом элюируется также другой фермент из группы оксидоредуктаз — альдегидредуктаза II (L-гексонатдегидрогеназа, АР II; К.Ф.1.1.1.2), близкий по своим свойствам к истинной АР [15]. При этом АР и АР II элюируются растворами разной ионной силы — АР при 28 мМ NaCl, а АР II при 43 мМ NaCl [8].

На рис. 1 показан типичный профиль элюции АР и АР II с ДЭАЭ-целлюлозы из эритроцитов донора. При этом первый пик активности при использовании в качестве субстрата D, L-глицеральдегида обнаружен при элюции с целлюлозы буфером А, содержащим 30 мМ NaCl, а второй пик — тем же буфером, содержащим 100 мМ NaCl. Местонахождение пиков активности и последовательность их элюции с целлюлозы, по данным литературы [8]: АР — первый пик, АР II — второй пик.

Для подтверждения правильности этого утверждения проведено сравнение субстратной специфичности ферментов первого и второго пиков активности. Так, скорость реакции АР II с D-глюкуроновой кислотой, своим природным субстратом [10], почти в 2 раза превышает таковую для реакций этого фермента с D-глюкозой и D, L-глицеральдегидом. И наоборот, активность АР при использовании в качестве субстрата D-глюкуроновой кислоты более чем в 2 раза ниже активности данного фермента с D, L-глицеральдегидом. Полученные результаты согласуются с данными литературы [8].

Таким образом, основываясь на результатах субстратной специфичности АР и АР II (табл. 1), можно заключить, что первый пик активности действительно принадлежит АР, а второй — АР II. При этом обратим внимание на то, что нами не обнаружено АР-активности в растворах, полученных как в результате промывания колонки буфером А после нанесения гемолизата эритро-

Таблица 1

Субстратная специфичность пиков активности АР и АР II из эритроцитов доноров

Субстрат	Относительная активность, %	
	АР	АР II
D, L-глицеральдегид	100	100
D-глюкуроновая кислота	42	194
D-глюкоза	34	91

цитов, так и при элюции фермента данным буфером, содержащим менее 30 мМ NaCl.

В своих дальнейших исследованиях мы остановились только на изучении АР, и все последующие результаты относятся только к этому ферменту.

Нами была исследована АР из эритроцитов 14 здоровых лиц и 12 больных ИЗСД с различной длительностью и степенью тяжести заболевания, сопровождающегося ангиопатическими осложнениями.

На рис. 2 приведены профили элюции АР с ДЭ-АЭ-целлюлозы из эритроцитов доноров и больных ИЗСД. При элюции фермента с колонки у всех доноров (см. рис. 2, а) выявлялся один пик активности АР, имеющий следующие кинетические параметры: K_m 3—4 мМ, V_{max} $4,38 \pm 0,6$ мЕ/Д₂₈₀ (табл. 2) при использовании D-глюкозы в качестве субстрата, что соответствует данным литературы [16].

Результаты элюции АР у больных ИЗСД оказались неоднозначными. Так, у 1-й группы больных

Таблица 2

Кинетические характеристики АР из эритроцитов больных ИЗСД и доноров

Обследованные лица	Форма а		Форма б	
	V_{max} , мЕ/Д ₂₈₀	K_m , мМ	V_{max} , мЕ/Д ₂₈₀	K_m , мМ

Больные:

1-я группа (n=5)	16,7 ± 3,2	6,5—19,0	—	—
2-я группа (n=7)	13,8 ± 2,4	7,0—15,0	4,59 ± 0,6	4,0
Доноры (n=14)	—	—	4,38 ± 0,6	3,0—4,0

(n=5) АР проявлялась в виде одного пика активности (см. рис. 2, б), не совпадающего по месту выхода с колонки с пиком активности АР у доноров (элюция буфером А, содержащим 30 мМ NaCl). У 2-й группы больных ИЗСД (n=7) АР выявлялась в виде двух пиков активности (см. рис. 2, в), один из которых полностью совпадал с пиком активности у доноров, а другой соответствовал единственному пику активности, обнаруженному у больных 1-й группы.

Для характеристики полученных форм АР нами определены их кинетические параметры (см. табл. 2). Из табл. 2 видно, что форма АР, совпадающая по месту выхода с колонки с формой у донора, характеризуется величинами кинетических параметров, близких к таковым для АР из эритроцитов доноров. Форма АР, отличная от фермента у доноров, имеет более низкое сродство к субстрату и более высокую максимальную скорость по сравнению с таковыми у фермента доноров и формы фермента у больных, совпадающей с ферментом у доноров.

Форма фермента, имеющая большую максимальную скорость и отличная от формы фермента донора, условно названа нами формой а; форма фермента у доноров и совпадающая с ней форма фермента у больных, имеющие меньшую V_{max} , названы нами формой б.

Для объяснения наличия только одной формы АР (а) или двух форм (а и б) у обследованных больных проанализировано состояние углеводного обмена по величине гликозилированного гемоглобина (HbA_{1c}), являющегося интегральным показателем уровня гликемии, отражающим ее длительный устойчивый характер, определяемый временем полужизни эритроцита (120 дней) [6]. Проведенный анализ показал, что у больных с наличием только одной формы АР величина HbA_{1c} составляла $145,6 \pm 0,69\%$, тогда как у больных 2-й группы с двумя формами АР данная величина равнялась $11,5 \pm 0,4\%$ ($p < 0,05$). Значение HbA_{1c} у больных 1-й группы отражает глубокие нарушения в углеводном обмене, указывая на его декомпенсированный характер, тогда как уровень HbA_{1c} у больных 2-й группы свидетельствует о более компенсированном состоянии углеводного обмена, чем у больных 1-й группы [1].

Таким образом, полученные результаты позволяют сделать вывод, что наличие только одной формы фермента (а) наблюдается у больных ИЗСД с тяжелой формой течения заболевания, для которой характерно более интенсивное функционирование сорбитолового пути [10], а следовательно, и развитие ряда диабетических ангиопатий [2]. Вместе с тем присутствие наряду

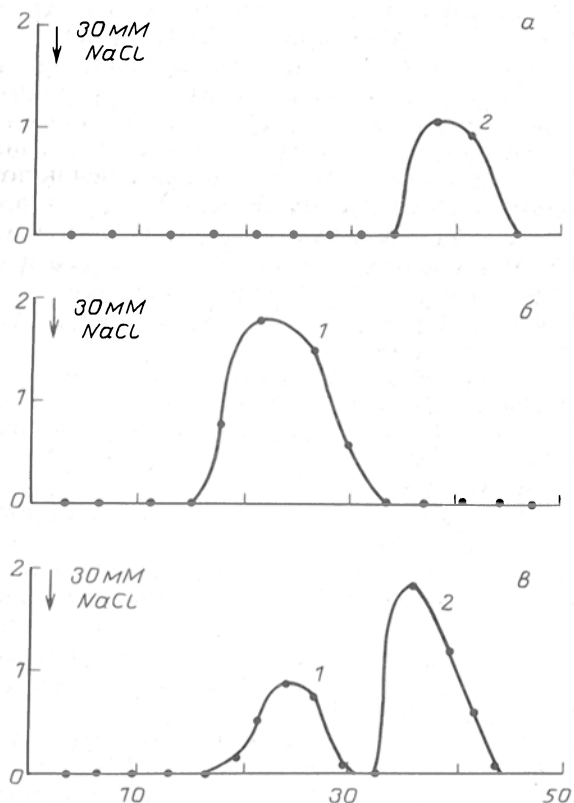


Рис. 2. Профили элюции с ДЭАЭ-целлюлозы АР из эритроцитов доноров и больных ИЗСД.

а — донор; б — больной Я. (из 1-й группы); в — больной Н. (из 2-й группы). По оси ординат — величина ферментативной активности (в мЕ); по оси абсцисс — объем элюата (в мл). 1 — форма а; 2 — форма б.

с формой а также и формы б АР характерно для более стабильного, компенсированного течения заболевания, при котором функционирование сорбитолового пути, возможно, менее интенсивно, чем у больных ИЗСД 1-й группы.

Как видно из табл. 2, различие в величинах K_m для форм а и б АР выражается в более низком сродстве к субстрату формы а фермента, что свидетельствует о возможности функционирования этой формы фермента в условиях гипергликемии при сахарном диабете. С другой стороны, высокая V_{max} формы а по сравнению с формой б указывает на более интенсивное течение сорбитолового пути у больных ИЗСД по сравнению с донорами.

Как было отмечено выше, из литературы известен факт активации АР из эритроцитов больных сахарным диабетом и увеличения скорости накопления сорбитола в этих клетках [17, 18]. Однако в этих работах не было продемонстрировано разделение обнаруженных нами двух форм фермента хроматографическим способом.

Таким образом, можно предположить, что наличие формы а АР в эритроцитах больных ИЗСД является причиной усиления функционирования сорбитолового пути в инсулиннезависимых тканях при данном заболевании. В связи с этим представляет большой интерес механизм появления формы а АР, что является предметом наших дальнейших исследований.

ЛИТЕРАТУРА

1. Гришину М. П., Галенок В. А., Мазовецкий А. Г., Диккер В. У. // Лаб. дело.—1988.—№ 2.—С. 51—54.
2. Ефимов А. С. Диабетические ангиопатии.—М., 1989.
3. Иванов Ю. И., Погорелюк О. И. Статистическая обработка результатов медико-биологических исследований на микрокалькуляторах по программам.—М., 1990.
4. Питкелен И. // Проблемы клинической энзимологии.—Ужгород, 1989.—С. 111—112.
5. Рабинович С. Э., Платонова Л. В., Дюжева Т. Г. // Вопр. мед. химии.—1993.—№ 5.—С. 18—21.
6. Торосян Ф. Г., Титов В. И., Мазовецкий А. Г., Заводский П. С. // Лаб. дело.—1988.—№ 8.—С. 3—8.
7. Buettler E., Guihlo E. // J. clin. Invest.—1974.—Vol. 53.—P. 1258—1264.
8. Das B., Srivastava S. K. // Arch. Biochem.—1985.—Vol. 238, № 2.—P. 670—679.
9. Das B., Song P. H., Ansari N. H. et al. // Lens. Res.—1988.—Vol. 4, № 4.—P. 309—335.
10. Gabbay K. H. // Ann. Rev. Med.—1975.—Vol. 26.—P. 521—536.
11. Hers H. G. // Biochim. biophys. Acta.—1960.—Vol. 37.—P. 137.
12. Kador P. F., Carper D., Kinoshita J. H. // Analyt. Biochem.—1981.—Vol. 114.—P. 53—58.
13. Kador P. F. // Med. Res. Rev.—1988.—Vol. 8, № 3.—P. 325—352.
14. Shioh T., Sato S., Raddy V. N. et al. // Enzymology and Molecular Biology of Carbonyl Metabolism.—New York, 1987.—P. 317—324.
15. Srivastava S. K., Ansari N. H., Hair G. A., Das B. // Biochim. biophys. Acta.—1984.—Vol. 200.—P. 220—227.
16. Srivastava S. K., Das B. H., Awasthi R. W. et al. // Ibid.—1985.—Vol. 840.—P. 334—343.
17. Srivastava S. K., Hair G. A., Das B. // Proc. nat. Acad. Sci. USA.—1985.—Vol. 82.—P. 7222—7226.
18. Srivastava S. K., Ansari N. H., Hair G. A. et al. // Biochim. biophys. Acta.—1986.—Vol. 870.—P. 302—311.
19. Taylor R., Agius L. // Biochem. J.—1988.—Vol. 250, № 3.—P. 625—640.
20. Terubayashi H., Sato S., Nishimura C. et al. // Kidney int.—1989.—Vol. 36.—P. 843—851.

TWO FORMS OF ALDOSE REDUCTASE IN THE ERYTHROCYTES OF PATIENTS WITH INSULIN-DEPENDENT DIABETES MELLITUS

N. I. Shono, S. E. Rabinovich, L. V. Platonova, T. G. Dyuzheva

I. M. Sechenov Medical Academy, Moscow

Erythrocytes of patients with insulin-dependent diabetes mellitus contained two forms of aldose reductase *a* and *b* (EC No. 1.1.1.21) (the key enzyme in the sorbitol pathway of glucose utilization) as compared with those of healthy donors in whom the form *b* of the enzyme was only found. The aldose reductase *a* exhibited a higher maximal rate ($V_{max} = 16.7 \pm 3.2$ IU/D₂₈₀) and a lower substrate affinity ($K_m = 6.5 \pm 19$ mM) than the enzyme *b*, $V_{max} = 43.8 \pm 0.6$ IU/D₂₈₀, $K_m = 3.0 \pm 4.0$ mM, respectively. More severe development of the disease was observed in the patients whose erythrocytes contained only aldose reductase *a* (HbA_{1c} = $14.56 \pm 0.69\%$) as compared with those in whom the enzyme *a* and *b* were found (HbA_{1c} = $11.5 \pm 0.4\%$). Kinetic parameters of the enzyme showed that aldose reductase *a* may be active in hyperglycemia of diabetes mellitus, thus contributing to intensification of the sorbitol pathway in these patients.

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 1994

УДК 616.24-006.6-07:616.153.915

Б. С. Хышиктеев, Н. А. Хышиктеева,
В. Н. Иванов, С. Д. Даренская, С. В. Новиков

ЖИРНОКИСЛОТНЫЙ СОСТАВ ЛИПИДОВ ПЛАЗМЫ КРОВИ И ЭРИТРОЦИТОВ У БОЛЬНЫХ РАКОМ ЛЕГКОГО

Читинский медицинский институт

Метаболизму жирных кислот (ЖК) в промоции, развитии и проявлениях злокачественных опухолей начали придавать немалое значение лишь в последние годы [2, 8]. Вместе с тем в отдельных исследованиях установлены механизмы цитотоксичности незаменимых ЖК, включая модификацию мембран опухолевых клеток, изменение метаболизма простагландинов и продуктов липоксигеназных ферментов, а также активности перекисного окисления липидов, в отношении злокачественных клеток [10].

Учитывая вышесказанное и то обстоятельство, что легкие играют одну из ведущих ролей в обмене липидов [7], мы решили изучить их состав в плазме крови и мембранах эритроцитов у больных раком легкого.

Методика. Нами обследовано 47 больных раком легкого в возрасте от 38 до 62 лет, из них 32 пациента с центральной локализацией опухоли и 15 — с периферической. Контролем служили 12 практически здоровых людей в возрасте от 35 до 60 лет. Кровь забирали из вены после 10—12 ч голодания.

Липиды из плазмы и эритроцитов экстрагировали методом [9]. Метилирование ЖК осуществляли по методу [6]. Метилловые эфиры очищали в тонких слоях силикагеля в хроматографической системе гексан — диэтиловый эфир — ледяная уксусная кислота (90:10:1 по объему), затем экстрагировали их смесью хлороформ — метанол (8:1) и анализировали на газожидкостном хроматографе «Chrom-4» (Чехия) с пламенно-ионизационным детектором. В работе использовали металлические колонки, наполненные 3% Silar 10С на «Chromasorb-N-AW» (80—100 меш) фирмы «Serva» (Германия). Разделение выполняли в изотермическом режиме работы термостата колонок

Поступила 02.06.93

при 176° С, температура инжектора 250° С. Скорость потока газа-носителя (азот) 20 мл/мин. Калибровку прибора проводили с помощью стандартных смесей метиловых эфиров ЖК. Обсчет и идентификацию пиков проводили с помощью программно-аппаратного комплекса «Мультихром-1» с использованием IBM/PC/AT.

Результаты обработаны на компьютере методом вариационной статистики пакетом «Statgraf», достоверность различий оценивали по критерию Стьюдента.

Результаты и обсуждение. Состав ЖК плазмы крови и мембран эритроцитов обследованных больных приведен соответственно в табл. 1 и 2.

Изменений в соотношении суммы насыщенных и ненасыщенных кислот плазмы при обеих формах рака выявлено не было. Однако наблюдалось некоторое падение уровня стеариновой кислоты на 30,2% ($p < 0,05$) у больных с центральной локализацией опухоли и на 34,0% ($p < 0,05$) — с периферической. Весьма интересным представляется появление при данной патологии в составе липидов плазмы крови C19:0 (нонадекановой) кислоты, которая в норме отсутствовала.

Среди непредельных ЖК у больных обеих групп происходил сдвиг в сторону моноеновых кислот за счет значительного роста доли олеиновой кислоты, которая составляла 162,5% ($p < 0,05$) и 153,6% ($p < 0,05$) от контрольных цифр соответственно при центральном и периферическом раке легкого. Дефицит полиненасыщенных ЖК складывался из-за снижения доли C18:2ω6 в среднем на 17,0% ($p < 0,05$) в обеих группах пациентов, C18:3ω3 и C20:3ω9 при нормальном содержании C20:4ω6. Анализируя полученные сдвиги, можно сказать, что при злокачественных новообразованиях легких усиливается метаболизация жирных кислот семейства ω6, т. е. C18:2ω6 активно используется для синтеза арахидоновой кислоты. Последняя может включаться в процессы как ферментативного (с генерацией простагландинов), так и неферментативного перекисного окисления липидов, интенсивность которого при онкологических заболеваниях повышается [3—5].

Данные табл. 2 о составе липидов мембран эритроцитов свидетельствуют о несколько иной

Таблица 2

Жирнокислотный состав (в %) липидов эритроцитарных мембран у больных раком легкого

Кислоты	Контроль	Центральный рак	Периферический рак
C12:0	0,30 ± 0,08	0,33 ± 0,06	0,18 ± 0,04
C14:0	1,21 ± 0,13	1,04 ± 0,16	0,85 ± 0,23
C15:0	1,89 ± 0,42	0,44 ± 0,05*	0,35 ± 0,08*
C15:1	1,61 ± 0,14	1,12 ± 0,16	0,86 ± 0,20
C16:0	28,05 ± 1,75	21,81 ± 0,81*	22,49 ± 0,86*
C16:1	2,57 ± 0,36	3,15 ± 0,52	2,74 ± 0,59
C17:0	1,29 ± 0,27	0,34 ± 0,09*	0,28 ± 0,08*
C17:1	0,74 ± 0,13	1,18 ± 0,25	0,88 ± 0,23
C18:0	14,93 ± 0,62	13,87 ± 0,44	14,74 ± 0,66
C18:1	14,77 ± 0,79	18,60 ± 0,48*	19,30 ± 1,90*
C18:2	9,85 ± 0,91	11,37 ± 0,76	10,06 ± 0,45
C18:3	0,59 ± 0,14	1,83 ± 0,51	1,58 ± 0,49
C19:0	2,83 ± 0,81	11,70 ± 1,09*	10,05 ± 1,40*
C20:3	0,89 ± 0,16	1,09 ± 0,31	0,69 ± 0,22
C20:4	15,80 ± 0,63	10,18 ± 0,79*	10,40 ± 1,17*
C20:5	2,68 ± 0,70	1,96 ± 0,57	3,65 ± 1,23
Насыщенные	50,50 ± 1,96	49,53 ± 1,64	49,84 ± 1,65
Ненасыщенные	49,50 ± 1,35	50,47 ± 1,03	50,16 ± 1,94
Моноеновые	19,69 ± 0,54	24,05 ± 0,62*	23,78 ± 0,87*
Полиеновые	29,81 ± 1,07	26,42 ± 0,86*	26,38 ± 1,14*

картине сдвигов, чем наблюдаемая нами в плазме крови. Однако и в первом, и во втором случае соотношение насыщенных и ненасыщенных ЖК оставалось на уровне контрольных значений и различий между формами рака не выявлялось. Среди предельных кислот снижался уровень C16:0 на 22,2% ($p < 0,05$) при центральном раке легкого и на 20,8% ($p < 0,05$) — при периферическом. Представляют интерес изменения в составе насыщенных ЖК с четным числом атомов углерода: содержание C15:0 и C17:0 заметно уменьшалось, а C19:0 — увеличивалось (в среднем в 4 раза). Следовательно, происходит усиление синтеза нонадекановой кислоты из более низкомолекулярных предшественников. Этот факт можно объяснить следующим: во-первых, ввиду дефицита полиненасыщенных ЖК (см. ниже) как компенсаторную реакцию поддержания мембран в жидкокристаллическом состоянии, в результате чего происходит усиление синтеза кислот с четным числом атомов углерода, так как последние обладают более низкой способностью углеводородных цепей упаковываться в кристаллы [1]; во-вторых, по всей вероятности, при злокачественных процессах происходит перестройка метаболических путей на активное использование пропионата, который является субстратом не только для синтеза ЖК с четным числом атомов углерода, но и для образования аминокислот (глутамата, аспартата, глутамина), азотистых оснований фосфолипидов [1]. Отсюда происходит и появление в составе липидов плазмы C19:0. Подобные отклонения в жирнокислотном спектре у больных со злокачественными опухолями мы в литературе не обнаружили.

Изменения в ненасыщенных ЖК характеризовались накоплением моноеновых за счет роста доли C18:1 и падением уровня полиеновых кислот, который возникал только благодаря дефициту C20:4. Снижение содержания этой кислоты в мембранных структурах свидетельствует об ее интенсивном использовании в свободнорадикальных реакциях.

Таким образом, сдвиги, происходящие в составе липидов плазмы крови и мембран эритроцитов

Таблица 1

Жирнокислотный состав (в %) липидов плазмы крови у больных раком легкого

Кислоты	Контроль	Центральный рак	Периферический рак
C14:0	1,79 ± 0,13	1,10 ± 0,14	0,96 ± 0,20
C16:0	23,05 ± 1,43	23,35 ± 0,48	24,43 ± 0,92
C16:1	3,57 ± 0,20	3,55 ± 0,22	3,51 ± 0,50
C18:0	12,41 ± 0,62	8,66 ± 0,33*	8,19 ± 0,39*
C18:1	17,75 ± 0,70	28,84 ± 0,70*	27,26 ± 1,06*
C18:2	31,60 ± 1,03	25,54 ± 0,92*	26,60 ± 2,03*
C18:3	1,66 ± 0,18	0,52 ± 0,16*	0,42 ± 0,11*
C19:0	—	1,98 ± 0,36*	2,05 ± 0,26*
C20:3	1,77 ± 0,19	0,80 ± 0,15*	0,48 ± 0,12*
C20:4	6,43 ± 0,42	5,66 ± 0,39	6,10 ± 1,67
Насыщенные	37,22 ± 1,08	35,09 ± 0,95	35,63 ± 0,82
Ненасыщенные	62,78 ± 1,22	64,91 ± 1,17	64,37 ± 2,35
Моноеновые	21,32 ± 0,73	32,39 ± 0,79*	30,77 ± 1,13*
Полиеновые	41,46 ± 1,56	32,52 ± 1,34*	33,60 ± 2,78*

Примечание. Здесь и в табл. 2 звездочка — различия достоверны по сравнению с контролем.

у больных раком легкого, носят разнонаправленный характер и не зависят от клинико-анатомической формы. Некоторая специфичность легочной локализации опухоли проявляется в отношении ЖК с четным числом атомов углерода.

ЛИТЕРАТУРА

1. Алимova Е. К., Аствацатурьян А. Т. // Укр. биохим. журн.—1984.—№ 3.—С. 309—317.
2. Заридзе Д. Г., Шевченко В. Е., Левчук А. А., Лифанова Е. Е. // Вopr. онкол.—1990.—№ 12.—С. 1442—1448.
3. Кальнова Н. Ю. // Там же.—1989.—№ 7.—С. 795—801.
4. Морозкина Т. С. Энергетический обмен и питание при злокачественных новообразованиях.—Минск, 1989.
5. Сидорик Е. П., Баглей Е. А., Данко М. И. Биохимилонисценция клеток при опухолевом процессе.—Киев, 1989.
6. Ситяк К. М., Оргель М. Я., Крук В. И. // Лаб. дело.—1976.—№ 1.—С. 37—41.
7. Сыромятникова Н. В., Гончарова В. А., Котенко В. В. Метаболическая активность легких.—Л., 1987.
8. Eynard A. R., Quiroga P., Silva R. // Cell Biol. int. Rep.—1989.—№ 9.—Р. 813—814.
9. Folch J., Lees M., Sloane-Stanley A. G. II. // J. biol. Chem.—1957.—Vol. 226.—Р. 497—509.
10. Norrobin D. F. // Carcinogenesis and Dietary Fat.—Boston, 1989.—Р. 247—262.

Поступила 29.03.92

FATTY ACID COMPOSITION OF BLOOD PLASMA AND ERYTHROCYTES IN PATIENTS WITH LUNG CANCER

B. S. Khyshiktuev, N. A. Khyshiktueva, V. N. Ivanova,
S. D. Darenskaya, S. V. Novikov

Medical Institute, Chita

The fatty acid spectrum of blood plasma and erythrocytic membrane lipids were studied in 47 patients with lung cancer. The changes in the plasma and erythrocyte fatty acid composition were found to be identical irrespective of the clinical cancer form. In blood plasma of these patients with lung cancer, a decrease in the level of polyunsaturated fatty acids was observed with the normal levels of arachidonic acid and the proportion of monoenic fatty acids was increased. Changes in the lipid composition of erythrocyte membranes were characterized by less pronounced polyunsaturated fatty acid deficiency than that in the plasma, which accompanied by decreases in arachidonic acid levels. The appearance of significant levels of nonadecanoic acid also seems striking.

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 1994

УДК 618.19-006.6-008.939.15-07

Ю. А. Блюдзин, Т. А. Липатова, Т. И. Опарина

ЖИРНОКИСЛОТНЫЙ СОСТАВ ОТДЕЛЬНЫХ ФРАКЦИЙ ЛИПИДОВ ОПУХОЛЕВОЙ ТКАНИ ПРИ РАКЕ МОЛОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ

Санкт-Петербургский университет, НИИ экспериментальной медицины РАМН, Санкт-Петербург

Развитие злокачественной опухоли сопровождается существенными изменениями метаболизма липидов как в самой опухоли, так и во всем организме. При этом нарушаются липопротеидный спектр крови, липидный и жирнокислотный состав подкожной клетчатки [5]. Вместе с тем показано, что существует и обратная связь между состоянием липидного обмена организма и канцерогенезом. Диета, богатая полиненасыщенными жирными кислотами, стимулировала развитие опухолей различных органов у экспериментальных животных [7, 12], тогда как антиоксиданты, в частности витамины А и Е, обладали антикан-

церогенной активностью [8]. Установлено, что определенные изменения происходят и в липидном составе самой опухолевой ткани. Четко показано, например, «эффект выравнивания» в распределении различных фосфолипидов (ФЛ) в опухолях печени и мембранных структурах, выделенных из них [2]. Жирнокислотный состав липидов при канцерогенезе изучали в основном на культурах опухолевых клеток. Общими тенденциями для различных культур являлись снижение степени ненасыщенности за счет потери кислот 20:4, 22:4 и 22:6 и повышение доли стеариновой кислоты (18:0) [17, 18].

В настоящей работе исследован состав жирных кислот различных фракций нейтральных липидов и ФЛ опухолей молочной железы человека. Нейтральные липиды, за исключением холестерина и триацилглицеридов (ТГ), содержатся в тканях человека в малых количествах, что затрудняет их исследование. В то же время они являются весьма активными метаболитами, промежуточными продуктами биосинтеза ФЛ—ди- и моноацилглицериды (ДГ и МГ), участниками ацилобменных реакций. В связи с этим сопоставление жирнокислотного состава различных фракций нейтральных липидов и ФЛ опухолевой и здоровой ткани может помочь выявить пути нарушения метаболизма при канцерогенезе.

Методика. Материалом для исследования служили образцы опухолевой ткани молочной железы 7 женщин, любезно предоставленные хирургами городского онкологического диспансера. Все больные имели диагноз рака молочной железы II—III стадии, в основном язвенной формы. Навески опухолевой ткани массой 1,5—2 г, взятые во время операции, промывали охлажденным физиологическим раствором и экстрагировали из них общие липиды по методу [11]. Такой же обработке подвергали контрольные образцы—навески ткани молочной железы, не затронутые злокачественным перерождением и взятые во время той же операции.

Полученные суммарные липиды разделяли на фракции при помощи тонкослойной хроматографии на силикагеле-Л с дисперсностью 5—40 мкм в системе гексан—диэтиловый эфир—ледяная уксусная кислота в соотношении 75:25:2. Остаточную на старте фракцию общих фосфолипидов (ФОЛ) подвергали дополнительному разделению в системе хлороформ—метанол—7 н. аммиак (60:35:5). Используемые процедуры подробно описаны в методическом руководстве [3]. Идентификацию фракций проводили по соответствующим стандартам. В первой системе общие липиды разделялись на ФОЛ, МГ, холестерин, ДГ, свободные жирные кислоты (СЖК), ТГ и эфиры холестерина (ЭХС). Во второй системе растворителей ФОЛ давали фракции фосфатидилхолина (ФХ), фосфатидилсерина (ФС), монофосфоинозотида и фосфатидилэтаноламина (ФЭА).

Выделенные фракции липидов подвергали метанолизу по методу [15] в запаянных, заполненных газообразным азотом ампулах при 100°С в течение 3 ч. Газохроматографическое разделение полученных метиловых эфиров жирных кислот осуществляли на приборе «Цвет-101» в условиях, описанных в предыдущей работе [4]. Иден-

Таблица 1

Жирнокислотный состав общих липидов и ацилглицеридов опухолевой ткани молочной железы и контрольных образцов (в % от суммы кислот; $n = 7$)

Жирные кислоты	Общие липиды		МГ		ДГ		ТГ	
	контроль	опухоль	контроль	опухоль	контроль	опухоль	контроль	опухоль
14:0	4,3±0,3	3,0±0,7	4,5±0,9	4,1±0,4	5,2±0,6	3,0±0,6*	4,2±0,2	3,8±0,5
16:0	24,6±2,0	24,5±3,1	26,6±3,6	25,6±3,2	26,2±3,3	22,3±3,3	29,7±1,0	27,2±1,1
16:1	5,7±1,5	6,3±1,1	3,3±0,8	6,0±0,9*	6,1±0,8	4,2±0,8	6,6±2,0	6,8±0,9
18:0	5,9±1,2	6,4±1,3	11,8±1,7	11,7±2,1	11,7±1,7	10,5±1,6	6,8±0,8	5,7±0,3
18:1	43,4±1,8	42,3±1,8	15,5±2,3	29,0±3,1**	24,2±3,3	28,0±2,8	38,4±0,8	44,4±2,3*
18:2	14,6±1,5	13,8±1,1	11,6±2,6	7,8±0,7	10,8±2,0	8,1±2,0	14,1±0,8	11,6±1,6
20:1	Следы	Следы	5,0±1,3	4,8±0,5	1,9±0,3	3,7±0,7*	Следы	Следы
20:4	1,3±0,6	2,0±1,1	7,2±0,9	5,6±1,1	4,2±1,9	12,1±1,3**	0	0
22:4	Следы	Следы	5,1±1,7	5,0±2,4	4,8±2,0	4,5±1,7	0	0
Остальные	Следы	Следы	7,0	1,0	5,0	3,6	Следы	Следы

Индекс ненасыщенности 83 85 98 97 90 118 73 74

Примечание. Здесь и в табл. 2 индекс ненасыщенности представляет собой сумму произведений процентного содержания каждой ненасыщенной кислоты на количество двойных связей в ней; следы — менее 1% от суммы обнаруженных кислот. Достоверность различий: одна звездочка — $p < 0,05$, две — $p < 0,01$.

тификацию пиков кислот проводили по их стандартам и величинам времени относительного удерживания. Количественной оценкой индивидуальных кислот служила площадь их пиков на хроматограмме.

Статистическую обработку данных проводили с использованием критерия *t* Стьюдента.

Результаты и обсуждение. В табл. 1 приведено распределение основных жирных кислот в общих липидах и ацилглицеридах исследованных образцов. Как видно из этой таблицы, в составе липидов молочной железы человека обнаружен набор жирных кислот, типичный для большинства тканей человека и животных — насыщенные и ненасыщенные кислоты с 14—22 атомами углерода в углеводородной цепи и количеством двойных связей от 1 до 4. Доминирующими кислотами во всех случаях были пальмитиновая (16:0) и олеиновая (18:1), которые суммарно обычно составляли 60—70% от суммы всех обнаруженных кислот. Другие преобладающие кислоты — линолевая (18:2) в общих липидах и ТГ и стеариновая в МГ и ДГ, их содержание, как правило, было более 10%. Из полиненасыщенных кислот обнаружены только арахидоновая (20:4) и докозатетраеновая (22:4) кислоты, содержание которых довольно значительно варьировало. Следует заметить, что в липидах молочной железы отсутствовала докозатетраеновая кислота (22:6), которая найдена в липидах таких органов, как мозг и печень [1].

В исследованных нами липидах опухолевой ткани молочной железы человека по сравнению с нормальной тканью не было обнаружено качественных различий жирнокислотного состава, однако имелись выраженные количественные различия. Они были наиболее значительными во фракции ДГ, а также в различных ФЛ (табл. 2) и касались главным образом ненасыщенных кислот. Наибольшие изменения обнаружены во фракции ФЭА, где количество тетраеновых кислот уменьшалось с 22% в контроле до 9% в опухолевой ткани, причем содержание других ненасыщенных кислот также несколько уменьшалось, в результате чего индекс ненасыщенности ФЭА снижался при патологии примерно в 2 раза.

Таблица 2

Жирнокислотный состав отдельных фракций ФЛ опухолевой ткани молочной железы и контрольных образцов (в % от суммы кислот; $n = 3$)

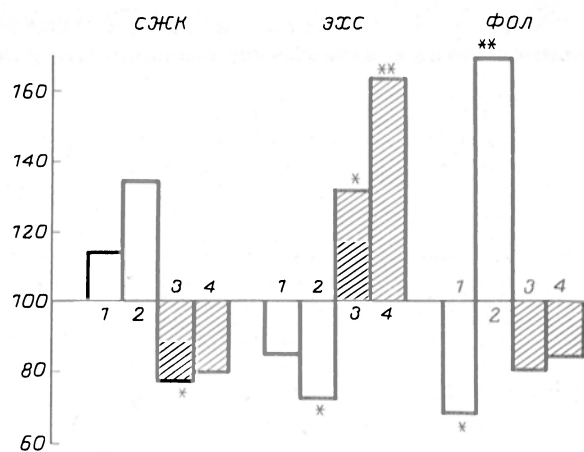
Жирные кислоты	ФХ		ФС		ФЭА	
	контроль	опухоль	контроль	опухоль	контроль	опухоль
14:0	3,3	2,5	3,0	1,9	2,3	4,9
16:0	29,6	18,9	20,1	13,5	16,4	30,6
16:1	4,4	3,9	5,3	6,2	3,5	6,9
18:0	12,3	22,0	15,2	19,9	11,8	13,4
18:1	31,5	19,6	29,8	27,4	23,4	20,9
18:2	3,8	3,7	8,8	6,2	8,0	5,9
20:0	1,2	1,1	4,1	2,1	2,1	Следы
21:1	2,2	Следы	4,7	4,1	2,4	1,5
20:4	3,6	5,7	5,0	6,6	6,7	4,8
22:4	2,7	2,9	2,5	8,2	15,0	4,1
Остальные	5,4	9,7	1,5	4,0	8,2	7,0

Индекс ненасыщенности 75 76 91 113 142 79

Во фракциях МГ и ДГ опухолевой ткани найдено значительное возрастание количества олеиновой и арахидоновой кислот — с 15 до 29 и с 4 до 12% соответственно. Содержание других ненасыщенных кислот менялось в ДГ и МГ таким образом, что индекс ненасыщенности либо не изменялся, либо даже несколько увеличивался (см. табл. 1).

При анализе жирнокислотного состава фракций СЖК и ЭХС обращала на себя внимание противоположная направленность изменений процентного содержания основных насыщенных и ненасыщенных кислот (см. рисунок). Возрастала доля олеиновой и линолевой кислот в ЭХС опухолевой ткани с 28 до 37 и с 6 до 11% соответственно, тогда как доля олеиновой кислоты во фракции СЖК снижалась с 34 до 27%.

Сравнивая результаты, полученные при газохроматографическом анализе липидов опухолевой и здоровой тканей молочной железы, необходимо учитывать разнообразные превращения, которым подвергаются жирные кислоты в организме человека. Главными из них являются синтез жирных кислот *de novo* до пальмитиновой



Содержание основных жирных кислот во фракциях СЖК, ЭХС и ФЛ опухолевой ткани молочной железы (в % от контроля).

1—16:0; 2—18:0; 3—18:1; 4—18:2; заштрихованные столбики — ненасыщенные кислоты. Достоверность различий: звездочка — $p < 0,05$, две звездочки — $p < 0,01$.

кислоты, удлинение цепи жирных кислот и их десатурация и, наконец, разнообразные пути включения кислот в ацилсодержащие липиды [10]. Сопоставление жирнокислотного состава общих липидов опухолевой и нормальной ткани (см. табл. 1), по которому мы можем судить об итогах перечисленных выше процессов, свидетельствует об отсутствии значительных различий между их распределением в липидах нормальной и патологической тканей. Поэтому можно полагать, что в опухолевых клетках молочной железы не происходит заметных изменений в интенсивности синтеза пальмитата, его удлинении и десатурации. Таким образом, все обнаруженные нами изменения в количественном распределении жирных кислот в различных липидах при раке молочной железы отражают изменения, происходящие при включении ацильных групп в липидные молекулы, т. е. изменения в биосинтезе этих липидов.

Как известно, в организме человека и животных существует множество жирнокислотных типов липидов, имеющих специфические пути метаболизма [13]. В ряде органов и тканей, кроме основного пути биосинтеза глицеролипидов через ДГ, значительную роль играют и другие пути, такие, как ацилобменный механизм или обмен азотистыми основаниями в ФЛ [6, 9, 16]. Анализ распределения жирных кислот в ДГ, ТГ и ФЛ позволяет в известной степени ответить на вопрос, какие жирнокислотные типы ДГ молочной железы вовлекаются преимущественно в синтез ФЛ, а какие из них служат предшественниками ТГ и не происходит ли в этих процессах изменений при канцерогенезе. Отсутствие полиненасыщенных кислот в составе ТГ может свидетельствовать о том, что они синтезируются из моноеновых и диеновых типов ДГ. В пользу этого суждения свидетельствует и однонаправленность изменений в содержании пальмитиновой, олеиновой и линолевой кислот в ДГ и ТГ опухолевой ткани (см. табл. 1). Полиеновые типы ДГ служат, по-видимому, главными предшественниками ФЛ, так как именно в составе последних обнаружено наиболее высокое содержание этих кислот (см. табл. 2). В то же время в ФЛ, например в ФЭА,

содержание указанных тетраеновых кислот гораздо выше, чем в ДГ (23% против 9%), и, следовательно, эти ФЛ не могут синтезироваться только из ДГ. Для объяснения такого распределения жирных кислот следует допустить, что в клетках молочной железы биосинтез тетраеновых типов ФЭА осуществляется также и за счет механизмов трансацилирования или обмена азотистыми основаниями между моноеновыми типами ФЭА и тетраеновыми типами других ФЛ. Косвенным подтверждением наличия механизмов трансацилирования полиеновых типов ФЛ в клетках молочной железы может служить и обнаруженное нами высокое содержание тетраеновых кислот во фракции СЖК — 11%. Известно, что СЖК в настоящее время рассматриваются как интермедиаторы различных реакций взаимопревращения липидов [14].

Как уже было отмечено, изменения количественного соотношения жирных кислот в липидах опухолевой ткани молочной железы по сравнению с контролем довольно разнообразны. Интересно, что в распределении полиненасыщенных кислот ДГ и ФЛ опухолей имеются однонаправленные изменения: количество этих кислот возрастает примерно втрое в ДГ и заметно увеличивается в ФОЛ, в ФХ и ФС. С другой стороны, во фракции ФЭА содержание тетраеновых кислот уменьшается более чем в 2 раза (см. табл. 2). Такое перераспределение полиненасыщенных жирных кислот в ДГ и в различных ФЛ опухолевой ткани может произойти только при условии существования в клетках молочной железы различных путей биосинтеза для разных жирнокислотных типов ФЛ. Можно предположить, что при канцерогенезе угнетаются механизмы трансацилирования ФЭА, с помощью которых в нормальных клетках молочной железы синтезируются тетраеновые типы этих ФЛ. Показано, что именно с помощью трансацилирования в ткани легких и эритроцитах синтезируются те жирнокислотные типы ФЛ, которые специфичны для этих клеток [16]. Известно, что в молочной железе протекает активный синтез жирных кислот и различных липидов [10]. Однако достоверный ответ на вопрос, происходит ли в молочной железе синтез каких-либо жирнокислотных типов ФЛ за счет реакций ацильного обмена или обмена азотистыми основаниями, может быть дан только после изучения в ткани молочной железы соответствующих ферментных систем. Полученные нами данные позволяют полагать, что в молочной железе человека эти реакции протекают и именно они подвержены нарушению при канцерогенезе.

ЛИТЕРАТУРА

1. Горьев М. И., Евдакова Н. А. Справочник по газожидкостной хроматографии органических кислот. — Алма-Ата, 1977.
2. Дятловицкая Э. В. // Липиды. Структура, биосинтез, превращения и функции. — М., 1977. — С. 53—57.
3. Методы биохимических исследований / Под ред. М. И. Прохоровой. — Л., 1982.
4. Опарина Т. И., Блюдзин Ю. А., Путилина Ф. Е. // Нейрохимия. — 1990. — Т. 9, № 2. — С. 247—252.
5. Саатов Т. С., Зайнутдинов Б. Р. // Укр. биохим. журн. — 1984. — Т. 56, № 3. — С. 285—293.
6. Baranska J. // Advanc. Lipid Res. — 1982. — Vol. 19. — P. 163—184.

7. Braden L., Carroll K. K. // *Lipids*.— 1986.— Vol. 21, № 4.— P. 285—288.
8. Conning D. M. // *Nutr. Bull.*— 1991.— Vol. 16, № 1.— P. 36—44.
9. Cullis P. R., De Kruffy B. // *Biochim. biophys. Acta.*— 1979.— Vol. 559, № 4.— P. 399—400.
10. *Fatty Acid Metabolism and its Regulation* / Ed. S. Numa.— New York, 1984.
11. Folch J., Lees M., Sloane-Stanley G. H. // *J. biol. Chem.*— 1957.— Vol. 226, № 2.— P. 497—509.
12. Gonzales M. J., Schemmel R. A., Gray J. I. et al. // *Carcinogenesis*.— 1991.— Vol. 12, № 7.— P. 12—17.
13. Holub B. J., Kuksis A. // *Advanc. Lipid Res.*— 1978.— Vol. 16.— P. 1—126.
14. Lunt G. G., James J. E. // *J. Neurochem.*— 1976.— Vol. 26, № 2.— P. 325—329.
15. Peisker K. V. // *J. Amer. oil Chem. Soc.*— 1964.— Vol. 41, № 1.— P. 87—88.
16. Perkins E. G., Writting L. A. *Modification of Lipid Metabolism*.— New York, 1975.
17. Schroeder F., Gardiner J. M. // *Cancer Res.*— 1984.— Vol. 44, № 10.— P. 3262—3269.
18. Wood P., Upreti G. C., Antueno R. J. // *Lipids*.— 1986.— Vol. 21, № 4.— P. 292—301.

Поступила 08.04.93

FATTY ACID COMPOSITION OF SOME LIPID FRACTIONS OF TUMOR TISSUE IN BREAST CANCER

Yu. A. Blyudzin, T. A. Lipatova, T. J. Oparina

State University, Institute of Experimental Medicine, Russian Academy of Medical Sciences, St. Petersburg

The distribution of major fatty acids in neutral lipids and phospholipids was studied in breast tumor tissue. The most pronounced differences in the content of individual fatty acids were found in the fractions of diacylglycerol and phosphatidylethanolamine, which mainly applies to unsaturated acids. Possible impairments of transacetylation mechanisms in carcinogenesis are discussed.

© Н. В. ПЕТРОВА, Т. Д. ЕРОШКИНА, 1994

УДК 616.832-001-07:616.153

Н. В. Петрова, Т. Д. Ерошкина

УРОВНИ СРЕДНИХ МОЛЕКУЛ У БОЛЬНЫХ С ТРАВМОЙ СПИННОГО МОЗГА

Московская медицинская академия им. И. М. Сеченова

Как известно, развитие интоксикации у спинальных больных значительно усугубляет тяжесть состояния. При отсутствии лечения синдром эндогенной интоксикации может нарастать и стать фактором, определяющим осложненное течение основного заболевания. Для оценки степени интоксикации в настоящее время используют такой показатель, как уровень средних молекул (СМ) в крови. По данным литературы, уровень СМ определяли у больных при парапроктите [6], неспецифических колитах [5], черепно-мозговой травме (ЧМТ) [7], хронической почечной недостаточности [10] и других заболеваниях.

Цель настоящей работы — изучить уровни токсических среднемолекулярных пептидов в крови при травматической болезни, с тем чтобы определить возможность использования этого показателя в оценке состояния больного.

Методика. Обследовано 46 больных: 26 человек с травматической болезнью спинного мозга (давность травмы от 4 мес до 2 лет; 1-я группа); 10 человек с травмой спинного мозга (давность от нескольких дней до 3 нед; 2-я группа); 10 чело-

век с ЧМТ (2 с сотрясением мозга, 8 с ушибом головного мозга, давность заболевания от 2 до 15 дней; 3-я группа).

Венозную кровь брали натощак, образцы сыворотки исследовали в день исследования. Уровень СМ определяли скрининговым методом [7]. Контрольную группу составили 25 здоровых доноров.

Полученные результаты обрабатывали статистически, используя критерий Стьюдента.

Результаты и обсуждение. Проведенное исследование выявило нарастание уровней СМ во всех обследованных группах больных по сравнению с физиологической нормой. Наибольший уровень СМ был отмечен у больных с травмой позвоночника на ранних сроках наблюдения (2-я группа), затем по степени снижения содержания СМ следовали больные с травмой спинного мозга в позднем периоде болезни (1-я группа) и больные с ЧМТ (3-я группа) (см. таблицу). Эти наблюдения указывают на то, что существенными факторами, определяющими степень интоксикации у больных, являются уровень травмы и срок ее давности. Причины возникновения интоксикации у больных со свежей травмой центральной нервной системы (ЦНС) в литературе достаточно освещены, последовательность событий, по-видимому, одинакова при повреждении различных тканей [1]. Механическую травму рассматривают пусковым моментом развития интоксикации — разрушение структуры нервной ткани приводит к расстройству коллатерального кровообращения и микроциркуляции. Повреждение структуры и изменение свойств мембран наряду с циркуляторной и гипоксической недостаточностью вызывают локальные метаболические сдвиги, усиливают протеолиз, в кровь поступает большое количество продуктов распада — белки, пептиды, аминокислоты и фосфолипиды. Сопутствующее травме нарушение мочевыделительных функций приводит к накоплению в крови в избыточном количестве промежуточных и конечных продуктов обмена веществ — мочевой кислоты, органических кислот, фенола, креатинина и др., что способствует генерализации эндогенной интоксикации. По данным литературы [3], о степени интоксикации можно судить по содержанию соединений, которые остаются в сыворотке крови больного после осаждения белков, так называемых средних молекул, соединений с молекулярной массой 300—5000 Д. Состав СМ точно не установлен, но известно, что в него входят олигопептиды [10] и липидная фракция (жирные кислоты, холестерин, фосфолипиды, триглицериды и другие соединения), составляющая до 25% от

Уровни СМ у больных с травмой ЦНС

Характер травмы	Оптическая плотность		Критерий К
	254 нм	280 нм	
Спинальная травма:			
в позднем периоде (n=26)	0,293 ± 0,019	0,330 ± 0,029	1,21 ± 0,002
p	<0,001	<0,001	
в раннем периоде (n=10)	0,314 ± 0,042	0,390 ± 0,025	1,24 ± 0,071
p	<0,001	<0,01	
ЧМТ (n=10)	0,286 ± 0,019	0,301 ± 0,044	1,058 ± 0,048
	<0,001	<0,05	
Доноры (n=25)	0,238 ± 0,002	0,287 ± 0,000	1,21 ± 0,002

СМ [7]. Уровень СМ был использован в настоящем исследовании для оценки интоксикации у больных с травмой спинного мозга и ЧМТ. В литературе отмечают важность изучения ЧМТ как острого повреждения организма с первых минут, для того чтобы выявить полный комплекс энергетических обменных и циркуляторных изменений. Такой подход позволил авторам получить ясную картину последовательных нарушений при ЧМТ [1, 4, 8].

В нашу задачу не входило детальное изучение поэтапного развития интоксикации при ЧМТ. Группа больных с повреждением головного мозга была обследована в период от 2 до 15 дней от начала травмы. При этом состояние больных по клиническим признакам расценивалось как удовлетворительное. Больные с травмой ЦНС на ранних сроках наблюдения (2-я и 3-я группы) рассматривались как группа сравнения при изучении интоксикации у больных с осложненным течением травматической болезни в позднем периоде. Уровень СМ у больных с ЧМТ был ниже, чем у больных с травмой спинного мозга (1-я и 2-я группы), но достоверно отличался от контроля (см. таблицу). Умеренная интоксикация, выявленная у больных с ЧМТ спустя 1—2 нед после травмы, указывает на то, что восстановление поврежденной ткани к этому сроку еще не закончено. Сопутствующее травме нарушение мочевыделительных функций как важнейшая причина интоксикации сохраняется 5—6 дней при тяжелой ЧМТ и до 3 дней — при легкой [9], у больных 3-й группы это нарушение, по-видимому, было купировано.

У больных со спинальной травмой в раннем периоде (2-я группа) значения СМ были значительно выше, чем у других обследованных. Полученные результаты подтверждают представление о том, что повреждение всех отделов позвоночника относится к разряду тяжелых травм [9]. Глубину интоксикации позволяет оценить критерий, введенный В. Г. Амчеславским [2] для объективизации состояния нейрохирургических больных. Критерий K соответствовал отношению оптической плотности (ОП), измеренной при 280 нм (фракция ароматических соединений), к ОП при 254 нм (собственно СМ). Наши расчеты показали, что у спинальных больных на ранних сроках наблюдения среднее значение K равнялось 1,24, что превысило норму ($K=1,2$). У больных с ЧМТ (3-я группа) средние значения K равнялись 1,0, что соответствует представлению о неосложненном течении болезни [12]. У больных с ЧМТ, осложненной травмой позвоночника в позднем периоде болезни (1-я группа), при средних значениях $K=1,17$, что близко к норме. В отдельных случаях коэффициент существенно увеличивался (1,31 и 1,33). Проведенные расчеты подтвердили необходимость дифференцированного подхода к оценке степени интоксикации этой группы больных.

У больных с травмой позвоночника в позднем периоде болезни (от 3 до 4 мес и неопределенно долго), кроме грубых нарушений функций тазовых органов, связанных с травматическим повреждением спинного мозга, могут возникать воспалительные осложнения и трофические расстройства [9]. Нарушение нормальной иннерва-

ции почек называют в числе основных причин развития таких осложнений, как пиелонефрит и хроническая почечная недостаточность, у больных этой категории. В литературе [10] обосновано мнение, что присутствие в крови СМ определяет тяжесть уремической интоксикации. У больных с хронической почечной недостаточностью в отдельных случаях удавалось выделить олигопептиды, оказывающие влияние на различные стороны метаболизма (подавляли окислительное фосфорилирование, оказывали иммунодепрессивное действие). Важность пептидов как надклеточных регуляторов метаболизма тканей не вызывает сомнений. Опасность, возникающая при травматической болезни в связи с накоплением в крови большого количества пептидов, обусловлена их возможным вмешательством в регуляцию функций ЦНС и системы иммунитета (И. П. Ашмарин, 1982, 1989). При травме ЦНС повреждение гепатоэнцефалического барьера приводит к контакту антигенной структуры мозга с иммунокомпетентными клетками организма [11]. Такие больные могут длительное время оставаться сенсибилизированными к собственным антигенам. Бактериальная атака способствует развитию вторичной иммунной реакции — нарастанию аутоиммунных изменений у больных, сенсибилизированных к мозговому антигену. Изменения иммунологических показателей, по-видимому, являются важнейшей причиной развития хронических воспалительных осложнений у отдельных спинальных больных, что приводит к нарастанию интоксикации в сроки, когда рубцевание дефекта ткани мозга давно закончено. Выраженность иммунологических нарушений у больных с осложненной травмой позвоночника неодинакова, и этим можно объяснить выявленные нами различия в степени интоксикации.

Таким образом, уровень интоксикации у спинальных больных может быть связан с нарушением мочевыделительных функций, развитием воспалительных осложнений почек — важнейшего дезинтоксикационного органа, деструкцией тканей, способствующей поступлению в кровь большого количества продуктов распада.

Проведенное исследование показало, что метод определения уровня СМ в крови может быть использован для оценки степени интоксикации спинальных больных.

ЛИТЕРАТУРА

1. Адаптационные механизмы и патогенез травмы головного мозга. — Новосибирск, 1987.
2. Амчеславский В. Г., Демчук М. Л., Сировский Э. Б. и др. // Вопр. нейрохир. — 1989. — № 3. — С. 36—39.
3. Габриэлян Н. И., Липатова В. И. // Лаб. дело. — 1984. — № 3. — С. 138—140.
4. Гельфанд В. Б., Маламуд М. Д., Истратов В. Г. Закрытая черепно-мозговая травма. — Кишинев, 1988.
5. Ерошкина Т. Д., Мусин И. И., Иванов А. Ф. и др. // Проблемы проктологии. — 1988. — Вып. 9. — С. 157.
6. Назаров Л. У., Эфеджян А. К., Саакян А. Б. // Проблемы проктологии. — 1990. — Вып. 11. — С. 34.
7. Промыслов М. Ш., Левченко Л. И., Демчук М. М. // Вопр. мед. химии. — 1989. — № 4. — С. 105—107.
8. Ромоданов А. П., Лиственный П. И. Черепно-мозговая травма и иммунологическая реактивность организма. — Киев, 1991.
9. Травматическая болезнь. — Л., 1987.
10. Туникова З. А. // Вопр. мед. химии. — 1983. — № 1. — С. 2—10.

11. Шмидт Е. В., Галушкина И. В. // Вестн. АМН СССР.— 1992.— № 12.— С. 47—50.
12. Юмашев Г. С., Петрова Н. В., Елисеев А. Т. // Клин. мед.— 1991.— № 3.— С. 56—58.

Поступила 12.08.93

THE LEVELS OF MEDIUM-WEIGHT MOLECULES IN BLOOD SERUM OF PATIENTS WITH CEREBROSPINAL TRAUMA

N. V. Petrova, T. D. Eroshkina

I. M. Sechenov Medical Academy, Moscow

The levels of medium-weight molecules was estimated in the serum of 46 patients, including 36 patients with cerebrospinal injury and 10 patients with craniocerebral injury, 5 healthy volunteers were in the control group. The toxic metabolites studied were markedly increased in all these patients as compared with the controls. However, the highest alterations were detected in the patients with cerebrospinal injury in early periods of observation, thus suggesting that the trauma and duration might be responsible for intoxication manifestations. Estimation of the levels of medium-weight molecules in blood may be used in evaluation of the degree of intoxication in spinal patients.

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 1994

УДК 616.127-005.4-07:616.153.922

М. А. Самсонов, Б. Г. Ляпов, А. С. Аббакумов,
Т. В. Киселева, А. В. Погосева

ОБМЕН ХОЛЕСТЕРИНА У БОЛЬНЫХ ИШЕМИЧЕСКОЙ БОЛЕЗНЬЮ СЕРДЦА ПРИ РАЗЛИЧНОМ ОБЕСПЕЧЕНИИ ПОЛИНЕНАСЫЩЕННЫМИ ЖИРНЫМИ КИСЛОТАМИ СЕМЕЙСТВА ω -3

Институт питания РАМН, Москва

Многими исследователями [1, 11, 13] подчеркивается особая значимость повышения уровня общего холестерина (ОХС) в крови в возникновении и прогрессировании ишемической болезни сердца (ИБС). Отмечено, что при низком его содержании другие факторы риска возникновения атеросклероза в меньшей степени проявляют свою атерогенность. Данные проспективных эпидемиологических исследований подтверждают высокую частоту возникновения новых случаев ИБС у лиц с повышенным уровнем ОХС в сыворотке крови и липопротеидов низкой плотности, а также низким уровнем холестерина высокой плотности [7, 12]. В то же время течение заболевания и его прогноз не могут быть определены при помощи только традиционных клинико-биохимических показателей обмена холестерина в организме: содержания в крови ОХС, холестерина липопротеинов низкой и высокой плотностей, так как перечисленные тесты отражают количественные взаимоотношения между несколькими пулами холестерина в организме, имеющими разное происхождение и скорость обмена [10, 14], что существенно снижает их информативность. Популяционные исследования, проведенные в Финляндии [9], показали, что состав молекулярных форм этерифицированного холестерина крови в значительной степени подвержен влиянию уровня полиненасыщенных жирных кислот (ПНЖК) семейства ω -6 в рационе. При этом как у здоровых лиц, так и у пациентов с ИБС при

одновременном изучении жирнокислотного состава ацильных групп в триацилглицеринах и фосфоглицеринах, определяющих их молекулярную структуру, и спектра эфиров холестерина последний показал максимальную дисперсность [3, 4]. Возможно, указанный эффект ПНЖК семейства ω -6 обусловлен активацией ЛХАТ-реакции, способствующей образованию в сыворотке крови эфиров холестерина с ПНЖК. Предполагают, что при этом происходит и увеличение доли холестерина, окисляемого в желчные кислоты, осуществляемое различными формами цитохрома Р-450 в гепатоцитах по монооксигеназному пути 7 α - и 12 α -гидроксилазами дохоловой (3,7,12-ОН) и хенодезоксихоловой (3,7-ОН) кислот [2]. Представленные данные литературы свидетельствуют о том, что изучение спектра этерифицированного холестерина в крови и концентрации в ней первичных желчных кислот наряду с общепринятыми клинико-биохимическими показателями позволит более адекватно оценить влияние различных доз ПНЖК семейства ω -3 при различном их соотношении с ПНЖК семейства ω -6. Об оптимизации соотношения этих двух семейств ПНЖК следует помнить ввиду существования конкурентных взаимоотношений в процессах их метаболизма [5].

Методика. Обследовано 135 человек с диагнозом ИБС, при этом у 78 из них обнаружена гиперлипотеинемия (ГЛП): у 25—IIa типа, 34—IIb типа и у 19—IV типа. В условиях клиники лечебного питания пациенты получали рационы с различным содержанием ПНЖК семейства ω -3. Больные I-й группы (40 человек) получали антисклеротическую базисную диету (А-1; ее состав: 98 г белка, 88 г жиров, 320 г углеводов; при энергетической калорийности 2500 ккал) с соотношением ПНЖК серии ω -6/ ω -3, равным 10, при содержании ПНЖК серии ω -3 около 200 мг, т. е. на уровне эссенциального фактора. Пациенты 2-й группы (38 человек) в течение такого же периода времени содержались на рационе с соотношением ПНЖК семейства ω -6/ ω -3, равным 6,5 при уровне ПНЖК ω -3 около 3 г. 3-я группа состояла из 57 человек, получавших в составе базисной диеты 20 г рыбьего жира «Эйконол» взамен растительного масла, при этом соотношение ПНЖК семейства ω -6/ ω -3 равнялось 1,3, а содержание ПНЖК серии ω -3—около 7 г. Контрольную группу составили 19 практически здоровых людей (11 мужчин и 8 женщин) в возрасте от 34 до 47 лет с нормальной массой тела и без клинических симптомов ИБС, с нормальными показателями уровня липидов. В сыворотке крови определяли традиционные клинико-биохимические показатели: уровень ОХС, α -холестерина, общих триацилглицеридов—с помощью анализатора фирмы «Abbott» (США). Содержание в крови молекулярных форм этерифицированного холестерина определяли после выделения из общего липидного экстракта методом тонкослойной хроматографии фракции эфиров холестерина, разделение на индивидуальные молекулярные формы проводили на жидкостном хроматографе «Бекман», (США) М. 336 с колонкой «Ультрасфера-ОДС» и мобильной фазой ацетон: ацетонитрил (64:36 об/об) с детектором «Кратос» (ФРГ), М. 757 при 205 нм [6].

Для определения содержания в сыворотке крови желчных кислот проводили их экстракцию смесью метанол: хлороформ (9:1), метанольный слой отбирали и выпаривали на ротаторном испарителе, фторпроизводные желчных кислот получали, приливая к сухому остатку 0,3 мл гексафторизопропанола и 0,1 мл трифторуксусного ангидрида [8]. Разделение фторпроизводных желчных кислот проводили на капиллярной колонке с фазой OV-275 на газовом хроматографе фирмы «Тракор» (Нидерланды) М. 565, используя детектор электронного захвата. В качестве внутреннего стандарта в образец вводили литохолевую кислоту, которая в крови человека в нормальных условиях отсутствует.

Результаты и обсуждение. В табл. 1 и 2 приведены данные, характеризующие спектры этерифицированного холестерина в плазме крови у больных ИБС без ГЛП (Ia) и с ГЛП IIa, IIb и IV типов. Под влиянием базисного антиатеросклеротического рациона у больных ИБС без ГЛП наблюдали достоверное повышение уровня в крови арахидоната холестерина (приближение его к значениям у лиц контрольной группы). Наряду с этим отмечалось снижение содержания пальмитата и стеарата холестерина соответственно на 22 и 40,8% по сравнению с исходным.

Уровень линолеата, олеата, а также суммарное содержание эйкозопентаэнаата и докозагексаэнаата холестерина практически не изменились. У больных, получавших рацион с более высоким содержанием в липидах ПНЖК семейства ω -3, суммарное содержание эйкозопентаэнаата и докозагексаэнаата повысилось в 1,8—2 раза по сравнению с исходным. Наряду с этим отмечалось достоверное снижение в сыворотке крови этих больных содержания линолеата и пальмитолеата холестерина, а при назначении эйкопола (отношение ПНЖК ω -6/ ω -3 равно 1,3) снижался уровень пальмитата и стеарата холестерина. У больных ИБС с ГЛП IIa типа базисный антисклеротический рацион вызывал повышение уровня в крови арахидоната холестерина и снижение пальмитата холестерина, т. е. обнаруживался эффект, аналогичный полученному в группе больных ИБС без ГЛП.

У пациентов с ИБС и ГЛП IIb типа уровень арахидоната также возрастал, содержание олеата и пальмитата холестерина имело тенденцию

к снижению; при IV типе ГЛП использование базисного рациона не изменяло соотношения основных молекулярных форм этерифицированного холестерина в крови. При увеличении в рационе ПНЖК семейства ω -3 эффект в ряде случаев повторял описанный выше у больных ИБС общей группы (см. табл. 1); более действенным являлся рацион с соотношением ПНЖК ω -6/ ω -3, равным 1,3, и содержанием ПНЖК ω -3, равным 7 г, вызывавший увеличение уровня эйкозопентаэнаата и докозагексаэнаата холестерина у пациентов с ГЛП всех типов—IIa, IIb и IV. Однако оба рациона с увеличенным уровнем ПНЖК семейства ω -3 не оказывали заметного влияния на другие молекулярные формы этерифицированного холестерина (арахидонат) в крови.

Эффект использованных рационов в группах больных ИБС без ГЛП и с семейными ее формами качественно повторялся, отличаясь степенью выраженности, что свидетельствует об универсальности биохимических механизмов влияния рационов с повышенным содержанием ПНЖК семейств ω -3 на обмен холестерина.

На рис. 1 приведены хроматограммы больного ИБС до лечения, после курса диетотерапии базисным антисклеротическим рационом и последующего курса диетотерапии рационом с увеличенным количеством ПНЖК семейства ω -3. Отчетливо просматривается различие в спектрах молекулярных форм этерифицированного холестерина в крови. При использовании базисного рациона основным эффектом является увеличение уровня арахидоната холестерина и снижение содержания пальмитата и стеарата холестерина. При применении рациона с увеличенным количеством ПНЖК семейства ω -3 уровень арахидоната холестерина достоверно не изменяется, наиболее значительно увеличивается количество эйкозопентаэнаата и докозагексаэнаата холестерина. Эти качественно различные эффекты, очевидно, определяют конечный результат—большее снижение уровня ОХС и триацилглицеридов у пациентов, находящихся на диете с увеличенным уровнем ПНЖК семейства ω -3, чем в случае использования базисного рациона. Оба рациона с увеличенным в сравнении с базисным содержанием ПНЖК семейства ω -3 способствовали повышению в крови эйкозопентаэнаата и докозагексаэнаата холестерина.

Таблица 1

Содержание основных форм эфиров холестерина в сыворотке крови больных ИБС без ГЛП при различном соотношении и содержании ПНЖК ω -6 и ω -3 в рационе

Эфиры холестерина	Контрольная группа	Сумма ПНЖК ω -3=0,2 г		Сумма ПНЖК ω -3=3 г		Сумма ПНЖК ω -3=7 г	
		диета A ₁ (ω -6/ ω -3=10)		диета A ₁ n (ω -6/ ω -3=6,5)		диета A ₁ m (ω -6/ ω -3=1,3)	
		I	II	I	II	I	II
ЭД	6,80 ± 1,50	5,38 ± 0,77	7,55 ± 0,45	6,23 ± 1,33	12,47 ± 1,88 ***	6,45 ± 0,73	10,5 ± 0,84 ***
Ар	19,9 ± 2,86	17,45 ± 1,35	21,23 ± 1,74 *	20,5 ± 0,08	20,30 ± 1,25	17,76 ± 0,91	17,69 ± 1,08
Ли	56,9 ± 3,80	52,88 ± 3,05	53,65 ± 2,14	58,1 ± 1,93	52,5 ± 2,08 ***	57,98 ± 1,79	55,4 ± 1,06 *
ПО	0,46 ± 0,03	0,44 ± 0,02	0,38 ± 0,03	0,50 ± 0,01	0,35 ± 0,05 *	0,55 ± 0,15	0,28 ± 0,045 *
ОО	10,2 ± 1,20	11,15 ± 1,27	10,53 ± 1,70	9,20 ± 0,99	9,00 ± 0,70	8,80 ± 1,60	10,6 ± 0,64
ПП	6,40 ± 0,45	7,68 ± 0,79	5,98 ± 0,25 *	5,70 ± 1,20	5,60 ± 0,38	8,87 ± 0,80	7,71 ± 0,65
Ст	1,44 ± 0,22	1,20 ± 0,27	0,71 ± 0,06	1,06 ± 0,22	0,62 ± 0,10 *	1,15 ± 0,33	0,47 ± 0,073 *

Примечание. Одна звездочка— $p \leq 0,05$, две— $p \leq 0,01$, три— $p \leq 0,001$. Здесь и в табл. 2: ЭД—сумма эйкозопентаэнаата и докозагексаэнаата, Ар—арахидонат, Ли—линолеат, ПО—пальмитолеат, ОО—олеат, ПП—пальмитат, Ст—стеарат холестерина, I—до лечения, II—после лечения.

Содержание основных форм этерифицированного холестерина в сыворотке крови больных ИБС с ГЛП семейного генеза при различном соотношении ПНЖК ω -6 и ω -3 в рационе

Эфиры холестерина	Контрольная группа	Диета А ₁ (ω-6/ω-3=10) сумма ω-3=0,2 г						Диета А ₁ II (ω-6/ω-3=6,5) ω-3=3 г				Диета А ₁ M (ω-6/ω-3=1,3) сумма ω-3=7 г							
		ГЛП IIa типа		ГЛП IIb типа		ГЛП IV типа		ГЛП IIa типа		ГЛП IIb типа		ГЛП IIa типа		ГЛП IIb типа		ГЛП IV типа			
		I	II	I	II	I	II	I	II	I	II	I	II	I	II	I	II		
ЭД	6,80 ± 1,50	4,30 + 0,61	5,65 ± 0,57	5,38 + 0,77	6,55 + 0,45	4,20 ± 0,40	3,80 + 0,50	6,90 + 0,52	8,90 0,93 *	8,50 + 1,01	10,90 ± 1,40 *	4,47 + 1,31	10,20 ± 1,69 *	7,42 + 1,42	11,8 ± 1,69 *	5,13 + 0,72	8,55 + 2,56		
Ар	19,9 ± 2,86	16,3 + 1,14	18,3 + 1,48	17,4 ± 1,35	21,2 1,74 *	18,3 ± 1,60	19,9 1,00	17,4 ± 0,60	17,5 + 0,73	18,6 + 1,40	16,0 2,10	16,1 + 2,58	16,5 + 1,94	11,8 + 1,69	15,5 ± 1,58	14,9 ± 1,60	14,7 + 1,24		
Ли	56,9 + 3,80	60,3 + 3,00	55,4 + 4,00	52,9 + 3,05	53,6 2,14	56,3 + 2,80	57,5 2,40	62,8 2,84	58,3 2,85 *	56,5 1,84	55,2 4,50	61,9 2,25	56,6 2,27	56,0 1,49	59,4 1,54	56,7 2,60	56,0 2,27		
ПО	0,46 ± 0,03	0,46 + 0,08	0,44 + 0,06	0,50 + 0,08	0,42 + 0,06	0,48 + 0,03	0,48 + 0,02	0,45 0,25	0,40 0,01	0,40 0,10	0,33 0,03	0,56 0,11	0,48 0,09	0,47 0,04	0,42 0,06	0,50 0,08	0,48 0,06		
ОО	10,2 ± 1,20	12,3 + 1,90	11,1 + 2,00	11,2 + 1,27	10,5 0,70	6,80 + 1,50	6,0 1,20	5,95 1,27	7,40 1,70	7,30 0,95	8,20 0,60	10,3 1,60	9,23 1,55	9,78 0,90	10,7 1,13	11,8 2,07	11,0 1,15		
ПП	6,40 + 0,45	9,54 + 1,20	7,95 + 1,70 *	7,68 + 0,79	5,98 0,25	6,99 + 0,80	5,30 0,70	5,70 1,46	6,90 0,95	5,23 0,60	5,30 0,44	7,23 1,53	7,17 1,70	7,47 0,70	8,26 1,75	8,42 1,06	7,13 1,73 *		
Ст	1,44 + 0,22	1,44 + 0,11	1,46 + 0,13	1,48 + 0,13	1,48 0,11	1,53 + 0,17	1,46 0,18	1,42 + 0,17	1,40 0,16	1,52 + 1,10	1,46 ± 0,18	1,44 + 0,16	1,38 + 0,17	1,55 + 0,10	1,46 ± 0,10	1,48 + 0,19	1,45 0,19		

Примечание. Звездочка — $p \leq 0,05$.

С помощью статистического пакета MICROSTAT была просчитана на ЭВМ корреляционная зависимость между такими общими клинико-биохимическими показателями, как ОХС, α -холестерин крови, и уровнем в ней эйкозапентаэната и докозагексаэната холестерина как маркеров эффекта ПНЖК семейства ω -3 на обмен холестерина. Выявлена четкая обратная корреляционная зависимость между содержанием ОХС и указанными молекулярными формами эфиров холестерина и прямая корреляционная зависимость между содержанием последних в крови и количеством в ней α -холестерина. Интересен факт существования фазности в корреляции меж-

ду содержанием α -холестерина и полиненасыщенных эфиров холестерина: в первую фазу до 9—11% содержания в крови полиненасыщенных эфиров холестерина с жирными кислотами семейства ω -3 происходит резкое повышение корреляционной зависимости, а после превышения уровня 12% указанных форм эфиров холестерина дальнейшего увеличения корреляционных отношений не происходит (плато корреляционных зависимостей).

У пациентов с ИБС и ГЛП IIb типа исследовали концентрацию в крови первичных желчных кислот — холевой и хенодезоксихолевой, а также уровень основной вторичной — дезоксихолевой. Следует отметить, что у этих пациентов отсутствовал эффект повышения уровня α -холестерина в плазме крови, менее выраженными были изменения в спектре этерифицированного холестерина. В крови пациентов этой группы превалировала дезоксихолевая кислота ($0,39 \pm 0,08$ мкмоль/л), холевая и хенодезоксихолевая кислоты составляли соответственно $0,22 \pm 0,03$ и $0,18 \pm 0,03$ мкмоль/л (рис. 2).

Лечение этих больных рационом с увеличенным уровнем ПНЖК семейства ω -3 не оказало заметного влияния на концентрацию и соотношение в крови исследованных желчных кислот: по-прежнему преобладающей была дезоксихолевая кислота ($0,39 \pm 0,08$ мкмоль/л), уровень хенодезоксихолевой не изменился в сравнении с исходным ($0,019 \pm 0,04$ мкмоль/л), а холевой — несколько снизился ($0,19 \pm 0,03$ мкмоль/л). Эти данные свидетельствуют об отсутствии влияния исследованных рационов на активность монооксигеназной системы гепатоцитов, в частности на активность гидроксилаз, участвующих в окислении холестерина до первичных желчных кислот. По данным литературы, концентрация желчных кислот в крови здоровых лиц иная, нежели та, которую мы отмечаем у больных ИБС с ГЛП IIb:

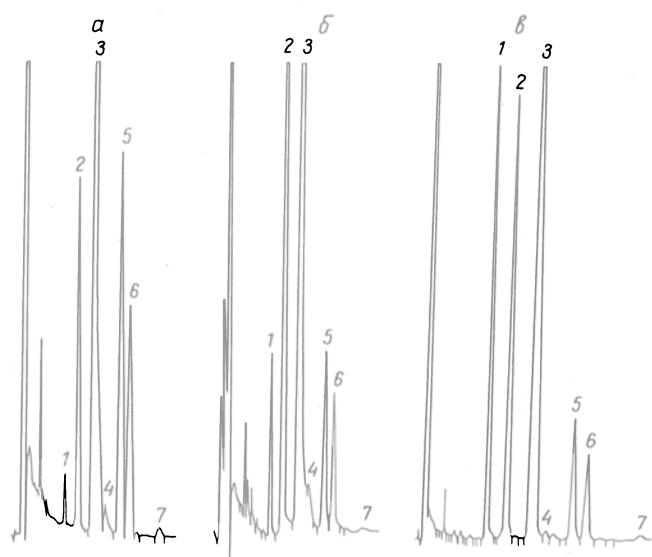


Рис. 1. Хроматограммы эфиров холестерина плазмы крови у больного ИБС.

a — исходная; б — после курса лечения базисной диетой (сумма ПНЖК семейства ω -3=0,2); в — после лечения модифицированной базисной диетой (сумма ПНЖК семейства ω -3=7); 1 — эйкозапентаэнат + докозагексаэнат; 2 — арахидонат; 3 — лигнолеат; 4 — пальмитолеат; 5 — олеат; 6 — пальмитат; 7 — стеарат.

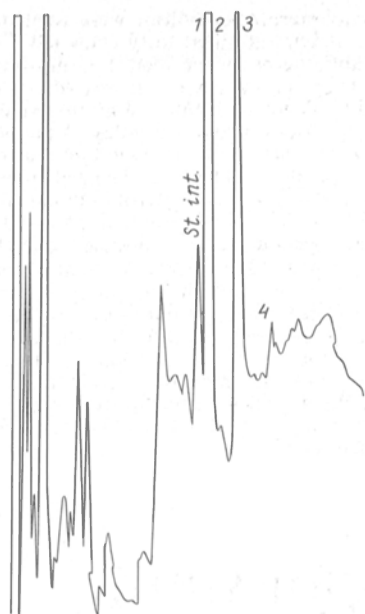


Рис. 2. Хроматограмма фторпроизводных желчных кислот.

1—St. int.—внутренний стандарт (лихолевая кислота); 2—дезоксихолевая кислота; 3—хенодезоксихолевая кислота; 4—холевая кислота.

у здоровых лиц хенодезоксихолевая кислота является преобладающей от суммы 3 исследованных кислот (около 50%), затем следует холевая (30—35%) и менее всех представлена дезоксихолевая кислота (10—13%). Сравнение данных литературы с полученными нами свидетельствует о значительном изменении процессов катаболизма холестерина у больных ИБС с ГЛП IIб типа.

Представленные выше средние статистические данные по эффекту диетотерапии на больных ИБС по выделенным нами группам—ИБС без значительных изменений в обмене холестерина, ИБС с ГЛП IIа, ИБС с ГЛП IIб и ИБС с ГЛП IV—позволяют говорить о существенном влиянии диет, обогащенных ПНЖК семейства ω -3 (при определенном соотношении с ПНЖК семейства ω -6), на обмен холестерина, в частности на процессы его перэтерификации. В то же время степень выраженности эффекта на спектр молекулярных форм эфиров холестерина у пациентов внутри каждой группы была различной, так же как и исходные данные.

Для индивидуальной оценки исходного состояния обмена холестерина и динамики его изменений под влиянием диетотерапии был использован метод сравнения полученных спектров этерифицированного холестерина у каждого больного до и после диетотерапии с аналогичными показателями группы контроля (8 практически здоровых лиц). Сравнение проводили не по нативным данным о составе индивидуальных эфиров холестерина, а по построенной на их основе системе признаков—линейных комбинаций переменных величин, обладающих большей информативностью. Эти преобразования и графические построения делали с помощью ЭВМ, используя статистический пакет STATGRAPHICS методом главных компонент (мультивариантные методы непараметрической статистики). Проводили анализ данных: 1) по группам больных до и после

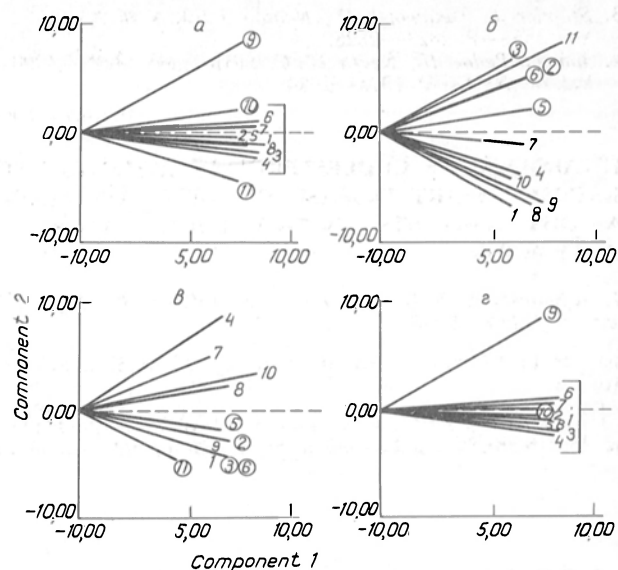


Рис. 3. Графический анализ изменений обмена холестерина у больных ИБС с ГЛП IIа типа.

а—отношение 3 векторов больных ИБС до лечения (9—11) к группе контроля; б—распределение векторов, характеризующих молекулярные спектры этерифицированного холестерина у больных ИБС до лечения; в—те же у больных после курса диетотерапии (смещение векторов); г—пример анализа индивидуального эффекта диетотерапии: 9—до лечения, 10—после лечения; 1—8—вектора группы контроля. Вхождение 10 в сектор контроля—положительный результат лечения.

лечения с целью получения информации в графическом выражении о степени влияния диетотерапии внутри каждой группы; 2) по каждому отдельному больному до и после лечения по отношению к сектору 8 векторов контроля (рис. 3). Преимущество проведения такого рода анализа весьма наглядны, особенно это касается оценки индивидуальных изменений у каждого конкретного больного (см. рис. 3, г). С помощью этого метода можно более детально оценить исходное состояние обмена холестерина по соотношению полиненасыщенных его эфиров к моно- и насыщенным, что отражает степень активности ЛХАТ. Подобная оценка может правильно определить перспективность назначения рационов, содержащих преимущественно ПНЖК семейств ω -3 или ω -6 при соблюдении их оптимального соотношения, и результаты проведенного курса диетотерапии.

ЛИТЕРАТУРА

1. Климов А. П., Никульчева Н. Г. Липопротеиды, дислипидемии и атеросклероз.— М., 1984.
2. Лопухин Ю. М., Арчаков А. И., Халилов Э. М. // Кардиология.— 1980.— № 8.— С. 11—16.
3. Ляшков Б. Г. А. с. 1564547 СССР, 1990.
4. Ляшков Б. Г. и др. // Сов. мед.— 1989.— № 9.— С. 16—18.
5. Ляшков Б. Г. // Вопр. мед. химии.— 1970.— № 5.— С. 451—460.
6. Ляшков Б. Г., Воинов Д. И. // Там же.— 1990.— № 5.— С. 85—88.
7. Оганов Р. Г. Первичная профилактика ишемической болезни сердца.— М., 1990.
8. Adachi Y. et al. // Gastroent. Jap.— 1988.— Vol. 23, № 4.— P. 401—407.
9. Moilenen T., Salakiva-Faskhola T. et al. // Atherosclerosis.— 1986.— Vol. 59.— P. 113—119.
10. Medical Research Council Working Party // Brit. med. J.— 1986.— Vol. 291.— P. 97—104.
11. Oliver M. F. // Brit. med. Bull.— 1990.— Vol. 46, № 4.— P. 865—872.
12. Rifkind B. M. // Ibid.— P. 1059—1074.

13. Stamler J., Wentworth D., Neaton J. // J. A. M. A. — 1986. — Vol. 256. — P. 2823—2828.
14. Tunstall-Pedoe H., Smith W. C. // Brit. med. Bull. — 1990. — Vol. 46, № 4. — P. 1075—1084.

Поступила 25.06.93

METABOLISM OF CHOLESTEROL IN PATIENTS WITH ISCHEMIC HEART DISEASE ON DIET CONTAINING VARIOUS AMOUNTS OF ω -3 POLYUNSATURATED FATTY ACIDS

M. A. Samsonov, B. G. Lyapkov, A. S. Abbakumov, T. V. Kiseleva, A. V. Pogozheva

Institute of Nutrition, Russian Academy of Medical Sciences, Moscow

Patients with ischemic heart disease and with hyperlipidemia of the IIa, IIb and IV types as well as not exhibiting any pronounced

alterations in cholesterol metabolism were treated with various amounts of ω -3 polyunsaturated fatty acids (PUFA) introduced into the basic antiatherosclerotic diet: 1 group—content of the essential factor 0.2 g/day, 2 group—increased content of natural products with PUFA up to 1 g/day, 3 group—increased PUFA content due to the drug «euconol» 5 g/day. Administration of the PUFA ω -3 into the basic antiatherosclerotic diet contributed to development of adequate clinico-biochemical alterations; under these conditions content of α -cholesterol in blood correlated directly to concentration of polyunsaturated cholesterol esters and PUFA ω -3 (eucosapentaenate and docosahexaenate) as well as reverse correlation was found between content of total cholesterol and these molecular forms of cholesterol esters studied. Enrichment of the diet with PUFA ω -3 did not cause any alterations in content of primary bile acids in blood thus suggesting that PUFA ω -3 did not affect the cholesterol catabolism. These data enabled us to plot the graph for individual evaluation of cholesterol metabolism in patients with ischemic heart disease involving alterations in the spectrum of esterified cholesterol in blood before and after the treatment course.

МЕТОДЫ БИОХИМИЧЕСКИХ ИССЛЕДОВАНИЙ

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 1994

УДК 615.31:547.953.1.012

В. А. Узбеков, Л. Б. Мареева, Л. Б. Борисова

МЕТОД ФРАКЦИОНИРОВАНИЯ ФОСФОИНОЗИТИДОВ В ТОНКОМ СЛОЕ СИЛИКАГЕЛЯ

Институт физиологии и гигиены труда НАН Республики Казахстан, Караганда

Участие фосфоинозитидов (ФИ) в процессах передачи нервных импульсов и активном транспорте различных веществ через плазматические мембраны [3, 6] привлекает внимание исследователей к изучению этого класса фосфолипидов. Однако в настоящее время не существует методов для проведения большого количества рутинных анализов содержания этих веществ в тканях организма животных. Наиболее широко употребляемым и точным методом в настоящее время является восходящая бумажная хроматография ФИ, позволяющая выделить моно-, ди- и трифосфоинозитиды (МФИ, ДФИ, ТФИ) [2]. Однако фракционирование на бумаге неудобно тем, что используется большое количество растворителей при приготовлении системы для фракционирования, требуются громоздкие камеры (до 70 см высотой), насыщение камер парами растворителей и сам процесс фракционирования ФИ занимает продолжительное время. Предложен также метод фракционирования ФИ в тонком слое силикагеля, обработанного плавелевокислым калием [8], для которого не характерны названные недостатки. Но использование этого метода имеет другой существенный недостаток — фракция МФИ не отделяется от сфингомиелина, фосфатидилсерина и фосфатидной кислоты, что требует дополнительного фракционирования в другой системе для выделения МФИ. Наплю также применение использования двумерной тонкослойной хроматографии [9], что также усложняет фракционирование.

В настоящей работе представлен метод фракционирования ФИ в тонком слое силикагеля, позволяющий получить четкое выделение фракций МФИ, ДФИ и ТФИ при одномерной хроматографии.

Методика. Для фракционирования использовали стеклянные пластины размером 9 × 24 см. Для покрытия пластин использовали силикагель КСК с размером крупиц 75—150 мкм, который получали путем размалывания в фарфоровой ступе и дальнейшего пропускания через сита соответствующих размеров. Затем силикагель обрабатывали согласно описанию Е. А. Покровского и А. В. Каргополова [5]. После этого отмеривали 3 г обработанного силикагеля и помещали его в центрифужную пробирку, куда приливали 8,5 мл 3% раствора плавелевокислого калия. Пробирку тщательно взбалтывали до образования однородной взвеси. Затем взвесь выливали на пластину и стеклянной палочкой равномерно распределяли по ее поверхности. При проведении последней процедуры пластину располагали на кончиках пальцев и движением их регулировали распределение силикагеля по пластине. Затем помещали пластины на строго горизонтальную поверхность для высушивания. Перед нанесением образца на пластину ее активировали при 110° С в течение 30 мин.

Для анализа использовали полушарие головного мозга крыс, которое измельчали с использованием гомогенизатора «Политрон» в 4 мл метанола и сливали гомогенат в пробирку, затем промывали стакан и гомогенизатор 4 мл смеси хлороформ — метанол — концентрированная HCl — 1:1:0,06 (по объему), доливали эту смесь в пробирку и давали отстояться гомогенату 30 мин, центрифугировали и отливали надосадок в градуированные пробирки емкостью 25 мл. Затем 2 раза проводили экстракцию липидов 5 мл смеси хлороформ — метанол — концентрированная HCl 2:1:0,01 по 30 мин, периодически взбалтывали содержимое пробирок стеклянной палочкой, центрифугировали и отливали надосадок

в градуированные пробирки. Объединенный экстракт промывали 3 мл 0,02% хлорида кальция для стабилизации фосфолипидов и отмывки экстракта от нелипидных примесей. Для анализа брали нижнюю хлороформенную фазу, количественное определение объема которой проводили после центрифугирования при 2000—2500 об/мин в течение 20 мин.

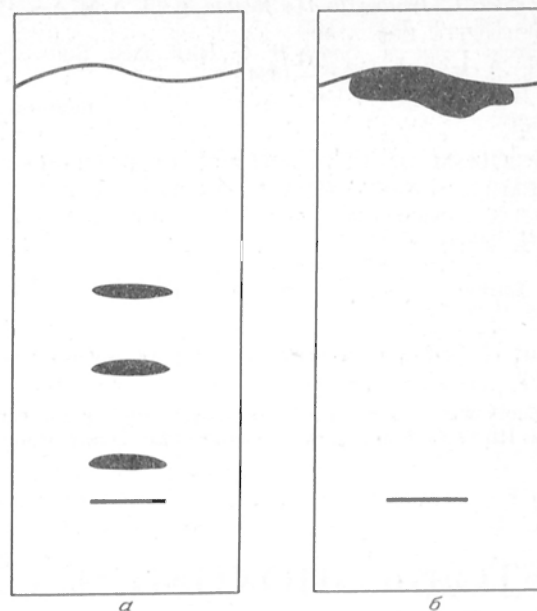
Для фракционирования использовали 0,05 мл экстракта. При этом на одной пластине фракционировали 3 образца. Фракционирование проводили в системе бутанол—ледяная уксусная кислота—вода—диэтиловый эфир—6:1:1:1. Хроматографирование прекращали, когда фронт растворителя достигал 2—3 см от края пластины. Продолжительность разгонки составляла около 1,5 ч.

Пластины высушивали и проявляли в парах йода, после чего проявлялось 3 пятна с R_f 0,08, 0,31 и 0,46. Пятна обводили иглой и силикагель с них соскребали в центрифужные пробирки. В пробирки приливали 150 мкл 60% хлорной кислоты и выдерживали в ней 48 ч. При необходимости немедленного получения результатов пробы выдерживали при 120° С в течение 4 ч в присутствии молибдата аммония. Затем доливали 0,5 мл 5 н. КОН. После этого осторожно брали 200 мкл надосадочной жидкости, переносили в центрифужную пробирку, выпаривали для удаления остатков кислоты и далее определяли содержание неорганического фосфата с использованием малахитового зеленого [1]. Во всех анализируемых пробах фосфат идентифицировался.

Результаты и обсуждение. При нанесении на пластину более чем 0,10 мл экстракта было затруднительно получить достаточно узкую стартовую полосу, и, кроме того, при этом отмечалось запаздывание движения фронта растворителей, непосредственно элюирующих пятно от такого движения по краям полосы. Мы также не считали целесообразным упаривание экстракта, так как эта процедура значительно удлиняет время приготовления пробы и в то же время может снижать точность результатов за счет потерь ФИ при выпаривании и повторном растворении. Нанесение же меньших объемов пробы на пластину (0,01 мл и меньше) создает значительные трудности с определением неорганического фосфата.

После обнаружения липидного фосфора в полученных пятнах проводили их идентификацию путем окрашивания различными красителями [4]. Поскольку известно, что инозитсодержащие липиды окрашиваются азотнокислым серебром, проводили обработку пятен аммиачным раствором азотнокислого серебра с дальнейшим нагреванием пластин. При этом получали окрашивание в коричневый цвет пятен с R_f 0,08, 0,31 и 0,46 (см. рисунок). Для выявления местонахождения холинсодержащих липидов проводили окраску реактивом Драгендорфа, а для обнаружения серин- и этаноламинсодержащих липидов использовали ацетоновый раствор нингидрина. При этом получали окрашивание в оранжевый и розовый цвета соответственно на месте нахождения фронта растворителей.

Для того чтобы исключить наличие в месте идентификации ФИ фосфатидной кислоты и (или)



Распределение ФИ методом тонкослойной хроматографии.

а—пластина, обработанная азотнокислым серебром; б—пластина, окрашенная реактивом Драгендорфа и нингидрином.

кардиолипина, проводили дальнейшее разделение содержимого пятен в тонком слое силикагеля. Для этого силикагель с пятнами соскребали и экстрагировали их содержимое 5 мл хлороформа 2 раза, после чего упаривали до 0,1 мл в токе аргона и наносили на пластину с силикагелем, содержащим ЭДТА. Разгонку проводили в системе метанол—хлороформ—ледяная уксусная кислота—вода 45:75:3:1 [7]. После обработки пластин парами йода получали одиночное пятно. Полученное пятно обводили иглой и после улетучивания йода проводили окрашивание азотнокислым серебром. При этом отмечалось окрашивание в области, идентифицированной с помощью паров йода. В ряде случаев пятно, окрашенное азотнокислым серебром, было меньших размеров, чем окрашенное йодом. Для выяснения природы веществ, сопутствующих ФИ, силикагель с зоны, не окрашенной азотнокислым серебром, но окрашенной йодом, соскребали в пробирку и добавляли 60% хлорную кислоту в количестве, достаточном для сжигания силикагеля (около 50 мкл). Затем нейтрализовали хлорную кислоту 10 М едким кали. Из пробирки брали надосадочную жидкость, которую объединяли с реактивом для определения неорганического фосфора (16:20). Использование малых объемов было обусловлено соображениями повышения чувствительности определения, для чего использовались кюветы толщиной 0,2 см. При этом фосфор не выявлялся.

Проведенные исследования показали, что в составе пятен, идентифицированных как различные формы ФИ, отсутствуют примеси других фосфорсодержащих липидов. Кроме того, предложенная система принципиально сходна с системой В. Я. Дворкина и Г. В. Киселева [2] для выделения ФИ на бумаге, при использовании которых отмечено смещение всех фосфолипидов с фронтом растворителя. На этом основании можно думать, что и на силикагеле разделение фосфоли-

пидов происходит во многом аналогично. С учетом того что наиболее тяжелым и малоподвижным из ФИ является ТФИ, очевидно, что для него характерна наименьшая подвижность — $R_f = 0,08$, для менее тяжелого и более подвижного ДФИ — $R_f = 0,31$ и для МФИ — $R_f = 0,46$.

Таким образом, представленный метод дает возможность проводить фракционирование ФИ с использованием небольших количеств растворителей, позволяет сократить время исследований и снизить их трудоемкость.

ЛИТЕРАТУРА

1. Грибанов Г. А., Базанов Г. А. // Лаб. дело. — 1976. — № 9. — С. 527—530.
2. Дворкин В. Я., Киселев Г. В. // Вопр. мед. химии. — 1973. — № 4. — С. 431—434.
3. Дворкин В. Я., Четвериков Д. А. // Успехи соврем. биол. — 1970. — Т. 70, № 3 (6). — С. 397—412.
4. Зубер В. Л. // Методы биохимических исследований. — Л., 1982. — С. 19—24.

5. Покровский Е. А., Каргополов А. В. // Лаб. дело. — 1972. — № 6. — С. 337—341.
6. Третьяк А. Г., Лумаренко И. М. // Успехи соврем. биол. — 1978. — Т. 85, № 1. — С. 18—32.
7. Allan D., Cocckroft S. // J. Lipid Res. — 1982. — Vol. 23, № 9. — P. 1373—1374.
8. Gonzales-Sastre F., Folch-Pi J. // Ibid. — 1968. — Vol. 9, № 4. — P. 532—533.
9. Tolbert M. E. M., White A. C., Aspry K. et al. // J. biol. Chem. — 1980. — Vol. 255, № 5. — P. 1938—1941.

Поступила 15.08.93

FRACTIONATION OF PHOSPHOINOSITIDES IN THE THIN LAYER OF SILICA GEL

V. A. Uzbekov, L. B. Mareyeva, L. B. Borisova

Institute of Occupational Physiology and Hygiene, National Academy of Sciences, Republic of Kazakhstan, Alma-Ata

A procedure is described for fractionation of phosphoinositides using silica gel thin layer chromatography. The procedure may be used in routine studies as this makes it possible to isolate phosphoinositides by using only one system of solvents. The evidence for isolation of phosphoinositide fractions is discussed.

ЮБИЛЕЙ

УДК 577.1:92 БЕРЕЗОВ

ТЕМИРБОЛАТ ТЕМБОЛАТОВИЧ БЕРЕЗОВ (К 70-летию со дня рождения)



19 октября 1994 г. исполнилось 70 лет со дня рождения и 45 лет научной, научно-организационной, педагогической и общественной деятельности видного отечественного биохимика, академика Российской Академии медицинских наук и академика Международной Академии Высшей школы, заведующего кафедрой биохимии Российского университета дружбы народов им. П. Лумумбы, доктора медицинских наук профессора Темирболат Темболатович Березов.

Выходец из крестьянской семьи, с детства познавший нелегкий труд земледельца в горах Кавказа, он в 1949 г. с отличием окончил Северо-Осетинский государственный медицинский институт. Затем Т. Т. Березов учился в аспирантуре

Института биологической и медицинской химии АМН СССР. Кандидатскую диссертацию выполнил под руководством академика АН и АМН А. Е. Браунштейна, получив основательную подготовку в области азотистого обмена в норме и при патологии.

На становление и развитие Т. Т. Березова как прогрессивного ученого благотворное влияние оказали постоянные контакты, встречи и беседы с виднейшими представителями отечественной биологической науки — А. Е. Браунштейном, С. Я. Капланским, В. Н. Ореховичем, В. А. Энгельгардтом, С. Е. Севериным, С. Р. Мардашевным, С. С. Дебовым, Ю. А. Овчинниковым, А. А. Покровским, Н. А. Юдаевым и др.

Яркий талант и огромное трудолюбие проявлялись на каждой ступени творческого и профессионального роста Т. Т. Березова. В течение 10 лет он с успехом преподавал на кафедре биохимии I Московского медицинского института в качестве ассистента и доцента. Наиболее полно его творческие способности как исследователя и блестящего педагога проявились в Университете дружбы народов им. П. Лумумбы, куда он был приглашен в 1962 г. для организации кафедры биохимии на медицинском факультете. Плодотворная творческая деятельность академика Т. Т. Березова широко известна научной общественности как в России, так и за рубежом. Результаты ее представлены 50 авторскими свидетельствами на изобретения, более чем 420 опубликованными трудами и монографиями, 12 учебными пособиями, 3 базовыми учебниками по биохимии для медицинских вузов страны.

Научные интересы Т. Т. Березова охватывают широкий круг проблем в области энзимологии, медицинской химии и биохимии патологических процессов. Он внес крупный вклад в исследование биохимии опухолевого роста. Его докторская

диссертация была посвящена изучению ферментов азотистого обмена в нормальных тканях и злокачественных опухолях. Им выдвинута и экспериментально обоснована гипотеза о существовании обратной зависимости между интенсивностью роста опухоли и активностью ферментов распада аминокислот. Установлено, что лейкоциты больных лимфолейкозом лишены способности синтезировать необходимый для их существования аспарагин. В связи с этим были разработаны методы выделения и очистки аспарагиназы и глутамин(аспарагин)азы, а также предложена стратегия их применения в качестве лекарственных средств для лечения злокачественных новообразований.

Т. Т. Березовым были разработаны методы дифференциальной диагностики ракового поражения и ферментативные методы диагностики инфаркта миокарда. Цикл его работ по выделению, очистке и применению в экспериментальной химиотерапии опухолей трех бактериальных ферментов был удостоен премии имени академика В. С. Гулевича АМН СССР (1987 г.) и премии Министерства высшего образования (1989 г.).

Т. Т. Березов создал биохимическую школу, воспитал многочисленных учеников, отличающихся высоким профессионализмом. Под его руководством подготовлено около 50 докторов и кандидатов наук. Из них более 20 занимают руководящие посты в органах здравоохранения, возглавляют научно-исследовательские учреждения, кафедры медицинских институтов, руководят лабораториями как в нашей стране, так и за ее пределами.

Большой человеческий авторитет, научная эрудиция, трудолюбие, высокая гуманность Т. Т. Березова наиболее полно проявились при выполнении им ответственных научно-организационных обязанностей. Он является заместителем академика-секретаря отделения медико-биологических

наук РАМН, бессменным вице-президентом Всесоюзного (до 1992 г.), а ныне Российского биохимического общества, заместителем председателя Научного совета РАН по проблемам биохимии животных и человека, сопредседателем секции «Биохимия и молекулярная биология» ОМБН РАМН, членом редколлегии двух отечественных журналов, заместителем главного редактора отдела биохимии БМЭ и международного журнала «Biochemical Education».

Исследования Т. Т. Березова получили широкое международное признание. Тесные творческие связи с выдающимися зарубежными учеными — Д. Поратом, А. Тизелиусом, Б. Мальмстромом, А. Майстером, К. Сода — способствовали научному прогрессу на ведущих направлениях современной биологической химии. Им опубликованы в зарубежной печати 82 работы, издан на английском языке учебник, вложено много сил и энергии в подготовку молодых специалистов: ученых, врачей-биохимиков для различных стран мира. В качестве приглашенного докладчика он участвовал в работе 34 международных конгрессов и конференций по биохимии. По приглашению ряда университетов Японии, США, Мексики, Финляндии Т. Т. Березовым были прочитаны курсы лекций по научным проблемам кафедры.

Научная и педагогическая деятельность Т. Т. Березова получила заслуженное признание. За большие достижения в медицинской науке и педагогической деятельности он награжден медалью «Отличник Высшей школы» и орденом Трудового Красного Знамени.

Т. Т. Березов — человек высокой культуры, огромного обаяния, открытой души. Президиум РАМН, редколлегия журнала «Вопросы медицинской химии», коллеги и ученики горячо поздравляют Темирболату Темболовича с днем рождения и желают ему крепкого здоровья и дальнейших творческих успехов.

СОДЕРЖАНИЕ

Экспериментальные исследования

- Бондаренко Л. Б., Харченко О. В., Бутович И. А. Гормонально-активная форма витамина D₃ — 1,25-дигидроксивитамин D₃ — ингибитор лейкоцитарной липоксигеназы 2
- Герштейн Л. М., Сергутина А. В., Кукуев Л. А. Влияние отмены препаратов L-ДОФА на вызванные ими патохимические изменения двигательных структур мозга 4
- Георгиев В. Н., Дурнев А. Д., Середенин С. Б. Убихиноны и антимутагенная защита организма 8
- Колесниченко Л. С., Кулинский В. И., Ясько М. В., Екимов Е. Н., Станевич Л. М., Глушкова Е. Ф., Белогоров С. Б., Филиппова Г. Т. Влияние эмоционально-болевого стресса, гипоксии и адаптации к ней на активность ферментов метаболизма глутатиона и концентрацию глутатиона в органах крыс 10
- Козлов Ю. А., Сапрыкина Э. В., Байков А. Н., Новицкий В. В. Метаболизм нейтральных липидов в органах гемопоэза и в печени мышей с аллоксановым диабетом 12

CONTENTS

Experimental Studies

- Bondarenko, L. B., Kharchenko, O. V., Butovich, I. A. The hormonally active vitamin D₃ formulation, 1,25-dihydroxyvitamin D₃, a leukocyte lipoxigenase inhibitor 2
- Gershtein, L. M., Sergutina, A. V., Kukuev, L. A. Impact of withdrawal of L-DOPA drugs on their pathochemical alterations in brain motor structures 4
- Georgiev, V. N., Durnev, A. D., Seredenin, S. B. Ubiquinones and the body's antimutagenic defense 8
- Kolesnichenko, L. S., Kulinsky, V. I., Yasko, M. V., Ekimov, E. N., Stanevich, L. M., Glushkova, E. F., Belogorov, S. B., Filip-pova, G. T. Influence of emotional-pain stress, hypoxia and its adaptation on the activity of glutathione metabolic enzymes and glutathione concentration in rat organs 10
- Kozlov, Yu. A., Saprykina, E. V., Baykov, A. N., Novitsky, V. V. Metabolism of neutral lipids in hemopoietic organs and in the liver of mice with alloxan diabetes 12