

Архив журнала

## Вопросы медицинской химии

*ISSN 0042-8809*

1989 том 35 выпуск 3

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

## Voprosy meditsinskoï khimii

The journal archive

*ISSN 0042-8809*

1989 volume 35 issue 3

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

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

ТОМ 35

ВЫПУСК 3

МАЙ — ИЮНЬ

Двухмесячный научно-теоретический журнал

Основан в 1955 г.

# ВОПРОСЫ МЕДИЦИНСКОЙ ХИМИИ



МОСКВА · МЕДИЦИНА · 1989



## РЕДАКЦИОННАЯ КОЛЛЕГИЯ:

Главный редактор С. С. ДЕБОВ

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

## РЕДАКЦИОННЫЙ СОВЕТ:

БАЕВ А. А. (Москва)

БЕЛИЦЕР В. А. (Киев)

БЫЧКОВ С. М. (Москва)

КОНСТАНТИНОВ А. А. (Хабаровск)

КУДРЯШОВ Б. А. (Москва)

ЛЯХОВИЧ В. В. (Новосибирск)

ПАСХИНА Т. С. (Москва)

ТРОИЦКИЙ Г. В. (Симферополь)

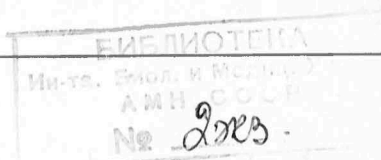
ТУРАКУЛОВ Я. Х. (Ташкент)

ТЯХЕПЫЛД Л. Я. (Тарту)

ШАПОВ В. С. (Москва)

ЯКОВЛЕВ Н. Н. (Ленинград)

ЯСАЙТИС А. А. (Вильнюс)



16. Hirata F., Axelrod J. // Science. — 1980. — Vol. 209. — P. 1082—1090.
17. Kamakla T., Oiguji S. // Diabetes. — 1983. — Vol. 32, N 7. — P. 585—591.
18. Luly P., Crifo C., Strom R. // Experientia (Basel). — 1979. — Vol. 35. — P. 1300—1301.
19. Mc Millan D. E., Utterback N. G., La Rama J. // Diabetes. — 1978. — Vol. 27, N 9. — P. 895—901.
20. Ramsey R. B. // Biochem. Soc. Trans. — 1973. — Vol. 1, N 2. — P. 341—348.
21. Resch K., Ferber E. // Immune Recognition. — New York, 1975. — P. 281—312.
22. Shinitzky M., Yuli J. // Chem. Phys. Lipids. — 1982. — Vol. 30. — P. 261—281.
23. Tilvis R. S., Miettinen T. A. // J. clin. Endocr. — 1985. — Vol. 61, N 4. — P. 741—745.
24. Vaskovsky V. E., Kostetsky E. V., Vasendin I. M. // J. Chromatogr. — 1975. — Vol. 114. — P. 129—141.

Поступила 24.05.88

## LIPIDS FROM ERYTHROCYTES OF PATIENTS WITH DIABETES MELLITUS AND DIABETIC ANGIOPATHIES

G. M. Kasimova, D. T. Mirtalipov, A. A. Abidov, Z. S. Akbarov

Institute of Regional Medicine, Ministry of Public Health of the Uzbek SSR, Tashkent

Alterations in content of neutral lipids, phospholipids and of their lysoforms were studied in erythrocyte membranes of patients with various severity of vascular impairments considering clinical manifestation of diabetes mellitus. Impairments of lipid composition in erythrocyte membranes observed correlated with the steps of diabetic angiopathies, thus considering an importance of these alterations in pathogenesis of vascular diseases of patients with diabetes mellitus.

УДК 577.112.856.04:577.152.311.086.8

Г. Г. Ковалева, И. М. Карманский

## ДЕЙСТВИЕ ХОЛЕСТЕРОЛЭСТЕРАЗЫ НА ЛИПОПРОТЕИДЫ НИЗКОЙ ПЛОТНОСТИ. ВЛИЯНИЕ МОДИФИЦИРОВАННЫХ ЛИПОПРОТЕИДОВ НА НАКОПЛЕНИЕ ХОЛЕСТЕРИНА В КУЛЬТУРИРОВАННЫХ КЛЕТКАХ

Институт биологической и медицинской химии АМН СССР, Москва

Имеются многочисленные данные, свидетельствующие о возможном участии модифицированных липопротеидов низкой плотности (ЛПНП) в патогенезе атеросклероза [2, 4]. Природа атерогенных модификаций *in vivo* неясна. Неизвестно также, в какой степени в этот процесс вовлекаются белковые и липидные компоненты ЛПНП. Не исключено, что в рецепторном и нерцепторном взаимодействии ЛПНП с клетками, ведущем к развитию атеросклеротических поражений, важную роль играют особенности липидного состава ЛПНП, в частности содержание в них неэтерифицированного холестерина. В пользу этого говорят исследования Fielding и соавт. [7], в которых показано, что обогащенные свободным холестерином ЛПНП больных сахарным диабетом легко отдают холестерин фибробластам в отличие от ЛПНП здоровых людей. Одним из способов контролируемого изменения состава ЛПНП является их обработка соответствующими ферментами [6]. В настоящей работе приведены характеристики ЛПНП, модифицированных панкреатической

холеsterolэстеразой, и исследовано влияние таких ЛПНП на содержание холестерина в культивируемых фибробластах.

### Методика

ЛПНП выделяли из сыворотки крови здоровых доноров методом ультрацентрифугирования [9]. Аналитическое ультрацентрифугирование липопротеидов проводили в двухсекторных ячейках аналитической ультрацентрифуги «Spinco-E» при скорости вращения ротора 52 640 об/мин. Угол наклона фазовой пластинки составлял 60°. Липопротеиддефицитную сыворотку (ЛПДС) человека получали с помощью препаративного ультрацентрифугирования [10]. ЛПДС диализовали против 0,15 М NaCl в 0,02 М Na-фосфатном буфере pH 7,4, стерилизовали фильтрацией через мембранный фильтр с диаметром пор 0,22 мк и хранили при -20°C.

Холестеролэстеразу выделяли из поджелудочной железы свиньи по модифицированному методу [12]. Поджелудочную железу (110 г ткани) очищали от жира, измельчали на мясорубке и смешивали с 300 мл 0,15 М К-фосфатного буфера pH 6,2, содержащего 7 мМ меркаптоэтанол и 500 мг ингибитора трипсина и соевых бобов. Фермент экстрагировали при 4°C в течение 30 мин, затем фильтровали через несколько слоев марли, суспензию смешивали с 60 г целита-545, быстро отфильтровывали на воронке Бюхнера и находящийся

на фильтре целит промывали 400 мл экстрагирующего буфера. Фильтрат охлаждали до 0 °С, добавляли равный объем 95 % этанола, охлажденного до -20 °С, выпавший осадок отделяли центрифугированием при 14 000 g и 4 °С. Осадок суспендировали в 120 мл К-фосфатного буфера pH 6,2 с 7 мМ меркаптоэтанолом, содержащего 50 мг соевого ингибитора трипсина, и перемешивали в течение 1 ч при 4 °С с 20 мл 2 % дигитонина, приготовленного, согласно [15]. После центрифугирования суспензии при 14 000 g в течение 20 мин при 4 °С надосадочную жидкость тщательно отделяли от осадка и к ней добавляли сульфат аммония до 60 % насыщения. Осадок отделяли центрифугированием при 14 000 g в течение 20 мин при 4 °С, растворяли в 25 мл 0,05 М К-фосфата pH 6,2 и пропускали через колонку с сефадексом G-25 (2,5×40 см), уравновешенным этим же раствором. Фракции, содержащие холестеролэстеразу, объединяли и наносили на колонку с ДЭАЭ-сефарозой (1,6×20 см), уравновешенной тем же раствором. Элюцию проводили линейным градиентом концентрации К-фосфатного буфера pH 6,2 (0,05—0,3 М; общий объем 500 мл). Фракции, в которых обнаруживалась активность холестеролэстеразы, объединяли, добавляли сульфат аммония до 60 % насыщения, выпавший осадок отделяли центрифугированием при 14 000 g в течение 20 мин при 4 °С, растворяли в 4 мл 0,05 М К-фосфата pH 6,2 и наносили на колонку с сефакрилом S-200 (1,6×90 см), уравновешенным 0,15 М NaCl с 0,05 М К-фосфатом pH 6,2. Фракции элюата, в которых обнаруживалась активность холестеролэстеразы, объединяли, диализовали в течение ночи против дистиллированной воды и лиофильно высушивали. Фермент хранили в течение 2 мес при 4 °С, активность при этом снижалась на 30 %.

Определение активности холестеролэстеразы проводили по ранее описанному методу [3]. За единицу активности принимали количество фермента, катализирующее образование 1 мкмоль <sup>14</sup>C-олеиновой кислоты при гидролизе холестерил-<sup>14</sup>C-олеата в описанных условиях за 1 ч.

Активность фосфолипаз A<sub>1</sub> и A<sub>2</sub> определяли по гидролизу ди-<sup>14</sup>C-пальмитоилфосфатидилхолина (112 Ки/моль, «Amersham»), «озвученного» в смеси с яичным лецитином. Экстракцию освобождаемых жирных кислот и измерение их радиоактивности проводили так же, как при определении активности холестеролэстеразы.

Активность фосфолипаз C и D определяли по гидролизу «озвученного» дипальмитоилфосфатидил-<sup>14</sup>C-холина (58 Ки/моль, «Amersham») с использованием преципитации ТХУ для отделения освобождаемых фосфо-<sup>14</sup>C-холина и <sup>14</sup>C-холина [16].

Протеолитическую активность измеряли по расщеплению казеина [11].

Гидролиз ЛПНП холестеролэстеразой проводили при 37 °С в 0,15 М NaCl с 0,05 М К-фосфатом pH 7,4. Количество фермента и ЛПНП в пробах соответствовало 0,05 ед. активности на 1 мг эфиров холестерина.

Эмбриональные фибробласты кожи человека (штамм 814; клеточный банк Института медицинской генетики АМН СССР) были любезно предоставлены группой культуры клеток Института биологической и медицинской химии АМН СССР. Использовали клетки после

14—15 пассажей. 5×10<sup>6</sup> клеток суспендировали в 20 мл среды А (среда Игла, содержащая 10 % сыворотки крупного рогатого скота, 290 мкг/мл L-глутамин, 100 ЕД/мл пенициллина, 100 мкг/мл стрептомицина). Клетки вносили в 20 стеклянных флаконов (диаметр 20 мм) и инкубировали 7 дней при 37 °С в атмосфере 5 % CO<sub>2</sub>, меняя среду каждые 3 дня. На 8-й день клетки промывали дважды средой А (без сыворотки), затем добавляли среду А, содержащую 10 % ЛПДС вместо сыворотки, и выдерживали еще сутки. Перед началом эксперимента к клеткам добавляли по 1 мл свежей среды А, содержащей 10 % ЛПДС, и необходимое количество нативных и модифицированных ЛПНП. Инкубацию вели в течение 48 ч при 37 °С в атмосфере 5 % CO<sub>2</sub>. После окончания инкубации клетки промывали 3 раза по 2 мл 0,15 М NaCl в 0,05 М Na-фосфатном буфере pH 7,4, затем 2 раза этим же раствором с добавлением альбумина (2 мг/мл) и, наконец, 2 раза буферным раствором без альбумина. Экстракцию клеточных липидов проводили в культуральных флаконах [8]. Для этого в каждый флакон после удаления промывающего буфера добавляли по 2 мл смеси гексан — изопропанол (3:2) и инкубировали 1 ч при комнатной температуре. После этого экстракт отбирали и клетки инкубировали 10 мин с 2 мл свежей смеси гексан — изопропанол. Объединенный липидный экстракт упаривали в вакууме. Во флаконах затем добавляли по 1 мл 0,1 н. NaOH и белковый преципитат растворяли сутки при комнатной температуре. Аликвоты полученного раствора использовали для определения клеточного белка по методу Лоури [13]. Этим же методом измеряли содержание белка в ЛПНП.

Определение свободного холестерина (СХ) в ЛПНП проводили ферментативным колориметрическим методом [5] с использованием набора реактивов фирмы WAKO (Япония). Для определения общего холестерина в этот набор добавляли холестеролэстеразу фирмы «Boehringer» (ФРГ). Содержание этерифицированного холестерина (ЭХ) в ЛПНП рассчитывали по разнице между общим холестерином и СХ. Определение СХ и ЭХ в липидном экстракте клеток проводили аналогичным образом. Перед анализом липидный экстракт растворяли в изопропанол, содержащем 10 % тритона X-100.

## Результаты и обсуждение

Очищенный препарат холестеролэстеразы не содержал заметных примесей фосфолипаз A<sub>1</sub>, A<sub>2</sub>, C и D и был лишен протеолитической активности. Удельная активность холестеролэстеразы, определенная по расщеплению холестерил-<sup>14</sup>C-олеата при pH 6,6 в присутствии с 6 мМ холата Na, составляла 0,59 ед/мг. В отсутствие холата фермент сохранял 15 % исходной активности. Это позволило в дальнейшем проводить гидролиз ЛПНП холестеролэстеразой в отсутствие холата, т. е. в условиях, исключающих структурные изменения ЛПНП, вызываемые детергентами.

При инкубации ЛПНП с холестеролэстеразой происходило уменьшение содержания в пробах эфиров холестерина и увеличение содержания СХ. За 4 ч инкубации прирост СХ составлял 4—12 % (для разных препаратов ЛПНП), убыль эфиров холестерина за это же время колебалась в интервале 1,5—5,3 %. Увеличение времени гидролиза до 18 ч не приводило к дальнейшему приросту содержания СХ. Полученные данные свидетельствуют о доступности эфиров холестерина нативных ЛПНП (в отсутствие детергентов) для действия холестеролэстеразы. Эти данные трудно объяснить, если придерживаться структурной модели ЛПНП, согласно которой все молекулы эфиров холестерина находятся в «ядре» частиц ЛПНП [1]. Однако исследование ЛПНП методом фазовых диаграмм свидетельствуют о поверхностной локализации определенной доли эфиров холестерина в ЛПНП [14]. Обнаруженный нами гидролиз эфиров холестерина в ЛПНП холестеролэстеразой также говорит о поверхностном расположении части молекул эфиров холестерина в ЛПНП. Приблизительная оценка содержания эфиров холестерина в наружном слое ЛПНП, полученная нами (около 5 %), близка величине, полученной методом фазовых диаграмм [14].

При аналитическом ультрацентрифугировании ЛПНП, подвергнутых обработке холестеролэстеразой, не обнаружено заметных изменений скорости флотации или формы пика на флотационных диаграммах в растворе плотностью 1,063 г/мл. Добавление 5 % обезжиренного альбумина из сыворотки крови человека («Calbiochem», США) приводило к замедлению скорости флотации модифицированных ЛПНП, обусловленному, очевидно, сорбцией на альбумине жирных кислот, освободившихся в результате гидролиза эфиров холестерина.

Анализ модифицированных ЛПНП, выделенных из инкубационной среды ультрацентрифугированием в растворе плотностью 1,063 г/мл, показал, что липопротеиды полностью отделяются от содержащейся в инкубационной среде холестеролэстеразы. Ферментативная активность при этом выявлялась лишь в инфранатанте.

В липопротеидах, выделенных ультрацентрифугированием из опытных и

Таблица I  
Состав нативных и модифицированных ЛПНП

Препарат	ЛПНП	Весовое отношение	
		СХ/белок	ЭХ/белок
1	Нативные	0,65	1,64
2	Модифицированные	0,58	1,35
	Нативные	0,78	1,89
	Модифицированные	0,82	1,53

контрольных проб после инкубации, определяли содержание белка, свободного и этерифицированного холестерина, затем рассчитывали величины весовых отношений СХ/белок, ЭХ/белок. Данные, полученные для двух препаратов ЛПНП, обработанных различными препаратами фермента, приведены в табл. I. Как видно, потери эфиров холестерина в результате модификации холестеролэстеразой существенно выше 5 %, т. е. выше максимального уровня гидролиза, регистрируемого при анализе инкубационной среды. Увеличения отношения СХ/белок, соответствующего степени гидролиза, не наблюдалось. Механизм обнаруженных изменений не вполне ясен. Эти изменения могут быть связаны с «уходом» определенной части СХ и ЭХ из ЛПНП или могут отражать увеличение содержания белка в ЛПНП (например, в результате сорбции холестеролэстеразы из инкубационной среды). Последнее маловероятно, поскольку, с одной стороны, аналитическое ультрацентрифугирование не выявляет изменения плавучей плотности модифицированных ЛПНП, а с другой, — как говорилось выше, холестеролэстераза полностью отделяется от ЛПНП в процессе ультрацентрифугирования. Более вероятным объяснением падения величин отношений СХ/белок и ЭХ/белок представляется «уход» части липидов из модифицированной ЛПНП. Можно думать, что гидролиз эфиров холестерина, расположенных в поверхностном слое ЛПНП, ведет к образованию избытка СХ, который не удерживается частицами ЛПНП и «уходит» с поверхности. Вместе с СХ частицы ЛПНП теряют, по-видимому, некоторое количество эфиров холестерина из гидрофобного «ядра». Подтверждением последнего предположения служит тот факт, что отношение ЭХ/СХ в модифицированных ЛПНП, выделенных ультрацентрифугировани-

Содержание холестерина и его эфиров в фибробластах после инкубации с ЛПНП

Концентрация модифицирован- ных ЛПНП, мкг/мл	Весовое отношение		Концентрация нативных ЛПНП, мкг/мл	Весовое отношение	
	СХ/белок	ЭХ/белок		СХ/белок	ЭХ/белок
6,25	17,13±0,39	3,14±0,51	7,3	17,74±2,90	3,03±1,35
12,50	19,54±0,36	4,23±2,00	14,6	17,00±3,32	1,81±0,77
18,75	20,54±0,37	10,16±0,69	21,9	18,64±2,17	3,91±0,49

ем из инкубационной среды, ниже такового, полученного при анализе цельной инкубационной среды (1,87 и 2,39 соответственно для препарата 2; табл. 1).

Модифицированные ЛПНП в дальнейшем были использованы в опытах на культуре клеток. Из данных, представленных в табл. 2, следует, что содержание СХ в клетках не зависит от вида добавленных в культуру ЛПНП и их концентрации в среде. Содержание ЭХ в клетках возрастало с увеличением концентрации ЛПНП, причем при инкубации с модифицированными ЛПНП клетки накапливали больше эфиров холестерина, чем при инкубации с нативными ЛПНП (при одинаковой их концентрации в среде).

Таким образом, полученные данные говорят о том, что панкреатическая холестеролэстераза в отсутствие детергентов гидролизует до 5 % эфиров холестерина, расположенных скорее всего в поверхностном слое ЛПНП. Появляющийся избыток СХ, очевидно, «уходит» из ЛПНП вместе с некоторым количеством эфиров холестерина из гидрофобного «ядра». Инкубация фибробластов с ферментно модифицированными ЛПНП ведет к внутриклеточному накоплению больших количеств эфиров холестерина, чем инкубация с нативным ЛПНП. В настоящее время трудно судить о механизме избыточного накопления эфиров холестерина. Можно предположить, что нарушение нормальных взаимоотношений между СХ и его эфирами в ЛПНП ведет к изменению структуры липопротеидов и способствует более активному транспорту холестерина в клетки.

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Карманский И. М., Левитова Е. Н., Шпиктер В. О. // Успехи биол. химии. — 1975. — Т. 16. — С. 89—114.
2. Климов А. Н., Никульчева Н. Г. Липопротеиды, дислипидопротендемии и атеросклероз. — Л., 1984.

3. Ковалева Г. Г., Карманский И. М. // Вопр. мед. химии. — 1985. — № 1. — С. 130—134.
4. Шпиктер В. О. // Там же. — 1987. — № 4. — С. 2—8.
5. Allain C. C., Poon L. S., Chan C. S. G. et al. // Clin. Chem. — 1974. — Vol. 20, N 4. — P. 470—475.
6. Cardin A. D., Ranganathan S., Hirose N. et al. // Biochemistry (Wash.). — 1986. — Vol. 25. — P. 5263—5269.
7. Fielding C. J. // J. Lipid Res. — 1984. — Vol. 25. — P. 1624—1628.
8. Hara A., Randin N. S. // Analyt. Biochem. — 1978. — Vol. 90. — P. 420—426.
9. Havel R. J., Eder H. A., Bragdon J. H. // J. clin. Invest. — 1955. — Vol. 34. — P. 1345—1353.
10. Knight B. L., Soutar A. K. // Biochem. J. — 1982. — Vol. 202. — P. 145—152.
11. Kunitz M. // J. gen. Physiol. — 1947. — Vol. 30. — P. 291.
12. Labow R. S., Adams K. A. H., Lynn K. R. // Biochim. biophys. Acta. — 1983. — Vol. 749. — P. 32—41.
13. Lowry O. H., Rosebrough N. J., Farr A. L., Randall R. J. // J. biol. Chem. — 1951. — Vol. 193. — P. 265—275.
14. Miller K. W., Small D. M. // Ibid. — 1983. — Vol. 258. — P. 13772—13784.
15. Momsen W. E., Brockman H. L. // Biochim. biophys. Acta. — 1977. — Vol. 486. — P. 103—113.
16. Nakanishi M. // Biochem. biophys. Res. Commun. — 1985. — Vol. 132. — P. 582—590.

Поступила 21.04.88

#### EFFECT OF CHOLESTEROL ESTERASE ON LOW DENSITY LIPOPROTEINS. ACCUMULATION OF CHOLESTEROL BY CULTIVATED CELLS IN A MEDIUM CONTAINING MODIFIED LIPOPROTEINS

G. G. Kovaleva, I. M. Karmansky

Institute of Biological and Medical Chemistry,  
Academy of Medical Sciences of the USSR,  
Moscow

Up to 5 % of cholesterol esters were hydrolyzed after incubation of blood serum low density lipoproteins (LDL) with pancreatic cholesterol esterase free of proteinases and phospholipase activity in absence of detergents. The surface layer of the lipoprotein particles appears to contain about 5 % of cholesterol esters. More active intracellular accumulation of cho-



lesterol esters was found in fibroblasts cultivated in a medium containing modified LDL as compared with cultivation in presence of native LDL. Deterioration of normal interrela-

tions between free cholesterol and its esters appears to be responsible for alterations in the LDL structure and contributed to more active transport of cholesterol into cells.

УДК 616.33-002.44-07:616.33-018.73-008.939.15-39-074

*В. Д. Пасечников*

## ПЕРЕКИСНОЕ ОКИСЛЕНИЕ ЛИПИДОВ, ФЕРМЕНТНАЯ АНТИОКИСЛИТЕЛЬНАЯ СИСТЕМА И СОДЕРЖАНИЕ КИСЛОЙ ФОСФАТАЗЫ В СЛИЗИСТОЙ ОБОЛОЧКЕ ЖЕЛУДКА ПРИ ЯЗВЕННОЙ БОЛЕЗНИ

Ставропольский медицинский институт

В механизмах повреждения слизистой оболочки желудка (СОЖ) при язвенной болезни существенную роль могут играть процессы перекисного окисления липидов (ПОЛ), приводящие к повреждению лизосомальных структур клеток [8, 14]. К факторам, способствующим развитию реакций ПОЛ, относят снижение функциональной активности многокомпонентной антиокислительной системы (АОС) клеток и тканей [5, 12].

Имеются немногочисленные исследования, указывающие на участие лизосомальных ферментов в развитии нарушений внутриклеточного метаболизма при язвенной болезни. Показано, что высвобождение лизосомальных ферментов в ответ на воздействие уксусной кислотой, этанолом, приводит к деструкции клеток, появлению острых эрозий и язв СОЖ [1, 37]. Клинические исследования указывают, что в СОЖ наряду с активацией лизосомальных ферментов определялись признаки дегенерации органелл [7, 9, 15]. Авторы делают вывод о причинной обусловленности повреждений в результате взаимодействия лизосомальных энзимов с элементами мембран этих субклеточных образований.

Целью настоящей работы было исследование содержания кислой фосфатазы — КФ (маркера лизосом) в сопоставлении с образованием в СОЖ больных язвенной болезнью перекисных продуктов и компонентов АОС в разные фазы течения заболевания.

### Методика

Обследовано 53 больных язвенной болезнью желудка (44 мужчины и 16 женщин) в возрасте от 22 до 57 лет с локализацией язвы

в области тела желудка. В период обострения в ходе гастродуоденоскопического исследования производили прицельную биопсию из краев язвы и периаульцерозной области. С наступлением ремиссии биоптаты получали из зоны формирующегося рубца и окружающей слизистой. Помимо обычного гистологического исследования часть биоптатов фиксировали в жидком азоте для последующего определения продуктов ПОЛ, факторов АОС и КФ.

Содержание продуктов ПОЛ определяли спектрофотометрически по характерным максимумам поглощения в ультрафиолетовом спектре растворов липидов в смеси метанол — гептан (5:1). При 233 нм регистрировали диеновые конъюгаты (ДК), при 273 нм — диенкетоны (К) по [18, 22]. Липиды из биопсийных образцов экстрагировали хлороформ-метанольной смесью (2:1) с добавлением антиоксиданта инола (1 мг на 100 мл смеси). Количество липидов определяли гравиметрически. Результаты выражали в единицах оптической плотности ( $E_{233}$  и  $E_{273}$ ) на 1 мг липидов в 3 мл смеси метанол — гептан. Состояние АОС оценивали по показателям активности супероксиддисмутазы — СОД [3, 30], глутатионпероксидазы — ГП [33], глутатионредуктазы — ГР [5] и концентрацией восстановленной (TSH) и окисленной (GSSG) форм глутатиона [2]. Активность ГР оценивали по кинетике окисления НАДФ·Н<sub>2</sub>, количество которого эквивалентно убыли GSSG в инкубационной смеси в ходе его восстановления ферментом. Активность ГП оценивали в системе, сопряженной с активностью ГР, добавленной в среду инкубации: для расчета использовали кинетику окисления НАДФ·Н<sub>2</sub>, количество которого убывало эквивалентно GSSG, образующемуся в ходе разложения H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> в реакционной среде. Для определения активности ферментов биоптаты предварительно гомогенизировали в трис-HCl буфере pH 7,4 при 0°C в гомогенизаторе Поттера — Эльвейса (стекло — стекло). Активность ферментов определяли по изменению оптической плотности образцов на регистрирующем спектрофотометре «Beckman UV-2504» (США). Активность СОД выражали в условных единицах активности (У) на 1 мг белка гомогената, ГП и ГР — в наномолях окисленного в реакции НАДФ·Н<sub>2</sub> за 1 мин на 1 мг белка, GSH и GSSG — в наномолях на 1 мг белка. Ввиду нестабильности субстрата за 1 У активности принимали, согласно [30], количество СОД, требуемое для