

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

Архив журнала

## **Вопросы медицинской химии**

*ISSN 0042-8809*

1989

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

Archive of journal

## **Voprosy meditsinskoi khimii**

*ISSN 0042-8809*

1989

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

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

ТОМ 35

БЫПУСК 5

СЕНТЯБРЬ — ОКТЯБРЬ

Двухмесячный научно-теоретический журнал

Основан в 1955 г.



МОСКВА · МЕДИЦИНА · 1989

# ВОПРОСЫ МЕДИЦИНСКОЙ ХИМИИ



## РЕДАКЦИОННАЯ КОЛЛЕГИЯ:

Главный редактор С. С. ДЕБОВ

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

## РЕДАКЦИОННЫЙ СОВЕТ:

БАЕВ А. А. (Москва)  
БЫЧКОВ С. М. (Москва)  
КОНСТАНТИНОВ А. А. (Хабаровск)  
КУДРЯШОВ Б. А. (Москва)  
ЛЯХОВИЧ В. В. (Новосибирск)  
ПАСХИНА Т. С. (Москва)

ТРОИЦКИЙ Г. В. (Симферополь)  
ТУРАКУЛОВ Я. Х. (Ташкент)  
ТЯХЕПЫЛД Л. Я. (Тарту)  
ЯКОВЛЕВ Н. Н. (Ленинград)  
ЯСАЙТИС А. А. (Вильнюс)

# EFFECTIVE PROCEDURE FOR SIMULTANEOUS ISOLATION AND PURIFICATION OF TISSUE KALLIKREIN AND ACID STABLE TRYPSIN INHIBITOR FROM URINE

L. S. Lobareva, L. V. Platonova, S. E. Rabinovich, M. V. Palyulina, T. S. Paskhina

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

A simple preparative procedure is developed for simultaneous isolation from urine of tissue

kallikrein and acid stable trypsin inhibitor. The procedure involved adsorption of these proteins on chitosan at pH 5-6 and the subsequent elution with 1 N  $\text{NH}_4\text{OH}$ , which enabled to obtain the enzyme and inhibitor with a yield of 80-90 % and to purify 10-fold each of these components. Use of chitosan facilitated and simplified distinctly the large scale isolation from urine of the kallikrein and trypsin inhibitor, required for medicinal and diagnostic purposes.

УДК 612.351.1:577.115.3].06:612.592].08

В. А. Терновой, В. М. Яковлев

## ВЛИЯНИЕ ПОНИЖЕННЫХ ТЕМПЕРАТУР НА СОСТАВ ЖИРНЫХ КИСЛОТ В ПЛАЗМАЛОГЕННЫХ И ДИАЦИЛЬНЫХ ФОРМАХ ФОСФОЛИПИДОВ В ТКАНИ ПЕЧЕНИ КРЫС

Институт физиологии и экспериментальной патологии высокогорья АН Киргизской ССР,  
г. Фрунзе

При воздействии различных факторов внешней среды (гипоксия, тепло, холод и др.) и при патологических состояниях (сердечно-сосудистые заболевания, голодание, гепатиты, колиты и др.) в тканях появляются биологически активные метаболиты глицерофосфолипидов — продукты перекисного окисления липидов, простагландины, плазмалогенные формы фосфолипидов [1, 8]. Плазмалогенным формам фосфолипидов отводят некую, пока неясную, роль в формировании адаптивного ответа [2, 3, 5—7]. Возможно, это связано с тем, что плазмалогены повышают стабильность и текучесть мембран, снижают их поверхностный потенциал [1]. Арахидоновая кислота, входящая в структуру плазмалогенов, служит субстратом для синтеза высокоактивных простагландинов, тромбоксанов, непосредственно участвующих в процессе адаптации [1]. Дальнейшее изучение структуры фосфолипидов, а также соотношения в них плазмалогенных и диацильных форм, их жирнокислотного состава, возможно, внесет ясность в понимание функциональной роли плазмалогенов при воздействии на организм различных условий среды.

В данной работе мы изучали жирнокислотный состав плазмалогенных и диацильных форм фосфатидилэтаноламина (ФЭ) и фосфатидилхолина (ФХ) в ткани печени крыс при

акклиматизации к различным пониженным температурам.

### Методика

Белые лабораторные крысы-самцы массой  $130 \pm 10$  г были разделены на группы: контрольную, содержащуюся при  $25^\circ\text{C}$  ( $n=6$ ), и подопытные группы, подвергавшиеся 2-недельной экспозиции при  $10^\circ\text{C}$  ( $n=6$ ) и  $3^\circ\text{C}$  ( $n=6$ ) соответственно. За 1 мес до начала эксперимента и в течение всего времени экспозиции животные получали стандартный сухой корм *ad libitum*. Животных декапитировали. Липиды из ткани печени извлекали по методу [4]. Для разделения диацильной плазмалогенной форм фосфолипидов плазмалогены разрушали парами  $\text{HCl}$ , а образовавшуюся смесь альдегидов, диацильной и лизо-форм фосфолипидов разделяли методом тонкослойной хроматографии [9]. Жирные кислоты (ЖК) метилировали и анализировали методом газожидкостной хроматографии на фоне средней полярности *Carbowax 20 M*, при температуре колонок  $180^\circ\text{C}$ . Площадь полученных пиков подсчитывали на регистрирующем интеграторе И-02. Полученные пики идентифицировали путем сравнения времен удержания исследованных образцов со стандартными ЖК или по таблицам времен удержания.

### Результаты и обсуждение

Из табл. 1 видно, что 2-недельная акклиматизация крыс к  $10^\circ\text{C}$  вызвала увеличение доли ненасыщенных ЖК в диацильной форме ФЭ с 43,2 до 72,8 % (в процентах к сумме ЖК). Насыщенные и менее ненасыщенные ЖК  $\text{C}_{20:0}$  и  $\text{C}_{20:2}$ , составляющие при  $25^\circ\text{C}$  примерно 21 %, заменяются при  $10^\circ\text{C}$  полиненасыщен-

Таблица 1

Жирнокислотный состав (в процентах к сумме ЖК) диацильной (I) и плазмалогенной (II) форм ФЭ в ткани печени при акклиматизации крыс к различным температурам

Жирные кисло- ты	I		II		
	25 °C	10 °C	25 °C	10 °C	3 °C
10:0		1,7±0,1		47,4±1,8	
12:0				3,3±0,6	0,4±0,1
14:0		0,9±0,1			0,9±0,1
15:0		0,7±0,1		8,9±0,5	
16:0	8,3±0,3	8,3±0,3	18,1±1,4	1,1±0,1*	26,9±1,6*
16:1			8,8±0,7		10,0±0,9
17:0	7,5±0,5	4,0±0,5*	10,9±0,8	0,8±0,1*	4,9±0,2*
17:1			5,0±0,2		2,4±0,3
18:0		5,2±0,2	15,9±1,2	2,2±0,3*	0,8±0,1*
18:1	6,2±0,4	2,6±0,2*	1,4±0,1	2,1±0,2	сл
18:2		3,4±0,4	14,8±1,1	2,5±0,4	3,3±0,5
18:3	5,8±0,4		1,8±0,1	4,9±0,5*	2,0±0,1
18:6					10,2±0,6
20:0	8,7±0,4			0,2±0,1	сл
20:1		0,5±0,1		сл	2,4±0,2
20:2	12,4±1,1		1,2±0,1	0,5±0,1	2,1±0,2
20:3ω6				0,8±0,1	1,1±0,1
20:4ω6	11,6±1,3	21,3±1,6*	15,0±1,3	3,4±0,4*	10,3±1,0*
20:4ω3		2,1±0,2		0,4±0,1	2,2±0,1
20:5ω3		3,2±0,1		0,2±0,1	0,7±0,1
21:0		1,3±0,1	7,2±0,4		
21:2	18,7±0,9				2,8±0,6
22:0	20,7±1,2				0,9±0,4
22:2					2,4±0,3
22:3			Следы		0,7±0,1
22:4ω6		31,0±1,6		7,4±0,5	8,2±0,5
22:5ω6		2,4±0,3		7,4±0,6	1,4±0,1
22:5ω3				1,4±0,1	
22:6ω3		6,4±0,4		0,5±0,1	1,5±0,1
23:0	11,6±1,3	5,1±0,3*		4,1±0,3	1,2±0,1
Насыщенные	56,8	27,2	52,1	68,3	36,1
Ненасыщенные	43,2	72,8	47,9	31,7	63,9

Примечание. Здесь и в табл. 2 —  $n = 6$ ; звездочка —  $p < 0,01$ .

ными  $C_{20:4}$  и  $C_{20:5}$  (около 25 % от суммы ЖК). Количество минорных ЖК растет с 10 до 17. Уменьшается количество нечетных ( $C_{17:0}$ ,  $C_{21:2}$ ,  $C_{23:0}$ ), но появляются в следовых количествах короткоцепочечные ЖК. Длина углеводородных цепей изменяется незначительно: с  $C_{21}$  до  $C_{20}$ .

Как и в диацильных формах ФЭ, акклиматизация к пониженным температурам ведет к увеличению числа минорных ЖК в плазмалогенах с 12 до 21 при 10 °C и до 26 при 3 °C, к уменьшению числа нечетных ЖК с 23,1 до 13,8 % при 10 °C и 11,3 % при 3 °C.

Вместе с тем динамика плазмалогенов ФЭ свидетельствует о различиях адаптивного ответа на воздействие различных степеней температурного фактора. Если при 10 °C средняя длина углеводородных цепей падает с  $C_{17}$  до  $C_{12}$ , то при 3 °C она не изменяется ( $C_{18}$ ).

При 10 °C в плазмалогенном ФЭ процент ненасыщенных ЖК убывает с 47,9 до 31,7 (за счет уменьшения доли ЖК  $C_{22:4}$ ,  $C_{22:5}$ ,  $C_{22:6}$ ), а при 3 °C нарастает до 63,9 %, преимущественно за счет ЖК  $C_{18:4}$ .

Из табл. 2 следует, что для диацильных форм ФХ в еще большей степени, чем для ФЭ диацильного характера, увеличение доли ненасыщенности ЖК при акклиматизации к низким температурам: с 16,4 до 80,3 % при 10 °C и до 73,9 % при 3 °C, в основном за счет полиненасыщенных длинноцепочечных  $C_{22:4}$ ;  $C_{22:5}$ ;  $C_{22:6}$ .

Число минорных кислот ФХ при 10 °C практически не изменяется, а при 3 °C возрастает с 14 до 22.

В отличие от диацильных форм ФЭ, уже имеющих исходную длину углеводородных цепей  $C_{20}$ , в ФХ, содержащем преимущественно короткоцепочечные ЖК при 25 °C, адаптация

Т а б л и ц а

Жиринокислотный состав (в процентах к сумме ЖК) диацильной (I) и плазмалогенной (II) форм ФХ в ткани печени при акклиматизации крыс к различным температурам

Жирные кисло- ты	I			II	
	25 °C	10 °C	3 °C	10 °C	3 °C
8:0	42,6±1,6	14,7±1,1*			
10:0	20,2±1,2	0,6±0,1*			
12:0	13,3±0,9	0,5±0,1*	18,2±0,7*		
14:0			0,4±0,1	0,7±0,1	10,8±0,7*
15:0		0,5±0,1	2,3±0,4	5,1±0,3	
16:0	6,3±0,2	0,6±0,1*	2,0±0,2*	3,9±0,3	5,2±0,5
17:0		0,6±0,1		4,9±0,1	6,1±0,2
17:1					1,7±0,1
18:0	1,2±0,1	0,3±0,1	15,0±1,2*	1,7±0,1	3,9±0,5*
18:1			16,4±1,5	2,6±0,3	1,1±0,1
18:2	0,6±0,1		3,0±1,0*	2,9±0,1	0,9±0,1*
18:3	1,1±0,1		1,9±0,1	5,9±0,2	2,1±0,2*
19:0				1,5±0,1	0,9±0,1
20:0		0,4±0,1	1,4±0,1	5,7±0,2	
20:1		0,4±0,1	0,7±0,1	6,5±0,4	2,4±0,1
20:2	0,6±0,1	2,6±0,3*	6,1±0,3*	0,2±0,1	2,6±0,5*
20:3ω6			3,7±0,1		7,0±0,8
20:4ω6	5,7±0,6	29,7±1,7*	5,8±0,2	14,7±1,6	9,4±1,0
20:4ω3	1,0±0,1				
20:5ω3		0,8±0,1	2,8±0,2	23,5±1,5	
21:0				9,0±1,0	
21:2			2,1±0,2		
22:0		1,6±0,1	0,5±0,1	5,5±1,1	
22:1					3,7±0,2
22:3			3,3±0,2		6,1±0,3
22:4ω6	2,7±0,2	33,0±1,6*	1,4±0,2	0,8±0,1	2,3±0,3*
22:5ω6	1,1±0,1	5,5±0,5*	8,2±0,9*	0,5±0,1	11,1±1,3*
22:5ω3	Следы				
22:6ω3	0,9±0,1	8,1±0,1*	2,8±0,4*		34,5±2,1
23:0			3,5±0,3	1,0±0,1	
Насыщенные	83,6	19,7	26,1	39,1	26,9
Ненасыщенные	16,4	80,3	73,9	60,9	73,1

к 10 °C ведет к резкому увеличению длины углеводородных цепей с C<sub>8-10</sub> до C<sub>20-21</sub> и значительному — при 3 °C — до C<sub>18</sub>. Адаптация к 3 °C ведет к появлению в диацильных формах ФХ до 8 % нечетных ЖК.

И для ФХ плазмалогенного, как и для его диацильных форм, характерен высокий процент полиненасыщенных ЖК при акклиматизации к низким температурам. Однако в отличие от диацильной формы большое содержание (21 % от суммы ЖК) нечетных ЖК в ФХ плазмалогенном обнаруживается при 10 °C. Число короткоцепочечных ЖК в плазмалогенном ФХ, как и в его диацильной форме, при 10 °C и 3 °C снижено; более 50 % ЖК составляют кислоты с длиной углеводородной цепи C<sub>20-22</sub>. Причем при 3 °C более половины всех ЖК в плазмалогенном ФХ приходится на полиненасыщенные

C<sub>22:5ω6</sub> и C<sub>22:6ω3</sub>, тогда как при 10 °C этих кислот практически нет.

Таким образом, обнаружены существенные различия адаптивного ответа при различных степенях воздействия температурного фактора среды. Следует заметить, что функциональное значение изменений длины, четкости и нечеткости углеводородных цепей ЖК в диацильных и плазмалогенных формах фосфолипидов, а также изменений качественного состава их ЖК пока остается неясным.

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Вельтищев Ю. Е., Юрьева Э. А., Воздвиженская Е. С. // *Вопр. мед. химии*. — 1987. — № 2. — С. 2—9.
2. Дембицкий В. М. // *Журн. эволюц. биохим.* — 1981. — № 3. — С. 296—298.
3. Карасев В. А. // *Структура, биосинтез и превращение липидов в организме животного и человека*. — Л., 1972. — С. 64—65.

4. Кейтс М. Техника липидологии: Пер. с англ. — М., 1975.
5. Крепс Е. М. // Физиология и биохимия морских и пресноводных животных. — Л., 1979. — С. 3—21.
6. Круглова Э. Э. // Там же. — 1985. — № 4. — С. 411—413.
7. Круглова Э. Э. // Журн. эволюц. биохим. — 1987. — № 5. — С. 582—587.
8. Куликов В. Ю., Ким Л. Б. Кислородный режим при адаптации человека на Крайнем Севере. — Новосибирск, 1987.
9. Horrocks L. A., Sun G. Y. // Research Methods in Neurochemistry / Ed. N. Merks, R. Rodnight. — New York, 1972. — Vol. 1. — P. 223—231.

Поступила 09.03.88

# COMPOSITION OF FATTY ACIDS IN PLASMALOGEN AND DIACYL FORMS OF PHOSPHOLIPIDS FROM RAT LIVER TISSUE UNDER CONDITIONS OF LOW TEMPERATURES

V. A. Ternovoi, V. M. Yakovlev

Institute of Physiology and Experimental Pathology of Alpine Regions, Academy of Sciences of the Kirghiz SSR, Frunze

Content of unsaturated fatty acids was increased in rat liver phospholipids under conditions of low temperatures: +10° and +3° within 2 weeks. At the same time, length of hydrocarbonic chains, even and odd orders of fatty acids and content of minor acids were altered in plasmalogen and diacyl forms of liver tissue phospholipids. These alterations were distinctly dissimilar under various temperature conditions.

УДК 616.311-002.289-085.272.4.014.425-036.8-07:[616.155.3-008.931:577.152.3]

Ю. А. Петрович, А. Л. Машкиллейсон, Г. Г. Сулейманова, А. И. Лагунов

## ВЛИЯНИЕ АНТИОКСИДАНТОВ НА АКТИВНОСТЬ КИСЛЫХ ГИДРОЛАЗ ЛЕЙКОЦИТОВ КРОВИ БОЛЬНЫХ ЛЕЙКОПЛАКИЕЙ СЛИЗИСТОЙ ОБОЛОЧКИ ПОЛОСТИ РТА

Московский стоматологический институт

Активность ферментов нейтрофилов периферической крови изменяется при многих патологических состояниях, включая воспалительные заболевания, инфаркт миокарда, дерматозы, предрак и злокачественные опухоли [1, 3, 5, 14, 16]. Разные воздействия вызывают в лейкоцитах однотипные изменения кислородзависимого метаболизма с генерацией супероксиданиона, гидроксильного радикала и пероксида водорода [4, 6], накопление которых может приводить к онкотрансформации клетки [7]. Активные формы кислорода, генерируемые фагоцитами при воспалении, могут участвовать в канцерогенезе [18].

В связи с этим целью работы было изучение влияния антиоксидантов на активность кислых гидролаз, щелочной фосфатазы и лейцинаминопептидазы лейкоцитов крови у больных лейкоплакией, которую относят к фактативному предраку слизистой оболочки рта.

### Методика

Обследовали 43 больных в возрасте 28—76 лет (36 мужчин и 7 женщин) и определяли активность ферментов у них до лечения. У 26 больных была плоская форма заболева-

ния, у 17 — веррукозная с поражением красной каймы нижней губы, слизистой оболочки щек, углов рта, подъязычной области. У 22 больных диагностировано по 1 лейкоплакическому очагу, у 21 — по 2 очага. Все больные курили сигареты или папиросы. Из сопутствующих заболеваний у 2 больных была гипертоническая болезнь, у 1 — туберкулез легких, у 4 — язвенная болезнь желудка и двенадцатиперстной кишки, у 14 — хронический гастрит, у 1 — хронический холецистит, у 1 — хронический колит, у 1 — дискоидная красная волчанка, у 1 больного — хронический бронхит. Для сравнения были однократно обследованы 43 здоровых человека в возрасте 22—40 лет, из них 22 женщины и 21 мужчина. 10 мл крови у больных брали не только до, но и после лечения из локтевой вены, выделяли лейкоцитарную фракцию путем центрифугирования и гемолитического шока, повторного центрифугирования и растворения осадка в 0,9 % растворе хлорида натрия.

Активность свободных гидролитических ферментов определяли путем гидролиза специфических субстратов: β-галактозидазу — с p-нитрофенил-β-D-галактопиранозидом, pH 4,0; β-N-ацетилгексозаминидазы А и В — с p-нитрофенил-N-ацетил-β-D-глюкозаминидом, pH 4,0; β-глюкуронидазу — с 4-нитрофенил-β-D-глюкуронидом, pH 4,0; катепсин В — с α-N-бензоил-аргинин-β-нафтиламидом, pH 5,0; катепсин С — с гли-фен-2-нафтиламидом, pH 5,0, как описано в работе [2]. Активность лейцинаминопептидазы определяли с субстратом диметилбензальдегидом, pH 10,15 [12], щелочной фосфатазы, pH 10,5, — с p-нитрофенилфосфатом [9]. Активность ферментов выражали в наномолях в 1 мин на 1 мг белка.