

Архив журнала

Вопросы медицинской химии

ISSN 0042-8809

1990

Том 36 выпуск 2

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

1990

Volume 36 issue 2

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>

38. *Steinbrecher U. P., Witztum J. L.* // *Diabetes*.— 1984.— Vol. 33, N 2.— P. 130—134.
39. *Steinbrecher U. P., Witztum J. L., Kesaniemi Y. A., Elan R. L.* // *J. clin. Invest.*— 1983.— Vol. 71, N 4.— P. 960—964.
40. *Stout W.* // *Atherosclerosis*.— 1981.— Vol. 1, N 4.— P. 227—234.
41. *Turk Z., Scrabalo Z.* // *Cell. molec. Biol.*— 1987.— Vol. 33, N 3.— P. 345—354.
42. *Vlassara H., Brownlee M., Cerami A.* // *Diabetes*.— 1983.— Vol. 32.— P. 670—674.
43. *Vlassara H., Brownlee M., Cerami A.* // *J. exp. Med.*— 1986.— Vol. 164.— P. 1301—1309.
44. *Vlassara H., Brownlee M., Cerami A.* // *Diabetes*.— 1988.— Vol. 37, N 4.— P. 456—461.
45. *Witztum J. L., Fisher M., Pietro T. et al.* // *Ibid.*— 1982.— Vol. 31, N 11.— P. 1029—1032.
46. *Witztum J. L., Mahoney E. M., Branks M. J. et al.* // *Ibid.*— N 4.— P. 283—291.
47. *Witztum J. L., Steinbrecher U. P., Fisher M., Kesaniemi A.* // *Proc. nat. Acad. Sci. USA.*— 1983.— Vol. 80, N 9.— P. 2757—2761.
48. *Witztum J. L., Steinbrecher U. P., Kesaniemi J. A., Fisher M.* // *Ibid.*— 1984.— Vol. 81.— P. 3204—3208.
49. *Wiklund O., Witztum J. L., Carew T. E. et al.* // *J. Lipid Res.*— 1987.— Vol. 28.— P. 1098—1109.
50. *Yue D. K., McLennan S., Turtle J. R.* // *Diabetologia*.— 1983.— Vol. 24, N 5.— P. 377—381.

Поступила 29.01.89

GLYCOSYLATED LIPOPROTEINS AS AN ATHEROGENOUS FACTOR IN DIABETES

T. V. Denisenko

Institute of Experimental Medicine, Academy of Medical Sciences of the USSR, Leningrad

Data on the role of glycosylated lipoproteins in atherogenesis are reviewed. Posttranslational modification of proteins involving nonenzymatic glycosylation occurred under conditions of normal state but the highest rate of these reactions was found in hyperglycemia (diabetes). Glycosylation, after blocking of the ϵ -amino group in lysyl residue in protein moiety of lipoproteins, transformed distinctly the physico-chemical and metabolic properties of apoproteins, as a result of which normal catabolism of lipoproteins was impaired. Reactions of glycosylation are mainly responsible for pathogenetic interrelationship between diabetes and atherosclerosis. Glycosylation of lipoproteins may contribute to development of atherosclerosis via autoimmunity mechanisms.

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 1990

УДК 616.379-008.64-092.9-07:1616.36-018.1:576.3141-008.939.6:577.125.53

К. Г. Карагезян, Л. М. Овсепян, К. Г. Адонц

ОКИСЛИТЕЛЬНЫЕ ПРОЦЕССЫ И ОБМЕН ФОСФОЛИПИДОВ В МЕМБРАННЫХ СТРУКТУРАХ ГЕПАТОЦИТОВ ПРИ АЛЛОКСАНОВОМ ДИАБЕТЕ

Институт экспериментальной биологии АН Армянской ССР, Ереван

В настоящее время сахарный диабет стал одним из наиболее распространенных заболеваний, чем объясняется возросший интерес к проблеме исследования механизмов его возникновения и развития. С этой точки зрения представляют интерес результаты изучения некоторых звеньев углеводно-липидного метаболизма, в частности свободных жирных кислот, триглицеридов, холестерина, фосфолипидов [2, 5]. Учитывая важную роль окислительных процессов в обеспечении нормальной жизнедеятельности клетки, в настоящей работе исследовали процессы дыхания и

окислительного фосфорилирования, перекисного окисления липидов, реакции гидроксирования, а также качественные и количественные изменения в составе фосфолипидов как в нормально функционирующей, так и в патологической ткани печени крыс с аллоксановым диабетом.

Методика

Эксперименты выполнены на 100 белых беспородных крысах обоего пола, содержащихся на общевиварном рационе. Диабет вызывали внутрибрюшинным введением аллоксана (15 мг на 100 г массы тела). Показателями развития заболевания служили высокий уровень гипергликемии и глюкозурии. Количественное определение глюкозы в крови проводили ортотолуидиновым методом, в моче — по реакции Феллинга. В опыт брали животных на 20-й день после введения аллоксана и с уровнем сахара в крови не менее 11 ммоль/л. Животных забивали под легким эфирным наркозом.

При изучении окислительного фосфорилирования в зависимости от уровня сахара в крови животные были разделены на следующие группы: Д1 — диабет средней тяжести ($17,5 \pm 2,7$ ммоль/л); Д11 — тяжелый диабет ($30,25 \pm 4,4$ ммоль/л). Гомогенизирование печеночной ткани проводили в среде, содержащей 0,25 М сахарозу и 0,01 М трис-НС1-буфер (рН 7,4).

Субклеточные органеллы отделяли методом дифференциального центрифугирования. После 3-кратной промывки митохондрий их подвергали осмотическому шоку и центрифугировали в градиенте плотности сахарозы [10].

Фракционирование индивидуальных фосфолипидов проводили методом одномерной восходящей ТСХ в системе растворителя: хлороформ — метанол — аммиак (65 : 35 : 5). Содержание неорганического фосфора определяли по методу Бартлета [7].

Измерение дыхания и окислительного фосфорилирования митохондрий гепатоцитов проводили полярографическим методом, как описано в работе [3].

Показателем активности процесса свободнорадикального окисления липидов служил уровень накопления малонового диальдегида [1].

Об интенсивности течения процесса п-гидроксирования анилина судили по реакции образования п-аминофенола [4], спектрофотометрическое определение количественного содержания цитохромов b_5 и P-450 проводили по методу [9].

Результаты и обсуждение

Используя модель аллоксанового диабета, мы учитывали сведения о токсическом действии аллоксана на биологические системы и механизмы регуляции клеточной активности. Многолетний опыт работы с моделями изученной патологии показал, что на протяжении первых 7—10 дней имеет место отчетливое проявление эффектов самого аллоксана. В последующем с развитием истинной картины сахарного диабета, связанной с гибелью β -клеток, происходит исчезновение токсического действия аллоксана при наличии достаточно выраженной гипергликемии. Поэтому приведенные в статье фактические данные являются отражением метаболических отклонений в липидном метаболизме, характерных для сахарного диабета и развивающихся приблизительно спустя 3 нед после введения аллоксана.

Как видно из табл. 1, в условиях аллоксанового диабета происходит статистически достоверное увеличение суммарного количества фосфолипидов во внутренней мембране митохондрий с соответствующими сдвигами в уровне их индивидуальных представителей. Среди последних наиболее отчетливо возрастание во внутренней мембране содержания фосфатидилсеринов, лизофосфатидилолинов, сфингомиелинов, кардиолипинов и, наоборот, уменьшение суммарного количества фосфолипидов в наружной мембране, обусловлен-

Содержание суммарных и индивидуальных фосфолипидов в микросомах и митохондриях печени у крыс с аллоксановым диабетом (в мкг линидного фосфора на 1 мг сухой фракции)

Фосфолипиды	Митохондриальная фракция		Наружная мембрана митохондрий		Внутренняя мембрана митохондрий		Микросомальная фракция	
	контроль	диабет	контроль	диабет	контроль	диабет	контроль	диабет
Монофосфоинозитиды	1,33±0,09	2,18±0,08*	1,26±0,06	0,71±0,02*	1,08±0,06	1,92±0,20*	1,47±0,07	1,19±0,02*
Лизофосфатидилхолины	1,23±0,03	2,43±0,04*	1,43±0,09	2,10±0,09*	0,69±0,02	1,35±0,13*	1,65±0,13	2,07±0,08*
Сфингомиелины	2,21±0,08	3,06±0,07*	2,07±0,01	0,96±0,09*	1,19±0,05	2,12±0,21*	2,67±0,09	3,22±0,12*
Фосфатидилхолины	3,68±0,11	4,53±0,12*	3,51±0,15	1,43±0,08*	2,82±0,08	3,45±0,14*	4,94±0,17	6,81±0,22*
Фосфатидилсерины	1,83±0,12	3,78±0,09*	1,74±0,06	1,13±0,05*	1,38±0,04	3,38±0,15*	2,64±0,25	4,48±0,37*
Фосфатидилэтаноламины	2,02±0,06	3,23±0,12*	1,29±0,08	1,05±0,04*	2,42±0,13	3,80±0,19*	3,00±0,17	4,99±0,11*
Кардиолипиды	2,95±0,13	3,97±0,12*	1,73±0,10	1,27±0,09*	2,56±0,13	4,34±0,25*	—	—
Всего	15,25	23,18	13,03	8,75	12,14	20,36	16,37	22,65

Примечание. Представлены средние ($M \pm m$) данные 8—9 опытов. Звездочка — $p < 0,05—0,001$.

ное преимущественно убылью содержания фосфатидилсеринов, сфингомиелинов, монофосфоинозитидов.

Как известно, кардиолипинам придается важное значение в структурной организации мембран митохондрий. Если фосфатидилхолины и фосфатидилэтаноламины удаляются из митохондрий сравнительно легко, то этого нельзя сказать о кардиолипинах, которые оказываются прочно связанными и не удаляются даже под воздействием органических растворителей [6]. В митохондриях указанным липидам отводится важное место как факторам, участвующим в регуляции активности ферментных систем дыхательной цепи. Обнаруженное нами при аллоксановом диабете заметное увеличение содержания кардиолипидов, очевидно, направлено на поддержание работы митохондрий при изученной патологии.

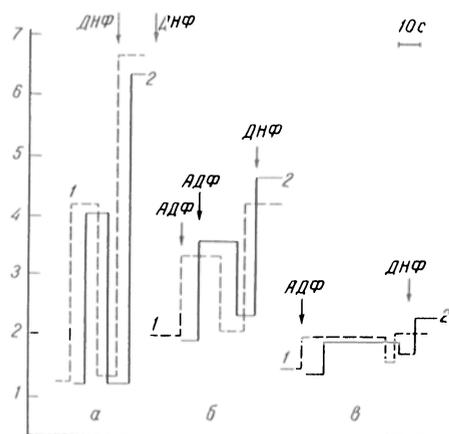
Существенный интерес представляет также изучение при диабете природы и особенностей изменения фосфолипидного спектра микросомальной фракции клеток печени. Согласно результатам некоторых исследований [11], меченые фосфолипиды митохондрий и микросом проявляют способность к взаимному обмену без нару-

шения целостности собственных мембран. По нашим наблюдениям, в микросомальной фракции печеночной ткани белых крыс с аллоксановым диабетом имеет место достоверное увеличение общего количества фосфолипидов, главным образом за счет возрастания содержания фосфатидилсеринов, фосфатидилэтаноламинов, фосфатидилхолинов. Описанные отклонения мы не склонны объяснять активированием в микросомах процессов фосфатиогенеза с последующим переносом фосфолипидов с помощью соответствующих липидтранспортующих белков в митохондрии, где они накапливаются в их внутренней мембране и, вероятно, активно вовлекаются в тканевые окислительные процессы в качестве потенциальных источников энергии.

В условиях острого нарушения процессов утилизации глюкозы, характерного для сахарного диабета, происходят серьезные нарушения в нормальном функционировании дыхательной цепи митохондрий, которая была изучена на таких субстратах окисления, как янтарная кислота и комплекс янтарная + глутаминовая кислоты.

Проведенные наблюдения свидетельствуют о заметном снижении скоростей дыхания: V_2 , V_3 и V_p — при одновременном повышении скорости V_4 и вследствие этого о заметном снижении дыхательного коэффициента с удлинением времени фосфорилирования, что указывает на торможение АТФ-синтезирующей функции митохондрий (см. рисунок). По мере усиления патологического процесса происходит углубление указанных нарушений. Как отмечалось выше, при диабете фосфолипиды вовлекаются в тканевые окислительные процессы в качестве субстратов окисления. Однако в результате усиленного расщепления жирных кислот в клетке накапливаются недоокисленные продукты, которые могут стать своеобразными центрами инициации реакций свободнорадикального окисления липидов. Эти процессы были изучены нами в аскорбат- и НАДФ·Н-зависимых системах перекисления липидов в цельных митохондриях, их наружных и внутренних мембранах, а также в микросомах (табл. 2). В отмеченных мембранных структурах происходит активизация процессов перекисления липидов, особенно в наружной мембране митохондрий.

В настоящее время существует мнение о необходимости рассматривать роль перекисного окис-



Изменение энергообмена (субстраты: 1 — янтарная кислота, 2 — янтарная + глутаминовая кислоты) митохондрий печени у интактных животных (а), крыс с аллоксановым диабетом средней (б) и тяжелой формы (в).

По ось ординат — скорость дыхания (в шагах O₂/с на 1 мг белка).

Содержание малонового диальдегида в микросомах и митохондриях печени крыс с аллоксановым диабетом (в нмоль на 1 мг белка)

Перекисное окисление	Митохондриальная фракция		Наружная мембрана митохондрий		Внутренняя мембрана митохондрий		Микросомальная фракция	
	контроль (n=10)	диабет (n=10)	контроль (n=10)	диабет (n=9)	контроль (n=10)	диабет (n=8)	контроль (n=10)	диабет (n=10)
Аскорбатзависимое <i>p</i>	10,81±1,12	19,35±1,03	7,56±0,98	16,68±1,13	5,02±0,98	8,35±0,75	16,25±1,50	25,55±2,00
НАДФ·Н-зависимое <i>p</i>	9,08±1,02	14,06±1,30	5,52±0,82	8,96±0,76	5,09±1,30	7,95±0,98	15,41±2,30	23,70±1,80
		<0,001		<0,001		<0,05		<0,001
		<0,02		<0,001		<0,25		<0,001

Таблица 3

Содержание цитохромов b₅ и P-450 и интенсивность гидроксилирования анилина в микросомах печени крыс с аллоксановым диабетом (в нмоль на 1 мг белка)

Показатель	Контроль (n=9)	Диабет (n=9)
Пара-аминофенол <i>p</i>	4,12±0,33	2,48±0,22
Цитохром b ₅ <i>p</i>	0,56±0,05	0,42±0,04
Цитохром P-450 <i>p</i>	0,81±0,06	0,44±0,04
		<0,001

ления липидов в развитии патологического состояния в неразрывной связи с изучением другого класса реакций микросомального окисления — реакций гидроксилирования. Этот процесс был изучен нами на примере окисления субстрата II типа — анилина — при одновременном контроле за количественным содержанием цитохромов b₅ и P-450. Проведенные наблюдения показали, что у крыс с аллоксановым диабетом реакция гидроксилирования протекает намного медленнее, чем у интактных животных. Эти сдвиги сопровождаются также заметным снижением содержания цитохромов b₅ и P-450 (табл. 3).

Интенсификация процессов перекисного окисления липидов при диабете, приводящая к значительному выходу продуктов свободнорадикального окисления липидов, оказывает повреждающее действие на мембраны эндоплазматического ретикулума и главным образом на активность цитохромов b₅ и P-450, являющихся мембранно-связанными липидзависимыми компонентами окислительной цепи.

Таким образом, комплекс патогенетических изменений, происходящих при диабете в печени, обусловлен существенными нарушениями в окислительных процессах, что позволяет правильно понять молекулярный механизм возникновения диабета и, следовательно, изыскать пути оптимизации лечебно-профилактических мероприятий, среди которых немаловажное значение будет иметь применение средств антирадикальной защиты биологических систем клетки.

ЛИТЕРАТУРА

1. Владимиров Ю. А., Арчаков А. И. Перекисное окисление липидов в биологических мембранах. — М., 1972. — С. 241—242.
2. Карагезян К. Г., Варганян Г. С., Бадалян М. Г. // Бюл. эксп. биол. — 1980. — № 12. — С. 679—681.
3. Карагезян К. Г., Овсепян Л. М., Адонц К. Г. и др. // Биол. журн. Армении. — 1985. — № 7. — С. 570—575.

4. Карузина И. И., Арчаков А. И. // Современные методы в биохимии. — М., 1977. — С. 56—57; 60—61.
5. Тиракулов Я. Х., Саатов Т. С., Исаев Э. И. и др. // Пробл. эндокринологии. — 1979. — № 2. — С. 54—67.
6. Awasthi J. C., Chuang T. F., Keenan T. W. et al. // Biochem. biophys. Res. Commun. — 1970. — Vol. 39, N 5. — P. 822—832.
7. Bartlett G. R. // J. biol. Chem. — 1959. — Vol. 234, N 3. — P. 466—468.
8. Lowry O. H., Rosebrough N. J., Farr A. L., Randall R. J. // Ibid. — 1951. — Vol. 193, N 1. — P. 265—275.
9. Omura T., Sato R. // Ibid. — 1964. — Vol. 239, N 7. — P. 2370—2378.
10. Shanailman C., Erwich W., Greenawalt J. U. // J. cell. Biol. — 1967. — Vol. 32, N 3. — P. 719—721.
11. Wojtczak L., Baranska I. et al. // Biochim. biophys. Acta. — 1971. — Vol. 249, N 1. — P. 41—52.

Поступила 13.06.89

OXIDATIVE REACTIONS AND PHOSPHOLIPIDS METABOLISM IN HEPATOCYTE MEMBRANES UNDER CONDITIONS OF ALLOXANE DIABETES

K. G. Karagezyan, L. M. Ovsepyan, K. G. Adontz

Institute of Experimental Biology, Academy of Sciences of the Armenian SSR, Yerevan

Total content of phospholipids and their individual components were distinctly increased in microsomal, mitochondrial fractions and in inner mitochondrial membrane of rat hepatocytes under conditions of alloxane diabetes. The concentrations of these substances were decreased in outer mitochondrial membrane. Activation of lipid free-radical oxidation was found in all the membrane structures studied. In microsomal fraction of hepatocytes the rate of hydroxylation reaction was decreased, accompanied by a decrease in content of cytochromes b₅ and P-450.

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 1990

УДК 615.919:598.12|015.4:612.115|707

И. Б. Калмыкова, О. Б. Зайченко, Э. С. Садыков, Н. А. Барабанщикова, Л. Я. Юкельсон

ГЕМОКОАГУЛЯЦИОННАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА ЯДА ЩИТОМОРДНИКА AGKISTRODON HALYS HALYS И ЕГО ТРОМБИНОПОДОБНОЙ ФРАКЦИИ

НИИ гематологии и переливания крови Минздрава Узбекской ССР, Институт биохимии АН Узбекской ССР, Ташкент

Использование протеиназ змеиных ядов для целей медицинской коагулологии неоднократно обсуждалось в литературе [5, 6]. В качестве препаратов таких протеиназ применялись цельные яды змей, описаны методические приемы использования их для диагностики некоторых нарушений свертывания крови [1]. При детальном анализе