

## СОСТАВ И БИОЛОГИЧЕСКИЕ ЭФФЕКТЫ IN VITRO ЛИПИДОВ, ПОЛУЧЕННЫХ ИЗ СРЕДНЕМОЛЕКУЛЯРНОЙ ФРАКЦИИ ПЛАЗМЫ КРОВИ ЖИВОТНЫХ С ЭНДОТОКСЕМИЕЙ

В.В. Новочадов

Кафедра патологической анатомии ВолГМУ

Липиды, по современным понятиям, формируют специфическое окружение для многих транспортных белков и ферментов клеточных мембран, лимфы и плазмы крови, что во многом определяет функциональную активность паренхиматозных клеток [2, 6-12]. Ранее нами в остром опыте было показано, что при эндотоксемии в плазме крови происходит параллельное изменение содержания липидов и ВСММ, в том числе их липид-содержащих фракций [4, 5].

### МЕТОДИКА ИССЛЕДОВАНИЯ

Для исследования были использованы экстракты, полученные из плазмы венозной крови 9 интактных морских свинок и от 9 животных спустя 12 ч после введения внутривенного введения 2 мг/кг массы липополисахарида *S. typhi* (LPS - Sigma, USA). Подготовка суспензии липидов включало в себя экстракцию смесью хлороформ-этанол (1:1), лиофилизацию под вакуумом и ресуспензирование в изотоническом растворе хлорида натрия, объем которого соответствовал первоначальному объему плазмы. Аналогичным образом получали липиды из веществ средней молекулярной массы (ВСММ) плазмы крови, выделенных методом гель-фильтрации [3] на колонке с сефадексом G-25 (Pharmacia, Sweden). Липидный состав плазмы крови и фракции ВСММ определен при помощи тонкослойной хроматографии на пластинках «Силуфол» (Cavalier, Чехия) в соответствии с инструкциями производителя. Были выделены фракции фосфолипидов, триглицеридов, свободных жирных кислот (СЖК), холестерина и его эфиров.

Проагрегантная активность липидов исследована на лазерном агрегатографе Биола (Россия). В качестве эталонного индуктора был использован фактор активации тромбоцитов («Sigma», USA) в конечной концентрации  $10^{-5}$  М, для оценки активности липидов рассчитывали отношение максимальной амплитуды агрегации к аналогичному показателю при прибавлении TAF. Для определения влияния липидных экстрактов на свертывание, фибринолиз и свойства эритроцитов *in vitro* по 0,1 мл различных суспензий липидов прибавляли к 0,9 мл контрольной плазмы, инкубировали при 37 °С в течение 1 мин и использовали в соответствующих тест-системах. Тромбопластическую активность оценивали по соотношению времени рекальцификации модельной системы с аналогичным показателем при использовании кефалина («Sigma», USA) в конечной концентрации  $10^{-4}$  М. Влияние на активность

плазмина оценивали по приросту ПДФ в модельной тест-системе, содержащей диспергированный зуглобулиновый сгусток в конечной концентрации 4 г/л белка. Индуцированную скорость оседания эритроцитов, как показатель седиментационной (суспензионной) стабильности эритроцитов, определили во взвеси отмытых эритроцитов с модельным гематокритом 25%. Интенсивность спонтанного гемолиза оценивали по нарастанию концентрации свободного гемоглобина, определяемую бензидиновой реакцией [1]. Конечные концентрации липидов во всех тест-системах составляли  $10^{-4}$  –  $10^{-6}$  М.

### РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Как показали проведенные исследования, в составе ВСММ находилось 37,7% всех липидов плазмы крови интактных животных и 67,2% - липидов плазмы крови животных с ЭТ ( $P < 0,001$ ). Изменения состава липидов плазмы крови, характерные для ЭТ (увеличение содержания фосфолипидов, СЖК при некотором уменьшении содержания триглицеридов и степени эстерификации холестерина) затрагивали и липиды ВСММ: в них в 5,75 раза возрастало содержание фосфолипидов, в 4,4 раза – СЖК, в 2,06 раза – триглицеридов (все  $P < 0,001$ ). Параллельно в составе ВСММ уменьшалось содержание холестерина и его эфиров (табл. 1, рис 1).

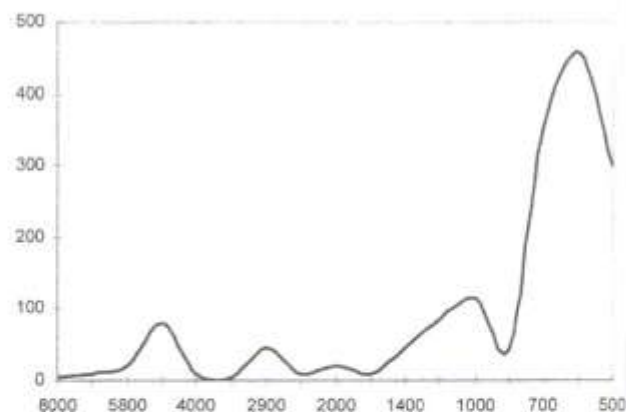


Рисунок 1.  
Содержание липидов в составе веществ средней молекулярной массы, выделенных из плазмы крови животных с острым эндотоксикозом.

По оси абсцисс — молекулярная масса фракции, по оси ординат — оптическая плотность раствора при определении липидов фосфорнованилиновым методом.

Как видно из данных табл. 2, липиды, выделенные из плазмы крови интактных животных, облада-

Таблица 1

Содержание и состав липидов плазмы крови и фракции ВСММ, выделенной из плазмы крови интактных морских свинок и животных с эндотоксемией (M+m)

ПОКАЗАТЕЛЬ	Плазма крови		Фракция ВСММ	
	Интактные животные	Эндо-токсемия	Интактные животные	Эндо-токсемия
Общие липиды, г/л	2,73 ± 0,13	3,14 ± 0,21*	1,03 ± 0,12	2,11 ± 0,15
Фосфолипиды, ммоль/л	1,07 ± 0,06	1,49 ± 0,16*	0,20 ± 0,03	1,15 ± 0,21*
Триглицериды, ммоль/л	1,14 ± 0,10	0,88 ± 0,12*	0,17 ± 0,01	0,35 ± 0,04*
Свободные жирные кислоты, мкг/л	0,04 ± 0,01	0,25 ± 0,03*	0,05 ± 0,01	0,22 ± 0,04*
Холестерин, ммоль/л	1,50 ± 0,12	1,64 ± 0,14	0,65 ± 0,08	0,45 ± 0,05*
Эфиры холестерина, моль/л	2,24 ± 0,17	1,77 ± 0,20	0,55 ± 0,05	0,48 ± 0,06

Таблица 2

Влияние липидов, выделенных из плазмы крови интактных морских свинок и животных с эндотоксемией, на различные звенья системы гемостаза и физико-химические свойства эритроцитов

Конечные Концентрации липидов	Плазма крови		Фракция ВСММ	
	Интактные животные	Эндо-токсемия	Интактные животные	Эндо-токсемия
Агрегация тромбоцитов (FAT, 10 <sup>-7</sup> M – 100%)				
10 <sup>-4</sup> M	7,5 ± 1,1	45,0 ± 4,2 *	0	33,5 ± 2,9 *
10 <sup>-5</sup> M	0	22,0 ± 1,7*	0	16,3 ± 0,9 *
10 <sup>-6</sup> M	0	0	0	0
Тромбопластическая активность (кефалин 10 <sup>-4</sup> M – 100%)				
10 <sup>-4</sup> M	72,5 ± 6,7	112,5 ± 9,5 *	64,0 ± 5,1	94,7 ± 8,9 *
10 <sup>-5</sup> M	59,2 ± 5,3	97,5 ± 7,8 *	36,5 ± 2,9	77,5 ± 6,2 *
10 <sup>-6</sup> M	9,1 ± 1,1	29,0 ± 3,0 *	8,3 ± 1,0	25,1 ± 2,4 *
Фибринолитическая активность (нативная плазма крови - 32,6 ± 1,8 мКат/л)				
10 <sup>-4</sup> M	17,0 ± 1,2	11,4 ± 1,0*	12,0 ± 1,1	6,0 ± 0,8*
10 <sup>-5</sup> M	28,1 ± 2,2	24,5 ± 2,7	19,0 ± 2,0	17,5 ± 1,6
10 <sup>-6</sup> M	32,5 ± 3,2	33,1 ± 3,0	30,5 ± 2,9	27,3 ± 2,7
Спонтанный гемолиз (физ. p-p – 2,05 ± 0,18%)				
10 <sup>-4</sup> M	2,26 ± 0,20	4,05 ± 0,27*	2,70 ± 0,25	5,75 ± 0,41*
10 <sup>-5</sup> M	2,03 ± 0,19	2,74 ± 0,22*	2,19 ± 0,19	3,31 ± 0,30
10 <sup>-6</sup> M	2,04	2,14 ± 0,20	2,10 ± 0,18	2,17 ± 0,18
Индукцированная скорость оседания эритроцитов (физ. p-p - 100%)				
10 <sup>-4</sup> M	85,4 ± 6,0	145,8 ± 15,0*	80,3 ± 6,0	160,4 ± 14,1*
10 <sup>-5</sup> M	93,4 ± 6,0	121,0 ± 11,7*	95,2 ± 8,1	133,6 ± 12,5*
10 <sup>-6</sup> M	101,5 ± 6,5	105,0 ± 5,7	96,5 ± 9,3	97,3 ± 10,5

ли слабой проагрегантной активностью, практически в 6000 раз меньшей, чем TAF. Она выявлялась при эффективной концентрации  $10^{-4}$  М. При ЭТ проагрегантный эффект липидов существенно возрастал и эффективные концентрации липидов составляли уже  $10^{-5}$  М, хотя даже и в этом случае их эффект был почти на два порядка меньше, чем у TAF. Липиды ВСММ обладали сходной, но несколько меньшей проагрегантной активностью. Даже у интактных животных липиды плазмы крови обладали умеренным прокоагулянтным действием, соответствующим около 70% активности кефалина. При развитии ЭТ способность липидов, полученных из плазмы крови животных, уменьшать время рекальцификации плазмы крови интактных животных, возрастала в 1,55 раза. Липиды ВСММ обладали несколько меньшей тромбопластической активностью, ее изменения при ЭТ имели ту же выраженность и направленность.

Липиды, и в особенности липидная фракция ВСММ, обладали способностью угнетать фибринолиз в нативной плазме крови. Эта способность возрастала при ЭТ и регистрировалась у экстрактов в концентрации  $10^{-4}$  –  $10^{-5}$  М. Максимально при действии липидов ВСММ фибринолиз угнетался более чем в 5 раз.

При добавлении к отмытым эритроцитам суспензии липидов, полученных из плазмы крови интактных липидов интенсивность спонтанного гемолиза не изменялась, а при добавлении липидов (концентрация  $10^{-5}$  М) от животных с ЭТ – возрастала в 1,79 раза. Особенно выраженный гемолитический эффект был обнаружен у липидов, выделенных из ВСММ плазмы крови животных с ЭТ, что свидетельствует об их мембранотоксических свойствах.

Липиды плазмы и фракция ВСММ вызывала незначительное уменьшение индуцированной скорости оседания эритроцитов (в пределах 20%). При добавлении к взвеси липидов, полученных от животных с ЭТ, скорость оседания эритроцитов, напротив, увеличивалась. Этот эффект присутствовал при концентрациях липидов  $10^{-4}$  –  $10^{-5}$  М и был в большей степени выражен у липидов ВСММ.

#### ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Полученные данные подтверждают тот факт, что липиды, в избытке находящиеся в плазме крови при ЭТ – достаточно биологически активные вещества. Они обладают проагрегантным действием, тромбопластическим и антиплазминовым эффектами, способны оказывать неблагоприятное действие на физико-химические свойства и мембранную стабильность эритроцитов. Фракция липидов, находящаяся в составе средномолекулярной фракции плазмы крови при ЭТ является в этом отношении наиболее активной среди плазменных липидов, что частично объясняет хорошо известные токсические свойства ВСММ.

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Камышников В.С. Руководство по клинико-биохимической лабораторной диагностике. В 2 т. - Минск, 2000. - Т. 1. - 495 с.
2. Климов А.Н., Никульчева Н.Г. Обмен липидов и липопротеидов и его нарушения: Рук-во для врачей. - СПб: Питер Пресс, 1999. - 505 с.
3. Малахова М.Я. Метод оценки эндогенной интоксикации. - СПб., 1995. - 72 с.
4. Новочадов В.В. Патология липидного обмена при эндотоксикозе: Автореферат дисс. ... доктора мед. наук. - Волгоград, 2001. - 35 с.
5. Новочадов В.В., Писарев В.Б. // Вестник Волгоградской медицинской академии. - N5. - Волгоград, 1999. - С. 15-17.
6. Ajmone C.M.A., De-Simone R., Nicolini A., Minghetti L. // J. Neurochem. - 2003. - Vol. 84, N2. - P. 413-416.
7. Osterud B., Elvevoll E.O., Brox J., Olsen J.O. // Blood Coagul. Fibrinolysis. - 2002. - Vol. 13, N5. - P. 399-405.
8. Garcia-Verduga I., Wang G., Floros J., Casals C. // Biochemistry. - 2002. - Vol. 41, N47. - P. 14041-14053.
9. Sato K., Kadiiska M.B., Ghio A.J., et al. // FASEB J. - 2002. - Vol. 16, N13. - P. 1713-1720.
10. Luckey S.W., Taylor M., Sampey B.P., et al. // J. Pharmacol. Exp. Ther. - 2002. - Vol. 302, N1. - P. 296-303.
11. Wurfel M.M., Wright S.D. // J. Immunol. - 1997. - Vol. 158, N8. - P. 3925-3934.
12. Neyrinck A.M., Taper H.S., Gevers V., et al. // J. Hepatol. - 2002. - Vol. 36, N4. - P. 466-473.

#### SUMMARY

It was shown for lipids had been extracted from middle molecular fraction of blood plasma to may activate platelet aggregation (1), coagulation (2), depress the fibrinolysis (3), and change physico-chemical properties of RBC (4). These values were strongly increased due to experimental endotoxemia, the effect to suspend stability of erythrocytes turned to alternative