

6. Abita J., Chicheportliche R., Schvetz H., Lazdunsky M. *Biochemistry*, v. 16, №9, p. 1838—1864, 1977.
7. Yost D. A., Anderson B. M. *J. Biol. Chem.*, v. 257, p. 767—777, 1982.
8. Oberdorster L., Lung R., Zimmer R. *Eur. J. Pharmacol.*, v. 3¹, p. 197—204, 1975.
9. Haddy T. J., Scott J. B. *Physiol. Rev.*, v. 48, p. 688—707, 1968.
10. May H. D., Daly V. W. *Pharmacol. Rev.*, v. 8, p. 65—79, 1976.
11. Daziel K. — In: *Enzymes* (ed. Boyer P. P.), p. 166, Academic Press, N. Y., 1975.
12. Subramaniam S., Ross P. D. *Biochemistry*, v. 17, p. 2192—2197, 1978.
13. Кучмеровская Т. М., Пархомец П. К., Чичковская Г. В., Халимрадов А. Р., Романская О. П. *Нейрохимия*, т. 4, № 4, с. 373—378, 1985.
14. Арутюнян А. В., Мовсесян Н. О., Урианджян М. Г., Бурназян Л. Б. *Нейрохимия*, т. 3, № 1, с. 41—46, 1984.

Поступила 10. IX 1986

УДК 547.953+612.115+591.481+612+646

ЛИПИДЗАВИСИМОСТЬ ТРОМБОПЛАСТИНОВ ГОЛОВНОГО МОЗГА, РЕГУЛИРУЮЩИХ ГЕМОКОАГУЛЯЦИЮ

КАРАГЕЗЯН К. Г., МКРТЧЯН М. Е., ОВАКИМЯН С. С.

Институт биохимии АН АрмССР, Ереван

Продемонстрирована зависимость гемокоагуляционной активности тромбопластинов ткани головного мозга развивающегося куриного эмбриона и мембран эритроцитов больных острым инфарктом миокарда от фосфолипидов, поддерживаемая эндогенным α -токоферолом в физиологической концентрации. Установлена также стабильность существующего в норме постоянства соотношений между нейтральными и кислыми фосфолипидами, оказывающими соответственно активирующее и ингибирующее воздействие на интенсивность свертывания крови.

Тромбопластины представляют собой сложные вещества липопротендной природы, содержание которых в головном мозгу достигает значительных величин; их истинное биологическое значение до настоящего времени остается неразгаданным. Имея самое непосредственное отношение к процессу свертывания крови, тромбопластины, по всей вероятности, наделены и рядом других функциональных свойств, пока плохо изученных.

При возбужденных состояниях у собак методом определения артерио-венозной разницы показано повышение свертываемости крови, оттекающей от головного мозга, ее тромбопластической (ТП) активности [1, 2] и содержания в ней фосфолипидов (ФЛ) и холестерина [3—8] при соответствующих отклонениях в СМЖ [9, 10]. Аналогичные отклонения были обнаружены и при одностороннем удалении верхнего шейного симпатического ганглия [11, 12], экспериментально вызванных внут-

рисосудистых тромбозах [13—16], на различных стадиях эмбрионального развития организма [17], наряду с соответствующими расстройствами как в целом мозгу, так и в его отдельных частях [18, 19].

Цель настоящего исследования состояла в выявлении взаимозависимости между динамикой развития ТП-активности и количественными сдвигами функционально различных категорий ФЛ—нейтральных и кислых—в головном мозгу куриного эмбриона в предплодный и плодный периоды его становления, протективной роли α -токоферола (α -Т), направленной на поддержание нормального набора ФЛ, необходимого для обеспечения активности соответствующих липидзависимых ферментов, катализирующих начальные этапы процесса фосфатидогенеза.

Материалы и методы

Определение ТП-активности ткани мозга производили по модифицированной нами методике [20], основанной на измерении времени (в секундах протромбинового времени) образования сгустка тромбина *in vitro* в буферной (трис-НСI) среде при 37° и рН 7,4; укорочение времени тромбообразования расценивали как повышение ТП-активности. Экстракцию ФЛ производили по Folch [21], их фракционирование—методом одномерной восходящей хроматографии на бумаге Filtrak FN-11 (ГДР), пропитанной кремневой кислотой по Marinetti и Stulzy [22] в модификации Смирнова и соавт. [23] и Карагезяна [24]. Определение активности глицерокиназы, глицерофосфатдегидрогеназы в прямой и обратной реакциях осуществляли по методике Kennedy [25].

Результаты и обсуждение

Предплодный период развития куриного эмбриона (8—12-й дни эмбриогенеза) характеризуется образованием мозга на 8-й день при отсутствии в нем ТП-активности, незначительным увеличением (на 15—20%) суммарного количества ФЛ преимущественно за счет нейтральных (фосфатидилхолинов, лизофосфатидилхолинов, сфингомиелинов и фосфатидилэтанолламинов) при противоположно направленных сдвигах содержания кислых ФЛ (фосфатидилсеринов, фосфатидилинозитов, кардиолипинов, фосфатидных кислот). Слабое проявление ТП-активности в ткани мозга эмбриона (110 с протромбинового времени) обнаруживалось на 14-й день развития, то есть в самом начале плодного периода, охватывающего 14—19-е дни эмбриогенеза. Эти изменения совпадали с увеличением содержания кислых и, особенно, нейтральных ФЛ. Содержание последних к концу плодного периода по сравнению с 8-м днем развития возрастало более чем в 2,5 раза и это сопровождалось значительным увеличением ТП-активности (снижение протромбинового времени примерно до 45 с), в 2,4 раза превышавшей ее величину на 14-й день эмбрионального развития.

Если в конце предплодного периода отношение нейтральные ФЛ/кислые ФЛ возрастало по сравнению с его величиной в ткани мозга на 8-й день развития приблизительно на 20—25%, то на 18—19-й дни эмбриогенеза, то есть к концу внутриутробного периода развития оно оказыва-

лось в 2,5 раза больше, свидетельствуя тем самым о чувствительном повышении количества нейтральных ФЛ над содержанием кислых, выступающих в качестве ингибиторов ТП-активности.

Изменения в количественных соотношениях ФЛ сопровождались соответствующими колебаниями и в реакциях образования перекисей. Нами было показано, что после несколько повышенной интенсивности процесса свободнорадикального окисления липидов в предплодный период наступало его резкое падение в плодный период развития организма как в случае аскорбат-, так и NADPH-зависимой систем. Аналогичную картину наблюдали и на протяжении первых нескольких дней постнатального развития, также относящихся к периоду миелинизации. Начиная же с 7-го дня постнатальной жизни, интенсивность перекисного окисления липидов в обеих системах резко возрастала с последующим ее постепенным падением и установлением в пределах физиологически допустимых границ к 15-у дню постнатального развития. Примечательно, что описанные выше повышения и спады интенсивности перекисного окисления липидов в целом соответствовали обратонаправленным сдвигам содержания эндогенного α -Т, ответственного за нормальное состояние антиокислительной активности данной биологической системы.

На основании результатов проведенных исследований возникла необходимость в проведении специального исследования *in vivo* и *in vitro* эффектов α -Т как признанного антиоксиданта и изучения на этом фоне особенностей в сдвигах ТП-активности и соотношений ФЛ в срезах мозгах после их 2-часовой инкубации в среде трис-HCl буфера при 37°, рН 7,4 при наличии в ней α -Т в концентрации 10^{-5} — 10^{-2} мМ. В отсутствие антиоксиданта было констатировано падение ТП-активности приблизительно на 48—50%, параллельно развивавшееся уменьшение суммарного количества ФЛ примерно в тех же пределах и многократное возрастание выхода малонового диальдегида.

При добавлении же к среде α -Т в отмеченных выше концентрациях сколько-нибудь заметных отклонений в активности тромбопластинов и в количестве изученных нами показателей метаболизма липидов не происходило.

По-видимому, подобное протекторное действие α -Т носит общебиологический характер, поскольку оно прослеживается и при различных патологических состояниях. Так, например, при остром инфаркте миокарда это было обнаружено в случае мембран эритроцитов. Как явствует из данных, представленных на рис. 1, при ежедневной однократной пероральной даче больным с острым инфарктом миокарда в дополнение к обычно используемым при этом заболевании терапевтическим средствам α -Т в количестве 10 мг/кг массы тела, особенно в сочетании с синергистом—аскорбиновой кислотой в дозе 8—10 мг/кг массы тела, обнаруживалась отчетливо проявляющаяся тенденция к снижению высоких количеств малонового диальдегида уже на 7-й день после начала заболевания. Иначе говоря, эффект лимитирования интенсивности процесса перекисного окисления липидов наступал значительно раньше и был

более выражен по сравнению с теми позитивными изменениями, которые обычно обнаруживаются всего лишь на 21-й день после возникновения инфаркта при использовании терапевтических средств, не включающих антиоксиданты. Следует заметить, что эти сдвиги сопровождалась также существенной нормализацией ТП-активности эритроцитарных мембран, что хорошо коррелировало с картиной постепенного упорядочения в них соотношений между фосфолипидами.

Полученные результаты позволяют заключить о мощном антиокси-

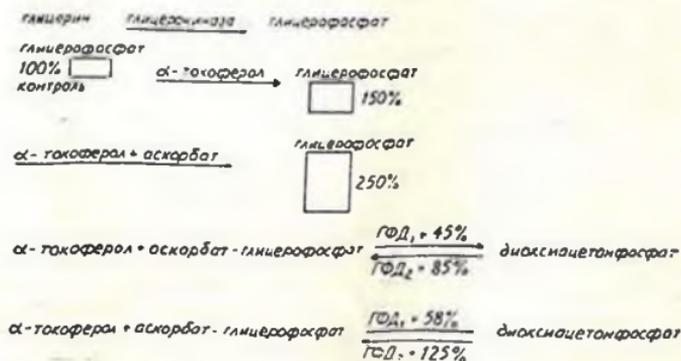


Рис. 1. Эффекты α -токоферола и его комбинаций с аскорбиновой кислотой на уровень глицерофосфата, активности глицерокиназы, а также глицерофосфатдегидрогеназы в прямой реакции (ГФД₁) превращения в диоксиацетонфосфат и в обратноподirectional (ГФД₂)—по трансформации диоксиацетонфосфата в глицерофосфат в периферических отделах миокардиальной ткани коронаросклерозированных белых крыс с острым инфарктом миокарда

дантном действии α -Т не только в процессе эмбриогенеза, но и в динамике формирования различных патологических состояний организма, в том числе и острого инфаркта миокарда. Однако, если антиоксидантные свойства α -Т изучены достаточно обстоятельно, этого нельзя сказать в отношении сведений о его роли в реакциях тканевого метаболизма. К этому имеются прямые предпосылки, вытекающие, в частности, из результатов проведенных нами исследований. Так, предпринятая нами антиоксидантная терапия при остром инфаркте миокарда способствовала предотвращению дальнейшего усугубления процесса образования перекисей и связанного с этим разрушения новых порций мембранных ФЛ. С другой стороны, она оказывала и стимулирующее воздействие на процессы репарации и восстановления морфо-функциональных свойств клеточных мембран, что возможно лишь в случае восполнения утраченных липидных компонентов мембранных структур. Достижение такого результата реально лишь при соответствующем стимулировании ферментных систем, катализирующих различные этапы процесса фосфатидогенеза.

В связи с этим мы сочли целесообразным изучение регуляторной роли α -Т в отношении ферментов, обеспечивающих высокий пул глицерофос-

фата—основного исходного соединения в реакциях биосинтеза ФЛ *de novo*: глицерокиназы, ГФД₁ и ГФД₂, катализирующих реакции взаимопревращения между глицерофосфатом и диоксиацетонфосфатом. Результаты этих исследований позволили осветить новые стороны биохимической характеристики α -Т как мощного стимулятора ферментов реакции фосфатидогенеза. Так, например, благодаря использованию α -Т, было установлено приблизительно 50%-ное увеличение выхода глицерофосфата; при сочетании же применении α -Т с аскорбиновой кислотой—увеличение выхода достигало 150%. С другой стороны, величины активности ГФД₁ и ГФД₂ под действием α -Т возрастали соответственно на 45 и 85%, а при комбинированной антиоксидантной терапии еще больше—на 58 и 125% (рис. 2). Иначе говоря, и в том и в другом случае возрастание

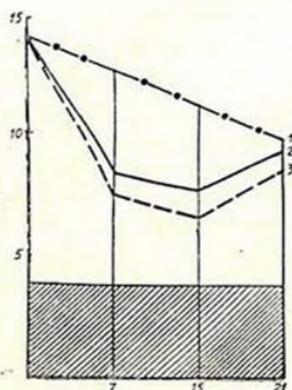


Рис. 2. Динамика интенсивности процесса ферментативного (NADPH-зависимого) перекисного окисления липидов (по выходу малонового диальдегида) в мембранах эритроцитов у больных острым инфарктом миокарда при различных формах терапевтического вмешательства. 1—обычный лечебный комплекс; 2—то же + α -токоферол; 3—то же + α -токоферол + аскорбиновая кислота. Заштрихованная часть—количество у доноров. Аналогичная картина имела место и в случае неферментативной (аскорбатзависимой) системы перекисного окисления липидов

активности ГФД₂ оказалось более наглядным, чем в случае ГФД₁, что указывает на имевшее место доминирование процесса трансформации диоксиацетонфосфата в глицерофосфат при несравненно менее выраженном темпе превращения последнего в диоксиацетонфосфат.

Все отмеченное выше является красноречивым доказательством важности роли α -Т и его синергиста—аскорбиновой кислоты в восполнении содержания мембранных ФЛ, а вместе с этим, и активности мембраносвязанных липидзависимых агентов, одним из важнейших представителей которых являются ТП мембран эритроцитов.

LIPID—DEPENDENCE OF BRAIN THROMBOPLASTINS REGULATING HAEMOCOAGULATION

KARAGOEZYAN K. G., MKRTCHYAN M. E., NOVAKIMYAN S.S.

Institute of Biochemistry, Armenian SSR Acad. Sci., Yerevan

Phospholipid-dependence of thromboplastic activity of chicken embryo brain tissue and erythrocyte membranes of patients suffering from acute heart infarction has been demonstrated. The role of endogenous

α -tocopherol in stabilization of qualitative and quantitative interrelation between neutral and acidic phospholipids that are natural stimulators and inhibitors, respectively of blood coagulation process is established.

ЛИТЕРАТУРА

1. Карагезян К. Г. Докл. АН СССР, т. 118, № 1, с. 142—145, 1958.
2. Карагезян К. Г., Урианджян М. Г. Физиол. журн. СССР, т. 48, № 11, с. 1377—1381, 1962.
3. Karageoslan K. G., Urgandzhian M. G. Federat. Proc., part II, № 5, p. 1973—1975, 1963.
4. Karageoslan K. G. 6th International Congress of Biochemistry, N. Y., p. 580, VII—78, 1964.
5. Карагезян К. Г. Докл. АН СССР, т. 170, № 4, с. 985—988, 1966.
6. Карагезян К. Г. IV Всесоюзн. конф. по биохимии нервной системы (тезисы докл.), с. 52—53, Тарту, 1966.
7. Карагезян К. Г., Саакян С. С. Укр. биохим. журн., т. 39, № 4, с. 424—429, 1967.
8. Карагезян К. Г. Биохимия, т. 33, № 5, с. 937—941, 1968.
9. Karageoslan K. G. 7th International Congress of Biochemistry (Abstracts), p. 743 E—89, Tokyo, abstr. IV, 1967.
10. Карагезян К. Г. Роль фосфолипидов в жизнедеятельности организма, Ереван, Айастан, 1972.
11. Карагезян К. Г., Овсепян Л. М. Докл. АН СССР, т. 188, № 1, с. 253—255, 1969.
12. Карагезян К. Г., Овсепян Л. М. III Всесоюзн. конф. по физиологии вегетативных функций (тезисы докл.), с. 90, Дилижан, 1971.
13. Карагезян К. Г., Овакимян С. С., Мирза-Авакян Г. А. Докл. АН СССР, т. 191, № 1, с. 250—252, 1970.
14. Карагезян К. Г., Овакимян С. С., Тевсянц А. В. Докл. АН СССР, т. 201, № 2, с. 486—489, 1971.
15. Карагезян К. Г., Амирханян О. М. Докл. АН СССР, т. 201, № 1, с. 238—241, 1971.
16. Карагезян К. Г., Овакимян С. С., Полюсбекова С. Д. Докл. АН СССР, т. 212, № 6, с. 1455—1457, 1971.
17. Karageoslan K. G. 12th World Congress of International Society for Fat Research (Abstracts), № 296, p. 156, Milan, 1974.
18. Карагезян К. Г., Овакимян С. С., Полюсбекова С. Д., Овсепян Л. М. Бюл. эксперим. биол. и мед., т. 8, с. 6—8, 1975.
19. Karageoslan K. G., Merthcan M. E., Hcsaktmian S. S., Barsamyan A. G. Proc. 16th ISF Congress (Fat Sci.), p. 915—921, Budapest, 1983.
20. Предтеченский В. Е. и др. Руководство по лабораторным методам исследования, изд. 4-е, М., Медгиз, 1950.
21. Folch J. J. Biol. Chem., v. 174, p. 439—441, 1948.
22. Marinetti G. V., Stotz E. Biochim. et biophys. acta, v. 168, p. 168, 1956.
23. Смирнов А. А., Чирковская Е. В., Манукиан К. Г. Биохимия, т. 26, № 6, с. 1027—1033, 1961.
24. Карагезян К. Г. Лаб. дело, № 1, с. 23—26, 1969.
25. Kennedу P. Methods in Enzymology, N. Y.—L., Acad. Press, 1962.

Поступила 9. IX 1986