



УДК 591.484+617.735—002.156+577.153

ОСОБЕННОСТИ ПРОЦЕССА ПЕРЕКИСНОГО ОКИСЛЕНИЯ
ЛИПИДОВ В ТКАНЯХ СЕТЧАТКИ И МОЗГА КРЫС С
НАСЛЕДСТВЕННОЙ ДЕГЕНЕРАЦИЕЙ СЕТЧАТКИ

ЕФИМОВА М. Г., ОСТАПЕНКО Н. А., ЭТИНГОФ Р. Н.

Институт эволюционной физиологии и биохимии им. И. М. Сеченова
АН СССР, Ленинград

Показаны изменения интенсивности процесса перекисного окисления липидов в тканях сетчатки и мозга больных крыс на 20-й и 40-й день постнатальной жизни. Установлена разнонаправленность изменений первичных (диеновые конъюгаты) и вторичных (малоновый диальдегид) продуктов перекисного окисления липидов в сетчатке больных крыс. В ткани мозга отличия между больными и здоровыми наблюдали только по содержанию малонового диальдегида. При индукции перекисного окисления липидов системой железо+аскорбат в гомогенатах сетчатки и мозга обнаружили, что интенсивность этого процесса у 20-дневных больных крыс больше, чем у здоровых. У 40-дневных животных отличия в скорости индуцированного перекисного окисления липидов в ткани мозга практически отсутствовали. Также не обнаружили существенной разницы в интенсивности индуцированного освещением перекисного окисления липидов в гомогенатах сетчатки 40-дневных крыс *Campbell* и *Wistar*.

Процесс перекисного окисления липидов (ПОЛ) привлекает в настоящее время внимание многих исследователей. Показаны функциональные сдвиги этого процесса в различных тканях, имеется ряд примеров его нарушения при некоторых заболеваниях [1, 2]. Процесс ПОЛ протекает в несколько стадий: одним из его первичных продуктов являются гидроперекиси полиненасыщенных жирных кислот (ПНЖК), о содержании которых можно судить по количеству конъюгированных двойных связей—диеновых конъюгатов (ДК); промежуточные продукты ПОЛ обычно реагируют с 2-тиобарбитуровой кислотой (ТБК); основным среди них является малоновый диальдегид (МДА). Последний, в свою очередь, может соединяться с NH_2 -группами белков, фосфолипидов, образуя шиффовы основания (ШО) [3]. Учитывая трудность интерпретации выраженности процесса ПОЛ по одному показателю (особенно это касается МДА), необходимо определять несколько продуктов ПОЛ, возникающих на разных стадиях процесса [4].

Изучение процесса ПОЛ в сетчатке имеет особый интерес, так как эта ткань, и, в частности, наружные сегменты палочек (НСП), характе-

ризируются крайне высоким содержанием ПНЖК [5, 6], которые являются основным субстратом ПОЛ. При различных патологиях сетчатки—световое поражение, алиментарный Е-авитаминоз—процессы ПОЛ в ней изменены [7, 8]. При наследственной дегенерации сетчатки, механизм которой неизвестен [9], процесс ПОЛ может внести определенный вклад в его развитие, ускоряя наступление слепоты. Показано, что введение в глаз животных ионов двухвалентного железа, которые ускоряют процесс ПОЛ, приводит к дегенеративным изменениям сетчатки [10].

Ранее у нас в лаборатории были получены данные, свидетельствующие об изменениях процесса ПОЛ в сетчатке крыс с наследственной дегенерацией. Было установлено, что содержание одного из промежуточных продуктов ПОЛ—МДА в сетчатке больных крыс меньше, чем у здоровых [11]. Это изменение проявилось на очень ранних сроках развития заболевания (12-й день жизни) и оставалось выраженным и на более поздних этапах болезни. В дальнейшем нами были подтверждены изменения процесса ПОЛ в сетчатке больных крыс. Однако направленность этих изменений носила обратный характер: содержание ДК—первичных продуктов ПОЛ, было в сетчатке больных животных на 15- и 50-й дни жизни больше, чем у здоровых [12]. Косвенные данные также свидетельствуют об изменении процесса ПОЛ при наследственной дегенерации сетчатки. Так, у больных животных относительно легко возникают катаракты, образование которых связывают с интенсификацией процесса ПОЛ [13].

В связи с приведенными данными представляло интерес более подробное и систематическое изучение ПОЛ в ткани сетчатки больных крыс. Наше внимание привлекли ранние сроки болезни, то есть те, при которых еще не происходит деструкция НСП—основного депо ПНЖК. Для сравнения с сетчаткой мы полагали целесообразным изучить процесс ПОЛ в близкой ей по происхождению ткани мозга. В работе также оценивали величину индуцированного ПОЛ в этих тканях под влиянием ионов двухвалентного железа, имеющего ведущее значение для процесса ПОЛ. В ряде работ показано, что освещение индуцирует ПОЛ в сетчатке здоровых животных [7]. В настоящей работе было исследовано влияние освещения на процесс ПОЛ в сетчатках больных и здоровых животных.

Материалы и методы

Работу проводили на крысах-самцах линии *Campbell* в возрасте от 20 до 45 дней, в качестве контроля использовали крыс линии *Wistar* того же возраста. Животных декапитировали, ткань сетчатки и мозга гомогенизировали на холоду в 0,02 М трис-НСI буфере, рН 7. 4, содержащем 0,175 М KCl. МДА определяли спектрофотометрически [14] по поглощению продукта его взаимодействия с ТБК при длине волны 532 нм. Содержание МДА выражали в нмоль на мг белка. Белок определяли методом Lowry и соавт. [15]. Для определения ДК и ШО липиды экстрагировали методом Folch и соавт. [16]. ДК регистрировали

спектрофотометрически по поглощению при длине волны 232 нм в растворе метанол—гексан (5:1). Содержание ДК рассчитывали на мг липидного фосфора. Липидный фосфор определяли методом Васьяковского [17]. ШО определяли по спектру флуоресценции в хлороформе при длине волны возбуждения 365 нм и длине волны испускания 420 нм. Флуоресценцию рассчитывали в усл. ед. относительно флуоресценции растворителя и относили её к мг липидного фосфора. Все спектрофотометрические и флуориметрические измерения выполняли на спектрофотометре с флуоресцентной приставкой Spexord M-40 (ГДР).

Скорость индуцированного ПОЛ оценивали по накоплению МДА. Индукцию ПОЛ *in vitro* проводили добавлением к гомогенатам тканей растворов FeSO_4 и аскорбиновой кислоты в концентрациях 10 мкМ и 0,5 мМ соответственно при температуре 23°. Индуцированный процесс ПОЛ останавливали прибавлением 3 мМ раствора ЭДТА через 1, 3 и 6 минут. Освещение гомогенатов сетчаток осуществляли светом электрической лампы накаливания через водяной фильтр при температуре 23°. Уровень освещенности составлял 5000 лк, время освещения—1 ч. Контролем служили гомогенаты сетчатки, находившиеся это же время в темноте. Индуцированный процесс ПОЛ останавливали добавлением в гомогенаты ионола из расчета 1 мг ионола на 100 мл гомогената.

Обработку результатов измерений проводили методом Стьюдента [18].

Результаты исследования

В табл. 1 суммированы данные, полученные нами ранее, а также результаты экспериментов, проведенных в настоящей работе по изменению показателей ПОЛ в сетчатке больных крыс по сравнению со здоровыми. Мы подтвердили заключение об увеличении содержания ДК в сетчатках больных крыс в ранние и поздние сроки болезни [12]. Однако при этом содержание МДА в сетчатке больных крыс было меньше, чем у здоровых, а не больше, как мы предполагали. Таким образом, во все изученные сроки мы отмечали противоположную направленность изменений в содержании ДК и МДА.

Из данных, приведенных в табл. 2, видно, что в мозгу здоровых животных увеличивается содержание всех продуктов ПОЛ от 20-го до 40-го дня постнатальной жизни. Что касается больных животных, то у них на 20-й и 40-й день жизни в ткани мозга МДА было существенно меньше, чем у здоровых, хотя по содержанию ДК мозг больных и здоровых крыс не отличался, так же, как и по содержанию ШО.

Опыты по индукции ПОЛ системой железо+аскорбат показали, что в гомогенатах ткани сетчатки и мозга больных крыс 20-дневного возраста ПОЛ индуцируется легче, чем у здоровых (рис., а, б), а в гомогенатах ткани мозга 40-дневных больных крыс разницы в скоростях индукции ПОЛ по сравнению со здоровыми не было обнаружено (рис., в).

В последней серии опытов была изучена индукция процесса ПОЛ в гомогенатах ткани сетчатки больных и здоровых крыс при освещении. В этих опытах использовались сетчатки 20-дневных животных, так как этот срок заболевания наиболее интересен—животное уже прозрело, НСП частично сформированы и электрофизиологическая характеристика

Таблица 1

Показатели ПОЛ в ткани сетчатки крыс линии *Campbell* и *Wistar*; сопоставление с литературными данными (n=6—8)

Возраст животных	Линия крыс	Диеновые конъюгаты		Малоновый диальдегид	
		(нмоль/мг липидного фосфора)	% изменения по отношению к <i>Wistar</i>	(нмоль/мг белка)	% изменения по отношению к <i>Wistar</i>
15 дней	<i>Wistar</i>	—	—	—	—
	<i>Campbell</i>	—	+51 [12]	—	—39 [11]
20 дней	<i>Wistar</i>	74,0±3,9	—	0,167±0,015	—47
	<i>Campbell</i>	92,0±2,9*	+24	0,089±0,011*	—43 [11]
35 дней	<i>Wistar</i>	50,6±5,0	—	—	—
	<i>Campbell</i>	76,0±9,0*	+52	—	—31 [11]
45 дней	<i>Wistar</i>	44,0±5,3	—	—	—
	<i>Campbell</i>	71,0±6,2*	+69	—	—

Примечание. Здесь и в табл. 2, 3 различия между крысами линий *Campbell* и *Wistar* достоверны при * $p < 0,05$; n—число животных в опыте.

Таблица 2

Показатели ПОЛ в ткани меза крыс линии *Campbell* и *Wistar* (n=4—6)

Возраст животных	Линия крыс	Диеновые конъюгаты (нмоль/мг липидного фосфора)	Малоновый диальдегид (нмоль/мг белка)	Шиффовы основания (усл. ед. ×10/мг липидного фосфора)
20 дней	<i>Wistar</i>	12,7±1,1	0,184±0,013	2,3±0,28
40 дней	<i>Wistar</i>	36,3±7,1	0,206±0,028	5,8±1,5
20 дней	<i>Campbell</i>	12,6±0,9	0,059±0,005*	2,7±0,6
40 дней	<i>Campbell</i>	36,5±1,7	0,077±0,011*	4,2±1,1

ответа на освещение еще близка к норме [19]. Как видно из данных, приведенных в табл. 3, значительное увеличение содержания МДА наблюдается в гомогенатах сетчаток, находившихся в течение часа в темноте, что свидетельствует об активном течении процесса ПОЛ за счет эндогенных ресурсов. Показано также, что такой индуктор ПОЛ, как освещение, вызывает усиление этого процесса, что совпадает с литературными данными [5], однако существенной разницы в процентах прироста МДА при освещении в гомогенатах ткани сетчатки больных и здоровых крыс по сравнению с соответствующими контролями выявлено не было.

Обсуждение результатов

Обращает на себя внимание тот факт, что в ткани сетчатки больных крыс во все изученные сроки наблюдалась разная направленность изменений в содержании ДК и МДА в отличие от здоровых животных.

В ткани мозга 20- и 40-дневных больных крыс также отмечали уменьшение содержания МДА, хотя количество ДК и ШО в мозгу больных и здоровых крыс было одинаковым. Феномен уменьшения МДА в исследованных тканях больных животных можно, по-видимому, объяснить или замедлением его образования, или ускорением его утилизации. В первом случае это можно было бы связать с повышением активности глутатионпероксидазы, которая эффективно конкурирует за гидроперекиси ПНЖК, включенные в цепь радикального процесса, ведущего к

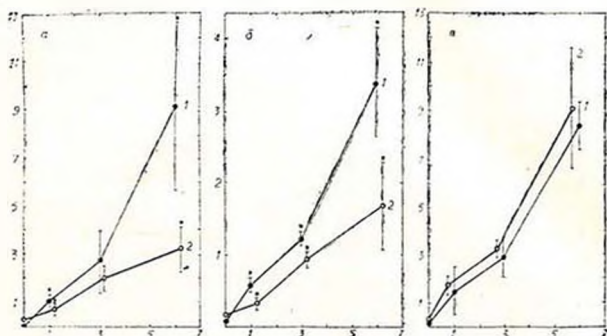


Рис. Индукция перекисного окисления липидов системой железо-аскорбат в гомогенатах ткани сетчатки (а) и мозга (б) 20-дневных и мозга 40-дневных (в) крыс линий Campbell (1) и Wistar (2). По оси абсцисс—время индукции (мин), по оси ординат—содержание МДА (нмоль/мг белка)

Таблица 3
Влияние освещения на содержание малонового диальдегида (МДА) в гомогенатах ткани сетчатки 20-дневных крыс линий Campbell и Wistar (n=6)

Линия крыс	МДА (нмоль/мг белка)			
	исходное содержание	контроль (темнота)	Освещение	% прироста МДА при освещении по сравнению с контролем
Wistar	0.167 ± 0.015	0.95 ± 0.12	1.57 ± 0.09	65
Campbell	$0.089 \pm 0.011^*$	0.77 ± 0.04	$1.19 \pm 0.08^*$	55

образованию МДА. Во втором случае—с повышением активности одного или нескольких ферментов метаболизма МДА, таких как альдегиддегидрогеназа или карбоксилаза. Увеличение же количества ДК, свидетельствующее об ускорении начальных этапов ПОЛ в ткани сетчатки больных крыс, может быть как следствием снижения эффективности работы защитных систем (уменьшение активности супероксиддисмутазы и каталазы или снижение содержания α -токоферола и др.), так и происходить за счет повышенного содержания в этой системе восстановитель-

ных эквивалентов, которые могут восстанавливать молекулярный кислород. Итак, анализ показателей ПОЛ в ткани сетчатки и мозга больных крыс в онтогенезе позволил сделать вывод о том, что нарушение ПОЛ в этих тканях происходит уже на ранних стадиях заболевания. Опыты по индукции процесса ПОЛ системой железо+аскорбат подтвердили наш вывод. Показано (рис., а, б), что скорость индукции процесса ПОЛ в сетчатке и в мозгу 20-дневных больных крыс выше, чем у здоровых. Однако к 40-му дню развития скорости индуцированного ПОЛ в ткани мозга больных и здоровых животных одинаковы (рис., в). По-видимому, к этому сроку в ткани мозга больных крыс уже начинается происходить какая-то компенсация обусловленных болезнью сдвигов.

Резюмируя полученные данные, следует отметить, что процессы ПОЛ у крыс с наследственной дегенерацией сетчатки и у здоровых крыс протекают по-разному как в ткани сетчатки, так и на ранних стадиях заболевания в ткани мозга. Остается неясным вопрос о том, с чем связано уменьшение количества МДА в тканях больных животных и чем обусловлено изменение индукции ПОЛ системой железо+аскорбат в тканях сетчатки и мозга 20-дневных больных животных по сравнению со здоровыми. Заслуживает дополнительного анализа разнонаправленность изменений содержания первичных и промежуточных продуктов ПОЛ у больных животных. Изучение этих вопросов является предметом дальнейшего исследования.

Авторы статьи выражают глубокую благодарность сотрудникам лаборатории нейрхимии Института эволюционной физиологии и биохимии им. И. М. Сеченова АН СССР В. А. Тюрину и Н. В. Горбунову за помощь в работе и обсуждении результатов.

PECULIARITIES OF LIPID PEROXIDATION IN RETINA AND BRAIN OF RATS WITH INHERITED RETINA DEGENERATION

EPHIMOVA M. G., OSTAPENKO I. A., ETINGOF R. N.

Sechenov Institute of Evolutionary Physiology and Biochemistry,
USSR Academy of Sciences, Leningrad

Lipid peroxidation in retina and brain of *Campbell* rats with inherited degeneration of retina was studied and compared to that of Wistar rats. A change in the intensity of this process is revealed as early as the 20-th day of postnatal life. In retina and brain homogenates of 20 day old *Campbell* rats, compared to Wistar, ferrous ion-ascorbic acid increased lipid peroxidation to a greater extent, whereas in 40 day old diseased and control rats the rate of induced lipid peroxidation in these tissues was quite similar. Light-induced lipid peroxidation in the homogenate of retina of 20 day-old *Campbell* and Wistar rats showed no essential difference.

ЛИТЕРАТУРА

1. Абрамова Ж. И., Оксенглендер Г. И. Человек и противокислительные вещества, Л., Наука, 1985.
2. Free radicals in biology (ed. W. D. Pryor), New York, Academic Press, 1976.
3. Владимиров Ю. А., Арчаков А. И. Перекисное окисление липидов в биологических мембранах, М., Наука, 1972.
4. Казан В. Е., Орлов О. Н., Прилипко Л. Л. Проблема анализа эндогенных продуктов перекисного окисления липидов, Биофизика (Итоги науки и техники ВИНТИ АН СССР), т. 18, 1986.
5. Казан В. Е., Шаслова А. А., Новиков К. Н., Козлов Ю. П. Биофизика, т. 20, с. 1043—1048, 1975.
6. Fliesler S. J., Anderson R. E. Prog. Lipid Res., v. 22, p. 79—131, 1983.
7. Зусова М. В., Шаслова А. А., Щербатова О. И. Вестн. офтальмологии, № 3, с. 56—59, 1977.
8. Казан В. Е., Барыбина Г. В., Новиков К. Н. Бюл. эксперим. биол. и мед., т. 83, с. 411—413, 1977.
9. Matuk Y. Can. J. Biochem., v. 62, p. 535—546, 1984.
10. Rapp L. M., Wiegand R. D., Anderson R. E.—In: Problems of normal and genetically abnormal retinas (eds. Clayton R. M., Haywood J., Reading H. W., Wright A.) p. 109—119, London U. K., Academic Press, 1982.
11. Этингоф Р. Н., Остапенко И. А., Чусова Г. Г.—В кн.: Физиологические науки медицине, с. 67—76, Л., Наука, 1983.
12. Остапенко И. А., Шабанова М. Е., Тюрин В. А., Борин М. А., Горбунов Н. В., Этингоф Р. Н. Нейрохимия, т. 5, с. 391—396, 1986.
13. Zigler J. S., Hess H. H. Exp. Eye Res., v. 41, № 1, p. 67—76, 1985.
14. Стальная И. Д., Гаришвили Т. Г.—В кн.: Современные методы в биохимии, с. 68—70, М., Медицина, 1977.
15. Lowry O. H., Rosenbrough N. J., Randall R. J. J. Biol. Chem., v. 193, № 1, p. 423—434, 1951.
16. Folch J., Lees M., Stanley G. H. J. Biol. Chem., v. 226, № 1, p. 497—509, 1957.
17. Препаративная биохимия липидов (под редакцией Бергелъсона Л. Д.), М., Наука, 1981.
18. Белецкий А. Н. Элементы количественной оценки фармакологического эффекта, Рига, АН Латв. ССР, 1959.
19. Herron W. L., Riegel B. W., Ruben M. L. Invest. Ophthalmol., v. 10, № 1, p. 54—63, 1971.

Поступила 19. II 1987