

17. Martinez M., Mougan I. Fatty Acid Composition of Human Brain Phospholipids During Normal Development // J. Neurochem. – 1998. – № 71. – P. 2528-2533.

18. Sastry P.S. Lipids of nervous tissue: composition and metabolism // Prog Lipid Res. – 1985. – № 24 (2). – P. 69-176.

19. United States Department of Agriculture // Agricultural Statistics. – 2004. Table 3-51.

20. Zhan S., Ho S.C. Meta-analysis of the effects of soy protein containing isoflavones on the lipid profile // Am J Clin Nutr. – 2005. – № 81. – P. 397-408.

Координаты для связи с авторами: Феоктистова Наталья Алексеевна – ассистент кафедры химии АГМА; Штарберг Михаил Анатольевич – канд. мед. наук, старший научный сотрудник ЦНИЛ АГМА; Бородин Евгений Александрович – д-р мед. наук, профессор, зав. кафедрой химии АГМА.



УДК 616-036.882-08:615.2:616.36:613.632]599.323.4

П.П. Золин, В.Д. Конвай

ВЛИЯНИЕ РИБОЗЫ НА УРОВНИ МОНОНУКЛЕОТИДОВ В ПЕЧЕНИ В РАННЕМ ПОСТРЕАНИМАЦИОННОМ ПЕРИОДЕ

Омский государственный медицинский университет, 644099, ул. Ленина, 12, e-mail: bx-osma@mail.ru, г. Омск

Резюме

Эксперименты выполнены на крысах-самцах, которых подвергали 6,5-минутной асфиксии с последующей реанимацией. Через 30 мин. после реанимации под эфирным наркозом прижизненно фиксировали печень крыс в жидком азоте. Контрольных животных подвергали тем же манипуляциям, за исключением асфиксии и реанимации. Цифровые данные обработаны статистически с использованием критерия Вилкоксона-Манна-Уитни. В печени реанимированных крыс усиливается катаболизм свободных нуклеотидов, о чем свидетельствуют их сниженные уровни: по сравнению с контрольной группой снижалась концентрация нуклеозидди- и трифосфатов ($p < 0,01$) и концентрация нуклеозидмонофосфатов ($p < 0,05$). Внутривенное введение D-(-)-рибозы (50 мг · кг⁻¹ массы тела) сразу после реанимации оказывало благоприятный эффект на концентрации в печени нуклеозидди- и трифосфатов, а также нуклеозидмонофосфатов. Авторы полагают, что это связано с фосфорилированием рибозы в рибозо-5-фосфат, от которого зависит образование фосфорибозилдифосфата. Последний обеспечивает реутилизацию азотистых оснований и синтез нуклеотидов de novo.

Ключевые слова: рибоза, нуклеозидтрифосфаты, нуклеозиддифосфаты, нуклеозидмонофосфаты, урат, реанимация, печень.

P.P. Zolin, V.D. Conway

RIBOSE INCREASES LEVELS OF THE LIVER MONONUCLEOTIDES, DECREASED IN THE POSTRESUSCITATION PERIOD

Omsk State Medical University, Omsk

Summary

Experiments were carried out on male rats exposed to 6,5 min asphyxia followed by resuscitation. Rats were narcotized with ether in 30 min after resuscitation, and the livers were placed in liquid nitrogen ex vivo. The control animals were subjected to the same procedures except for asphyxia and resuscitation. The digital data were processed statistically using the Wilcoxon-Mann-Whitney test. Catabolism of the free nucleotides in the liver of resuscitated rats increased, confirmed by reduced contents of these mononucleotides: the concentration of nucleoside di- and triphosphates decreased ($P < 0,01$) and the concentration of nucleoside monophosphates also decreased ($P < 0,05$) as compared with the control group. D-(-)-ribose intravenous injection (50 mg · kg⁻¹ of body weight) just after the resuscitation had a beneficial effect on nucleoside di- and triphosphates concentration and nucleoside monophosphates concentration in liver. The authors assume it is associated with the ribose phosphorylation and the 5-phosphoribose-derived phosphoribosyl diphosphate formation. The latter provides the inclusion of nucleobases in salvage pathway and the nucleotides synthesis de novo.

Key words: ribose, nucleoside triphosphates, nucleoside diphosphates, nucleoside monophosphates, urate, resuscitation, liver.

Во время клинической смерти и в постреанимационном периоде усиливается катаболизм свободных нуклеотидов печени до нуклеозидов и азотистых оснований, что влечет за собой целый ряд метаболических нарушений [5]. Имеются данные о благоприятном эффекте применения D-(–)-рибозы для коррекции на-

рушений энергетического обмена при различных экстремальных состояниях [6, 8].

Целью настоящей работы стало изучение влияния экзогенной рибозы на уровни свободных нуклеотидов печени и продукта их катаболизма – урата, в раннем постреанимационном периоде.

Материалы и методы

Дизайн исследования включал применение плана параллельных групп и простой рандомизации. Известно, что метод простой рандомизации в достаточной мере обеспечивает случайность разделение животных на группы, хотя и не приводит к равной численности групп [7]. Эксперименты были выполнены на 62 беспородных белых крысах-самцах. Из них 38 животных, наркотизированных диэтиловым эфиром, подвергли клинической смерти путем 6,5-минутной механической асфиксии с последующей реанимацией путем искусственного дыхания и непрямого массажа сердца. Из 38 подвергнутых асфиксии крыс 13 реанимировать не удалось, а 25 успешно реанимированных животных разделили на группы «Реанимация» и «Реанимация + Рибоза». Остальные 24 крысы подвергли не асфиксии, а лишь контрольным манипуляциям: наркозу, фиксации, интубации; их разделили на группы «Контроль» и «Рибоза». У животных всех четырех перечисленных групп через 30 мин. после реанимации (или контрольных манипуляций) под эфирным наркозом вскрывали брюшную полость, погружали печень крыс в жидкий азот до полного замораживания, после чего крыс забивали. За 25 мин. до этого всем крысам вводили в бедренную вену 0,9 % раствор NaCl, который брался из расчета $2,5 \text{ мл} \cdot \text{кг}^{-1}$ массы тела. Раствор, предна-

значенный для групп «Реанимация + Рибоза» и «Рибоза» содержал, кроме того, D-(–)-рибозу производства компании «Fluka AG, Buchs SG» (Швейцария) в дозе $50 \text{ мг} \cdot \text{кг}^{-1}$ массы тела.

Не оттаивая, быстро гомогенизировали навеску печени в холодной 6 % HClO_4 , взятой в соотношении 100 мг ткани на 0,4 мл HClO_4 . Гомогенат центрифугировали в течение 5 мин. при 1000 g и 0 °C. Супернатант сразу же нейтрализовали раствором КОН до pH=7, выдерживали 15 мин при 0 °C и осадок KClO_4 отделяли центрифугированием при вышеописанных условиях. В хлорнокислом экстракте печени определяли суммарное содержания нуклеозидди- и трифосфатов (НДТФ), нуклеозидмонофосфатов (НМФ) и мочевой кислоты, как описано ранее [3]. Содержания НДТФ и НМФ выражали в единицах оптической плотности (ЕОП) $\cdot \text{г}^{-1}$ сырой массы печени, урата – в нмоль $\cdot \text{г}^{-1}$ печени.

Описательная статистическая обработка результатов включала в себя вычисление для каждой группы средней арифметической и ее ошибки. Далее задача заключалась в сравнении двух попарно не связанных выборок по их средним тенденциям. Для этого мы использовали непараметрический критерий Вилкоксона-Манна – Уитни, для которого уровни значимости различий брали из таблиц [1].

Результаты и обсуждение

Установлено, что через 30 минут после начала оживления (группа «Реанимация») содержание НДТФ в печени крыс снижается до $68,1 \pm 4,5 \text{ ЕОП} \cdot \text{г}^{-1}$ печени по сравнению с $88,7 \pm 5,8 \text{ ЕОП} \cdot \text{г}^{-1}$ в группе «Контроль». Здесь и далее результаты приводятся в виде: средняя арифметическая $\pm$ ошибка средней арифметической. Различие между группами «Контроль» и «Реанимация» статистически значимо ($p < 0,01$). Оно свидетельствует об активации катаболизма НДТФ до НМФ в раннем постреанимационном периоде.

Этот процесс сопровождается дальнейшим, еще более интенсивным катаболизмом образующихся молекул НМФ – на это указывает статистически значимое ($P < 0,05$) снижение содержания НМФ до уровня $17,2 \pm 1,1 \text{ ЕОП} \cdot \text{г}^{-1}$ печени в группе «Реанимация» против уровня $19,9 \pm 1,0 \text{ ЕОП} \cdot \text{г}^{-1}$ в группе «Контроль». Снижение концентрации НМФ ниже контрольного уровня говорит о том, что распадаются не только «избыточные» НМФ, образовавшиеся в результате катаболизма НДТФ, но и часть НМФ, изначально присутствовавших в клетках печени.

Мы предполагаем, что усиленный катаболизм НМФ вслед за НДТФ имеет как положительное, так и отрицательное значение. Когда во время клинической смерти нуклеозидтрифосфаты отдают для нужд метаболизма энергию концевых макроэргических связей и превращаются в нуклеозиддифосфаты, кон-

центрация последних возрастает [5], поскольку их обратное фосфорилирование в это время заторможено из-за гипоксии. Для поддержания в клетке соотношений между мононуклеотидами с различным числом остатков фосфорной кислоты эволюционно предназначены НМФкиназы: аденилаткиназа, гуанилаткиназа и т.д. НМФкиназная реакция заключается в превращении 2 молекул нуклеозиддифосфата в 1 молекулу НМФ и 1 молекулу нуклеозидтрифосфата, что позволяет немного восполнить дефицит последнего. Чтобы получить больше нуклеозидтрифосфатов, нужно сдвинуть реакцию вправо – этому способствует не только накопление нуклеозиддифосфатов (закономерно происходящее при гипоксии [4, 5]), но и удаление из реакции образующихся НМФ. Таким образом, распад НМФ до нуклеозидов и азотистых оснований помогает кратковременно поддержать уровень нуклеозидтрифосфатов, но в чуть более далекой перспективе приводит к истощению пулов всех мононуклеотидов, включая НМФ. Заметим, что НМФкиназный механизм работает и в физиологических условиях: так, известно, что в сокращающейся мышце аденилаткиназная реакция является одним из источников быстрого восполнения пула аденозинтрифосфата, чему способствует дезаминирование второго продукта этой реакции – аденозинмонофосфата [4].

Восполнение пулов нуклеотидов возможно двумя путями: 1) посредством реутилизации азотистых оснований, образующихся при катаболизме нуклеотидов; 2) путем синтеза нуклеотидов *de novo*. В обоих случаях необходим фосфорибозилдифосфат, ключевым субстратом для синтеза которого является рибозо-5-фосфат [6, 10]. Поскольку для фосфорибозилдифосфата и рибозо-5-фосфата клеточные мембраны непроницаемы [6, 10, 11], мы попытались увеличить их уровни в печени путем внутривенного введения раствора рибозы, которая способна проникать в клетки и затем превращаться в рибозо-5-фосфат под действием рибкиназы [6, 8].

Эта попытка увенчалась успехом: содержания НДТФ и НМФ в печени в группе «Реанимация + Рибоза» повысились до уровней соответственно $82,0 \pm 7,2$ и $18,0 \pm 1,0$ ЕОП $\cdot$ г⁻¹ печени, при этом отличия от группы «Контроль» стали статистически незначимыми. Введение D-(–)-рибозы здоровым животным не привело у них к существенным изменениям: концентрации НДТФ и НМФ в группе «Рибоза» равнялись соответственно $83,0 \pm 8,5$ и $21,1 \pm 0,9$ ЕОП $\cdot$ г⁻¹ при отсутствии статистической значимости отличий от контрольной группы.

Известно, что по содержанию в органах и тканях, в том числе в печени, пуриновые мононуклеотиды преобладают над другими свободными нуклеотидами (пиримидиновыми, пиридиновыми) [5, 9, 10, 11]. Поскольку многие нуклеотиды имеют характерные спектры поглощения в ближней ультрафиолетовой области, нами были изучены спектры растворов НМФ печени при длинах волн 248, 250, 253, 260, 290 и 300 нм (при pH=7). Сравнивалось положение максимумов поглощения ($\lambda_{\max}$), а также отношение абсорбций $A_{250}/$

A_{260} , которое, как известно, значительно отличается у разных НМФ [2, 11].

У всех без исключения наших подопытных животных наблюдался максимум поглощения НМФ, приходящийся на 260 нм, причем он был единственным в изучавшейся области спектра. Это свидетельствует о преобладании количества аденозинмонофосфата над гуанозинмонофосфатом, инозинмонофосфатом и другими НМФ как в печени контрольных крыс, так и после реанимации и/или введения рибозы. Отношение A_{250}/A_{260} составило в группе «Контроль» 0,87, в группе «Реанимация» – 0,86, в группе «Реанимация + Рибоза» – 0,87 и в группе «Рибоза» – 0,85. Отсутствие существенных изменений спектральных характеристик говорит о том, что катаболизм и восстановление пула НМФ во всех четырех группах протекает без нарушения пропорций между различными НМФ.

Содержание мочевой кислоты в печени в группах «Контроль», «Реанимация», «Реанимация + Рибоза» и «Рибоза» составляло соответственно $21,2 \pm 1,6$, $20,8 \pm 1,5$, $24,6 \pm 1,7$ и $22,0 \pm 5,0$ нмоль $\cdot$ г⁻¹ сырой массы печени. Не обнаружено статистически значимых различий между перечисленными группами. Отсутствие повышения уровня урата в печени реанимированных животных можно объяснить тем, что в условиях нашего эксперимента мочевая кислота, образовавшаяся в результате распада НДТФ и НМФ, успевает выйти из клеток печени в кровь после восстановления кровообращения в ходе реанимации, поскольку клеточная мембрана проницаема для урата, в отличие от мононуклеотидов [10]. Статистически значимая гиперурикемия у крыс в постреанимационном периоде после 6,5-минутной механической асфиксии была обнаружена нами ранее [5].

Выводы

1. В раннем постреанимационном периоде содержание НДТФ и НМФ в печени крыс снижается, что свидетельствует об их усиленном катаболизме.

2. Внутривенное введение D-(–)-рибозы сразу после реанимации повышает уровни мононуклеотидов, сниженные в раннем постреанимационном периоде.

Литература

1. Гублер Е.В., Генкин А.А. Применение непараметрических критериев статистики в медико-биологических исследованиях. – Л.: Медицина, 1973. – 143 с.
2. Досон Р., Эллиот Д., Эллиот У., Джонс К. Справочник биохимика. – М.: Мир, 1991. – 544 с.
3. Золин П.П., Конвай В.Д., Домрачев А.А. Фракционирование пуриновых производных в изучении энергетического обмена // Вестн. Ом. ун-та. – 2017. – № 1. – С. 65-70.
4. Кольман Я., Рем К.-Г. Наглядная биохимия. – М.: Мир, 2004. – 469 с.
5. Конвай В.Д. Нарушение пуринового обмена в печени в постреанимационном периоде и его профилактика: дисс. ... д-ра мед. наук. – Томск, 1988. – 426 с.
6. Конвай В.Д., Золин П.П. Средство для коррекции энергетического обмена // Патент России № 2169568, 2001. – Бюл. № 18.

7. Сергиенко В.И., Бондарева И.Б. Математическая статистика в клинических исследованиях. – М.: ГЭО-ТАР-Медиа, 2006. – 304 с.
8. Чигринский Е.А. Антиоксидантная система семенников крыс при физических нагрузках разной интенсивности: дисс. ... канд. биол. наук. – Новосибирск, 2010. – 150 с.
9. Abadi R.H. Analysis of free nucleotide pools of mouse liver tissue by high-pressure liquid chromatography (HPLC) // Indian J. Biochem. Biophys. – 2003. – Vol. 40, № 3. – P. 209-212.
10. Henderson J.F., Paterson A.R.P. Nucleotide metabolism. An introduction (Kindle Edition). – Burlington: Elsevier Science, 2014. – 304 p.
11. Lundblad R.L., Macdonald F. (eds.) Handbook of biochemistry and molecular biology. – 4th ed. – London-New York: CRC Press, Taylor & Francis Group, Boca Raton, 2010. – 1080 p.

Literature

1. Gubler E.V., Genkin A.A. Application of the non-parametric statistical criteria in medical and biological researches. – L.: Medicine, 1973. – 143 p.
2. Dawson R.M.C., Elliott D.C., Elliott W.H., Jones K.M. Data for biochemical research. – M.: Mir, 1991. – 544 p.
3. Zolin P.P., Conway V.D., Domrachev A.A. Fractionating of the purine compounds for energy metabolism study // Herald of Omsk University. – 2017. – № 1. – P. 65-70.
4. Koolman J., Röhm K.-H. Taschenatlas der Biochemie. – M.: Mir, 2004. – 469 p.
5. Conway V.D. Purine metabolism disorders in the liver during postresuscitation period and its prevention: A thesis ... of a Doctor of medical sciences. – Tomsk, 1988. – 426 p.
6. Conway V.D., Zolin P.P. Agent for correction of energy metabolism // Russian Patent № 2169568, 2001. – Bull. № 18.
7. Sergienko V.I., Bondareva I.B. Mathematical statistics in clinical researches. – M.: GEOTAR-Media, 2006. – 304 p.
8. Chigrinski E.A. Antioxidant system of testes of rats during physical exercises of different intensity: A thesis ... of a Candidate of biological sciences. – Novosibirsk, 2010. – 150 p.
9. Abadi R.H. Analysis of free nucleotide pools of mouse liver tissue by high-pressure liquid chromatography (HPLC) // Indian J. Biochem. Biophys. – 2003. – № 3, Vol. 40. – P. 209-212.
10. Henderson J.F., Paterson A.R.P. Nucleotide metabolism. An introduction (Kindle Edition). – Burlington: Elsevier Science, 2014. – 304 p.
11. Lundblad R.L., Macdonald F. (eds.) Handbook of biochemistry and molecular biology. – 4th ed. – London-New York: CRC Press, Taylor & Francis Group, Boca Raton, 2010. – 1080 p.

Координаты для связи с авторами: Золин Петр Петрович – канд. мед. наук, старший преподаватель кафедры биохимии ОмГМУ, тел. 8-(3812)-38-50-37, e-mail: zolin_petr@mail.ru; Конвай Владимир Дмитриевич – д-р мед. наук, старший преподаватель кафедры биохимии ОмГМУ, тел. 8-(3812)-65-05-77, e-mail: 385037@mail.ru.

