

СВОБОДНО-РАДИКАЛЬНЫЙ ПУТЬ ОКИСЛЕНИЯ ЛИПИДОВ И ЕГО РОЛЬ В ПАТОЛОГИИ АРТЕРИЙ

О. Н. Воскресенский

(Одесский медицинский институт имени Н. И. Пирогова)

Впервые указанная в 1954 г. Б. Н. Тарусовым возможность свободно-радикального окисления *in vivo* в настоящее время общеизвестна. На рис. 1 представлены два пути окисления липидов — ферментативный, имманентный для жизни, и неферментативный свободно-радикальный, свойственный в большей мере неживым телам.

Старение (разрушение) неживых систем связано с рассеиванием энергии — накоплением энтропии, реализуемого в первую очередь реакциями окисления. Отличительные черты биологического ферментативного окисления, при котором энергия не рассеивается, а аккумулируется в макроэргах, и при котором участвующие в процессе ферменты и мембраны по завершении цикла полностью возвращаются в исходное состояние, не дают оснований связывать с ним старение живых систем. Все особенности неферментативного свободно-радикального окисления, приведенные

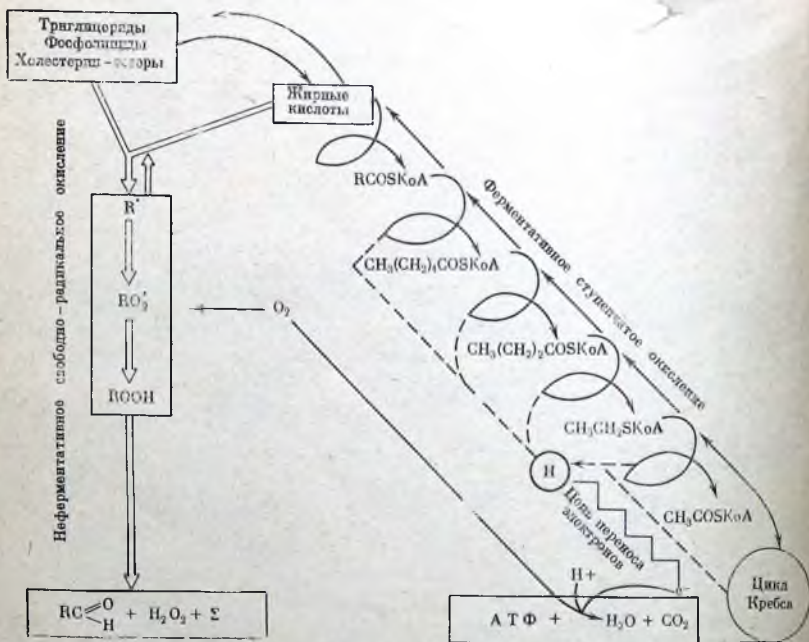


Рис. 1. Два пути окисления липидов

ниже, указывают на возможную главенствующую роль его в генезе старения¹.

Если изложенные умозаключения верны, то условия, «переводящие» липиды на путь свободно-радикального неэнзимного окисления, должны ускорять старение или способствовать свойственной ему патологии. Одним из таких условий является избыточное поступление в организм жиров. Действительно, содержание кроликов на диете с 8% кокосового масла вызывает у них развитие атеросклероза аорты [34]. Изучение этой триглицеридной модели атеросклероза показало, что в генезе ее важнейшее место занимает относительная антиоксидантная недостаточность и свободно-радикальное окисление липидов [5].

Дальнейшее исследование роли свободно-радикального окисления липидов в атерогенезе проведено на 57 кроликах весом 2—3 кг, содержащихся на различных экспериментальных рационах (табл. 1) от 50 до 150 (в 1-й группе — до 200) дней.

Сопоставление двух путей окисления липидов

Основные черты процесса	Ферментативное окисление	Неферментативное свободно-радикальное окисление
Локализация	Клетка	Клетка и внеклеточное вещество
Субстрат	Лабильные липиды	Лабильные и структурные липиды
Периоды	Активная работа клетки	Дефицит антиоксидантов, облучение, отравление прооксидантами, окстремальные состояния, избыточное поступление субстрата
Характер процесса	Последовательный ступенчатый процесс	Цепные разветвленные реакции, самоускоряющиеся
Обратимость	Обратимое	Необратимое
Промежуточные и конечные продукты	Инертны и нетоксичны	Химически и биологически высокоагрессивны
Регуляция	Тонкая нейро-эндокринная регуляция управлением активностью ферментов	Частичный контроль антиоксидантами
Освобождаемая энергия	Аккумуляция в форме макроэргов	Рассеивание
Биологическое значение	Продукция, необходимая для деятельности клетки энергии	—
Последствия для тканей	—	Необратимые повреждения белков, нуклеиновых кислот и мембран

Маргарин окислялся барботированием воздуха при 90° в течение 18 час. Кокосовое масло окислялось пергидролем (20 мл на 100 мл масла).

В сыворотке крови, печени и аорте определялись общие липиды (по Фолчу), холестерин (колориметрически по реакции Ли-

¹ Здесь не затрагивается вопрос о ферментативном перекисном окислении липидов в мембранах по функциональной роли (синтез простагландинов) и другим особенностям, отличающимся от неферментативного перекисления.

Группировка опытов на кроликах

Группа	Состав рациона	Жировой компонент (10%)	Число кроликов
1-я	Модифицированный синтетический рацион Виганда: казеин, крахмал, сахар, глюкоза, дрожжи, смесь солей, целлюлоза, витамина А и D	Окисленный маргарин	17
2-я	Тот же	Говяжий жир	15
3-я	Полунатуральный рацион: овес, свекла, крахмал, хлорид натрия	Окисленное кокосовое масло	11
4-я	Полусинтетический рацион: казеин, экстрагированный овес, крахмал, дрожжи, смесь солей, солома, витамины А, D	Кокосовое масло	14

берман — Бурхарда) и токоферол [4]. В тканях печени и аорты определялись перекиси липидов тиобарбитуровым тестом, а у части кроликов перекиси липидов идентифицировались прямым гистохроматографическим методом [10]. β -Липопротеины крови определялись по М. Ледвиной, перекисная резистентность эритроцитов по Брюггеману в 1—2-й и по Ягеру в 3—4-й группах опытов.

Аорты кроликов *in toto* окрашивались суданом, степень атеросклероза оценивалась визуально по пятибалльной системе. В части опытов аорта и печень исследовались микроскопически.

Срезы окрашивались на липиды — суданом черным, на общую структуру — по ван Гизону, на эластик — орсеином по ТендерУнну, на кальций — по Коссу.

Переход с обычного корма на рацион с окисленным маргарином кролики переносили удовлетворительно, большинство прибавило в весе. Изменения в уровне липидов сыворотки представлены на рис. 2. Наибольшее повышение липидов наблюдалось на 100-й день опыта, в последующем оно снижалось, однако уровень β -липопротеинов и холестерина все же значительно превышал исходный. Существенно повысился уровень липидов в печени.

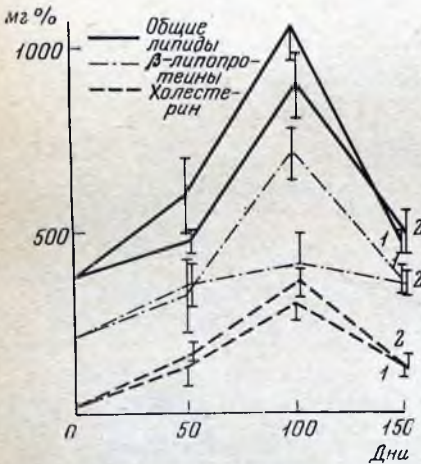
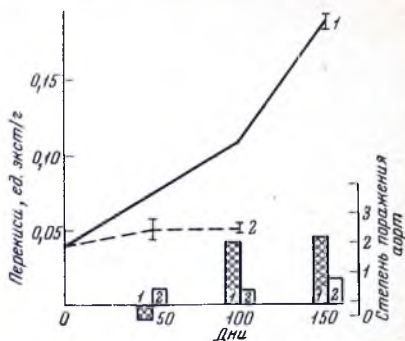


Рис. 2. Липиды сыворотки крови у кроликов 1-й (1) и 2-й (2) групп

Рис. 3. Содержание перекисей липидов в аортах (кривые) и степень поражения их атеросклерозом (столбцы) у кроликов 1-й (1) и 2-й (2) групп



У животных быстро развивался синдром липидной перекисидации (табл. 2), снижалось содержание токоферола в крови и тканях, в печени и аорте накапливались перекиси липидов.

На вскрытии 17 кроликов у 14 обнаружено поражение аорт. Изменения оказывались столь резкими, что о наличии их можно было заключить уже по наружному виду искривленной и уплотненной аорты еще до вскрытия сосуда и осмотра интимы. Обнаруживаемые макроскопически изменения в аорте заметно отличались от наблюдаемых при холестериневой или триглицеридной (по Виганду) моделей. Поражения проявлялись в виде бляшек и деформаций (искривленности) интимы. На ощупь отдельные участки аорты имели каменистую консистенцию.

Морфологические данные этой группы опытов детально описаны в другом сообщении [9]. Изменения выражались умеренными явлениями липидоза и выраженными явлениями фиброза, деструкции эластики и очагами кальциноза, обычно не наблюдаемыми при кормлении кроликов холестерином или нативным жиром.

15 кроликам 2-й группы в составе той же полусинтетической диеты скармливался говяжий жир. Предполагалось, что низкое (по сравнению с маргарином) содержание в нем полиеновых жирных кислот и токоферола повысит атерогенность экспериментального рациона. Диета с говяжьим жиром переносилась плохо, некоторые животные отказывались от корма, часть кроликов погибла и исключена из наблюдения. Как и у кроликов 1-й группы, у животных 2-й группы развивалась гиперлипемия (см. рис. 2), прогрессивно нарастало содержание холестерина в печени.

Синдром липидной перекисидации у кроликов, получавших говяжий жир, развивался значительно медленнее, чем у животных 1-й группы (табл. 2, рис. 3).

При вскрытии макроскопически поражение аорт атеросклерозом найдено лишь у 8 из 15 кроликов. Гистологически в интима наблюдали зоны отложения липидов в виде мелких капель; при 150 днях наблюдения выявлялись как начальная, так и выраженная липидная инфильтрация. В местах выраженного липидоза наблюдались умеренная деструкция эластических элементов и явления фиброза. В целом микроскопически картина была сходной

Развитие синдрома пероксидации липидов

Группа	Показатель	Токоферол сыворотки крови					
		мг%			мг% липидов		
	Норма	0,67±0,08			2,28±0,38		
	Дни	50	100	150	50	100	150
1-я	<i>M</i>	0,67	0,49	0,36	1,32	0,48	0,82
	<i>± m</i>	0,11	0,05	0,08	0,26	0,07	0,18
2-я	<i>M</i>	0,48	0,49	0,43	1,40	0,58	0,90
	<i>± m</i>	0,13	0,12	0,04	0,31	0,16	0,09
3-я	<i>M</i>	0,85	0,55	0,76	1,81	0,78	1,38
	<i>± m</i>	0,09	0,08	0,13	0,31	0,13	0,28
4-я	<i>M</i>	0,69	0,45	—	1,15	0,92	—
	<i>± m</i>	0,10	0,07	—	0,23	0,21	—

с наблюдавшейся нами ранее в опытах с введением нативного маргарина [9].

Представленные результаты опытов с введением окисленного маргарина и говяжьего жира подтверждают атерогенную роль свободно-радикального окисления липидов: большая степень поражения аорт наблюдалась в 1-й группе с ранним и быстрым развитием синдрома пероксидации. Темп и степень развития синдрома пероксидации липидов сказывается не только на выраженности изменений в аорте. В 1-й группе с более резким усилением перекисления липидов наблюдалась отличающаяся картина поражения с преобладанием деструкции эластики, фиброза и с кальцинозом, отсутствующими во 2-й группе. Сопоставление микроскопических изменений в аортах кроликов 1-й группы на разных сроках наблюдения допускает возможность деструкции эластических волокон до отложения на них липидов; модель, воспроизведенная у 1-й группы кроликов, отличающаяся по морфологической картине и ведущему патогенетическому фактору от холестериновой и триглицеридной моделей, названа перекисно-липидной [9]. Если холестериновая и триглицеридная модели по характеру изменений в артериальной стенке и последовательности их развития повторяют сорбционный тип морфогенеза атеросклероза человека по Г. Г. Автандилову [1], то перекисно-липидную модель можно считать эквивалентом деструктивно-фиброзного типа.

Эквивалентность перекисно-липидной модели деструктивно-фиброзному типу атеросклероза подтверждается еще и следующим обстоятельством. Деструктивно-фиброзный тип морфогенеза ха-

Токоферол печени						Степень поражения аорт		
мг%		мг г липидов		перекиси, ед. экстр. г ткани печени				
100	150	100	150	100	150			
1,94±0,22		0,73±0,01		0,04±0,01		50	100	150
1,71	1,56	0,32	0,34	0,08	0,09	0	2	2,2
0,19	0,27	0,05	0,06	0,01	0,01	—	—	—
2,02	1,81	0,54	0,40	0,06	0,18	0,5	0,5	1
0,53	0,38	0,11	0,10	0,01	0,01	—	—	—
1,99	2,34	0,43	0,87	0,10	0,09	1	0,7	0,7
0,35	0,35	—	0,31	0,01	0,01	—	—	—
1,02	—	0,22	—	0,09	—	3,3	3,1	—
0,12	—	0,04	—	0,02	—	—	—	—

рактен для возрастного типа патогенеза атеросклероза [1]. Изучение спонтанных возрастных изменений в аортах кроликов, наблюдавшихся нами (найлены у 3 из 50 вскрытых взрослых кроликов вивария), обнаруживает значительное сходство их с изменениями, воспроизводимыми перекисно-липидной моделью.

В 1-й группе опытов атерогенное значение могли иметь как экзогенные продукты перекисидации (окисленного маргарина), так и эндогенные перекиси. Для изучения эффекта экзогенных перекисей 11 кроликам 3-й группы опытов вводилось окисленное кокосовое масло в смеси с натуральными продуктами. У животных этой группы возросло содержание липидов в печени, развилась гиперлипемия (рис. 4).

Умеренное развитие синдрома перекисидации проявлялось снижением относительного содержания токоферола в сыворотке крови и тканях, накоплением перекисей липидов в тканях (см. табл. 2); существенно повышался перекисный гемолиз

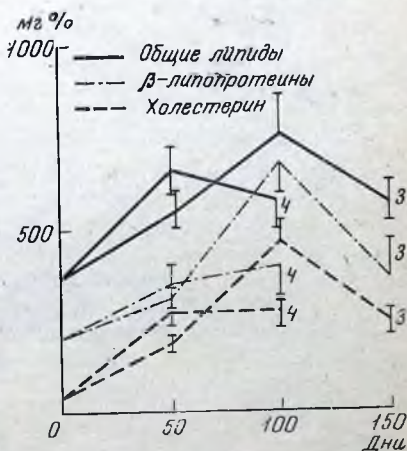


Рис. 4. Липиды сыворотки крови у кроликов 3-й (3) и 4-й (4) групп

с $18 \pm 1,5\%$ в норме до $47 \pm 5\%$ на 100-й день опыта. У 7 из 11 кроликов 3-й группы найдены начальные атеросклеротические изменения в виде очагов липидоза в устье арты.

В 4-й группе опытов 14 кроликам вводилось рафинированное кокосовое масло в составе полусинтетической диеты, в которую включались натуральные продукты — овес, солома. Овес подвергался спирто-эфирной экстракции для удаления липидных антиоксидантов (токоферола, убихинона, полифенолов).

У всех кроликов возросло содержание холестерина в печени, повысилось содержание общих липидов и холестерина в крови. Быстро проявлялось развитие антиоксидантной недостаточности (см. табл. 2), перекисный гемолиз возрос до $55 \pm 5\%$. У всех кроликов макроскопически обнаруживались изменения в аорте. Гистологически эти изменения, как и в 1-й группе опытов, проявлялись в форме отдельных участков липидной инфильтрации, обширных зон деструкции эластики в интима и внутренней трети медиального слоя, очагов клеточной инфильтрации, фиброза и кальциноза.

Таким образом, в 4-й группе опытов при введении нативного жира и резком лишении антиоксидантов воспроизводится перекисно-липидная модель атеросклероза. В 4-й серии опытов, как и в 1-й, изменения в аорте во многом напоминают спонтанные возрастные.

Изучение печени кроликов на липопигменты выявило при окраске суданом черным парафиновых срезов внутриклеточно расположенные гранулы. Нерастворимость в жирорастворителях позволяет рассматривать их как липохромный пигмент типа цероида или липофусцина. Этого рода пигмент характерен как для Е-авитаминоза, так и для старых животных. Таким образом, воспроизведенный в 4-й группе фиброзно-деструктивный тип атеросклероза, характерный для пожилого возраста, как и у человека, сопровождался накоплением в паренхиматозной ткани липохромного пигмента.

Изложенные результаты экспериментов с воспроизведением синдрома липидной пероксидации и поражения артерий подтверждают существенную роль свободно-радикального пути окисления липидов в генезе старения и атеросклероза.

Свободно-радикальные процессы как ведущие факторы старения уже давно выдвинуты в теориях Хармана [30—32], Беркштейна [29], Стрелера [27]. Однако в этих теориях («поперечных сшивок» и др.) не учитываются источник и причины появления свободных радикалов. Таппель [33] впервые указал на переокисление липидов как фактор старения.

В настоящей работе, нам кажется, впервые представлены прямые эксперименты, показывающие индуцирующую роль свободно-радикального окисления липидов в одном из проявлений старения. Во-вторых, четко определяется первоисточник свободных радикалов и перекисей как факторов геронтогенеза — нефермен-

тативное свободно-радикальное окисление, индуцированное недостаточностью его ингибирования биоантиоксидантами.

Чрезмерное или длительное неферментативное свободно-радикальное окисление несовместимо с жизнью. Биологическое ингибирование свободно-радикального окисления — защита мембран, ферментов и ДНК — осуществляется физиологической антиоксидантной системой [7]. Эта система включает антирадикальную группу антиоксидантов, транспортирующую атомы водорода от НАДФ·Н на свободные радикалы, благодаря чему они регенерируются в исходные молекулы [33]:



Функционирование этой группы требует:

1. Достаточного поступления экзогенных компонентов (токоферола, аскорбината, предшественника глутатиона — метионина);
2. Достаточного уровня ферментативных процессов, продуцирующих НАДФ·Н — гликолиза и β -окисления жирных кислот;
3. Достаточного уровня энзимов — глутатионредуктазы, глутатиондегидрогеназы.

Вторая группа антиоксидантов — антиперекисная — включает ферменты пероксидазы и каталазу. Эта группа, катализируя распад перекисей липидов и перекиси водорода, прерывает разветвление цепного процесса. Функционирование антиперекисной группы требует достаточного уровня синтеза пероксидаз и каталаз. Антирадикальная и антиперекисная группы взаимосвязаны, срыв одной из них, например антирадикальной, лишь временно может компенсироваться высокой активностью антиперекисной [13].

Представление о ведущей роли абиотического неферментативного свободно-радикального окисления в старении и о системности его ингибирования позволяет выделить следующие факторы, индуцирующие свободно-радикальное окисление — старение.

1. Ежегодная весенняя недостаточность антиоксидантов. Весенний дефицит антиоксидантов у человека, впервые установленный в отношении аскорбиновой кислоты [23, 24], доказан также для полифенолов [24] и токоферола [17].

Одновременное снижение обеспеченности несколькими компонентами антирадикальной группы системы ингибирования приводит к вспышке свободно-радикального окисления, регистрируемой, например, в липопротеинах крови [14].

2. Стресс. Биологический «запас» ответной реакции (избыток поступления в ткани субстрата и кислорода) приводит к сбросу липидов на свободно-радикальный путь окисления (см. рис. 1) и накоплению перекисей липидов [3]. Роль стрессорных воздействий в старении известна, как и примеры внезапного постарения при тяжелом эмоциональном стрессе.

3. Лучевой фон. Перекисеобразующее действие облучения и его геронтогенное влияние общеизвестны.

4. Избыток калоригенных продуктов. Чрезмерное поступление калоригенных веществ переводит липиды на свободно-радикальный путь окисления [25, 28]. Геронтогенные последствия переедания наглядно демонстрируют известные наблюдения Мак Кея над крысами, показавшие увеличение продолжительности жизни при ограничении рациона.

5. Гиподинамия. Несмотря на снижение ферментативного окисления, гиподинамия сопровождается увеличением утилизации кислорода [19] — усилением неферментативного свободно-радикального окисления. Геронтогенное влияние гиподинамии четко демонстрируют опыты В. В. Тявокина.

Антиперекисная группа антиоксидантной системы представлена энзимами и активность ее определяется генетическими механизмами. Установленное снижение с возрастом у животных активности каталазы и пероксидаз [2], возможно, определяется наследственной программой и составляет механизм признаваемого геронтологами генетического фактора старения.

Допустимо также предположение, что синдром преждевременного старения — прогерия, сопровождающийся накоплением в тканях продукта пероксидации липидов (липофусцина), является следствием врожденной недостаточности пероксидаз или каталазы.

Каковы возможные механизмы участия перекисления липидов в развитии атеросклероза? Современные данные позволяют считать, что свободно-радикальное окисление участвует во всех главных звеньях морфогенеза атеросклероза [6, 8—16].

Важнейшим субстратом атерогенеза являются β -липопротеины, липидный компонент которых оседает на структурах иптимы [20—22]. Свободно-радикальное окисление β -липопротеинов резко усиливает их декомпозицию при гельфильтрации через слой эластина [14]. Свободно-радикальное окисление участвует и в другом раннем проявлении атерогенеза — деструкции эластике. В поддержании структуры эластина велика роль гидрофобных связей. Степень деструкции эластике параллельна выраженности синдрома пероксидации [9]. Среди различных фракций липидов артерий пероксидируются в первую очередь фосфолипиды [10], значительная часть которых участвует в построении эластических волокон. Очевидно, перекисление фосфатидов эластике, нарушая гидрофобные взаимодействия, приводит к ее деструкции. Демаскирование при этом центром кристаллизации кальция индуцирует кальциноз артерий. Прямое участие процессов перекисления подтверждается профилактическим действием при кальцинозе артерий антиоксидантов [26]. Разрастание соединительной ткани при атеросклерозе является реакцией на липидоз. Поскольку из всех липидов, отлагающихся в артериях, химически и биологически наиболее агрессивны перекиси липидов, можно полагать, что они и являются агентом, непосредственно индуцирующим процессы фиброза.

Л И Т Е Р А Т У Р А

1. *Астандидов Г. Г.* Динамика атеросклеротического процесса у человека. М., «Медицина», 1970.
2. *Безерсаи И. С.* В кн. «Старение клетки». Киев, 1971, стр. 430.
3. *Брехман И. И., Головин В. Г., Гоненко В. А., Добрякова А. И.* В кн. «Биоантиокислители и регуляция окислительных процессов в клетке». МОИП. М., Изд. МГУ, 1972, стр. 18.
4. *Воскресенский О. Н.* В кн. «Материалы научной сессии ВНИИ витаминологии МЗ СССР». М., 1967, стр. 201.
5. *Воскресенский О. Н.* В кн. «Витамины при сердечно-сосудистых заболеваниях». Материалы симпозиума. М., 1969, стр. 13.
6. *Воскресенский О. Н.* В кн. «Гипертоническая болезнь, атеросклероз и коронарная недостаточность». Киев, «Здоров'я», 1971, стр. 13.
7. *Воскресенский О. Н.* В кн. «Биоантиокислители и регуляция окислительных процессов в клетке». МОИП, М., Изд. МГУ, 1972, стр. 23.
8. *Воскресенский О. Н.* Вопросы мед. химии, 1973, 1, 89.
9. *Воскресенский О. Н., Витт В. В.* Архив патологии, 1971, 6, 51.
10. *Воскресенский О. Н., Витт В. В.* В кн. «Биоантиокислители и регуляция окислительных процессов в клетке». МОИП. М., Изд. МГУ, 1972, стр. 24.
11. *Воскресенский О. Н., Витт В. В., Маценко Б. Н.* В кн. «9-й Международный конгресс геронтологов», т. 3. Киев, 1972, стр. 304.
12. *Воскресенский О. Н., Левицкий А. П.* Вопросы мед. химии, 1970, 6, 563.
13. *Воскресенский О. Н., Левицкий А. П.* В кн. «Фармакологическая регуляция обменных процессов». Л., 1972, стр. 112.
14. *Воскресенский О. Н., Левицкий А. П., Витт В. В., Маценко Б. Н.* В кн. «IV Международный биофизический конгресс», т. 4. М., 1972, стр. 203.
15. *Воскресенский О. Н., Легада Е. А.* В кн. «Профилактика и терапия заболеваний сельскохозяйственных животных». Одесса, 1972, стр. 233.
16. *Воскресенский О. Н., Максимович Я. Б., Маценко Б. Н.* В кн. «Congress of the society for physiological Sciences. Abstracts of papers». Sofia, 1970, 48.
17. *Воскресенский О. Н., Маценко Б. Н., Москети К. В.* В кн. «Материалы VI научной конференции, посвященной 50-летию освобождения Дальнего Востока от интервентов и белогвардейцев». Хабаровск, 1972, стр. 53.
18. *Воскресенский О. Н., Рогинский П. П.* В кн. «Материалы III съезда фармакологов СССР». Киев, 1971, стр. 59.
19. *Галушко Ю. С., Абакумова И. А., Ниточкина И. А.* В кн. «Актуальные вопросы космической биологии и медицины». М., 1971, стр. 77.
20. *Климов А. Н.* В кн. «Структура, биосинтез и превращения липидов в организме животного и человека». Л., 1972, стр. 72.
21. *Климов А. Н., Ловягина Т. Н.* Патол. физиол. и эксперим. терапия, 1960, 2, 3.
22. *Климов А. Н., Ловягина Т. Н., Петрова-Маслакова Л. Г., Родионов Л. П., Синицина Т. А., Баньковская Э. Б.* Вестник АМН СССР, 1969, 9.
23. *Климов А. Н., Слапик В. К.* Военно-мед. журн., 1953, 8, 40.
24. *Литвишкова Л. А.* Витамины С и Р при атеросклерозе. Автореф. канд. дисс. 1965.
25. *Покровский А. А.* Вопросы питания, 1971 2, 55.
26. *Спиричев В. Б., Блажевич Н. В.* В кн. «Материалы симпозиума «Витамины при сердечно-сосудистых заболеваниях». М., 1969, стр. 57.
27. *Стрелер Б.* Время, клетки и старение. М., «Мир», 1964.
28. *Alfin-Slater V. B., Hansen H., Morris R. S., Melnick D. J.* Am. Oil. Chem. Soc., 1969, 46, 10, 563.
29. *Biorkstén J. J.* Am. Ger. Soc., 1962, 10, 125.
30. *Harman D. J.* Gerontol., 1960, 15, 38.
31. *Harman D. J.* Am. Ger. Soc., 1969, 17, 8, 721.
32. *Harman D.* Rev. franc. corps. gras., 1971, 18, 4, 203.
33. *Tappel A.* Geriatrics, 1968, 23, 10, 97.
34. *Wigand G.* Acta medica Scandinavica, 1959, 166, 351, 1.