

13. *Matutes E., Catovsky D.* The fine structure of normal lymphocyte subpopulations — a study with monoclonal antibodies and the immunogold technique // Clin. and Exp. Immunol.—1982.—N 50.—P. 416—425.
14. *Miller E., Ramage E. F., Dewar A. E. et al.* A double labelling technique for the analysis of lymphocyte subsets on a singlelaser flow cytometer // Med. Lab. Sci.—1987.—44, N 2.—P. 192—195.
15. *Morishita Y., Martin P. J., Bean M. A.* Antigen-specific function of a CD4⁺ subset of human T-lymphocytes with granular morphology // J. Immunol.—1986.—136, N 6.—P. 2095—2102.
16. *Velardi A., Grossi C. E., Cooper M. D.* A large subpopulation of lymphocytes with T helper phenotype (Leu 3/4⁺) exhibits the property of binding to NK cell targets and granular lymphocyte morphology // Ibid.—1985.—134, N 1.—P. 58—64.

Киев, ин-т эндокринологии

и обмена вещества М-ва здравоохранения УССР

Материал поступил в редакцию

06.02.89

УДК 577.121.7+125+161.2

А. В. Паранич, Л. А. Чайкина, И. А. Ионов

Особенности состава флюоресцирующих липопигментов печени и мозга крыс разного возраста

Универсальная способность клеток накапливать с возрастом флюоресцирующий липопигмент — липофусцин послужила основанием для использования этого показателя в качестве маркера старения в модельных геронтологических исследованиях. Правомерность такого подхода очевидна. Но, по данным хроматографического анализа экстракта липопигментов смесью хлороформа с метаном, фракция, идентифицируемая как липофусцин, составляет только около 5 % общей массы экстракта [8]. Не исключено также, что ультраструктурные, гистохимические, спектральные и другие свойства пигмента старения будут зависеть от остальной подавляющей массы флюорофоров, состав и свойства которых изменяются с возрастом и в большой мере определяются внешними факторами. Данные литературы свидетельствуют о том, что липопигменты, накапливающиеся в клетках молодых и старых животных, различаются по морфологическим показателям — количеству и распределению внутриклеточных гранул [9], способности к окрашиванию красителями, способности гидролизоваться трипсином и липазой [13, 14], флюоресцентным свойствам — характерным длинам волн возбуждения и испускания [11, 14], длине алкильных заместителей [12], времени жизни возбужденного состояния [6]. Показано также, что накапливающийся в клетках Е-авитаминозных животных липопигмент отличается от такового, откладывающегося при естественном старении [10].

В этой связи представляют значительный интерес изучение и идентификация фракционного состава липопигментов, особенно их подвижной низкомолекулярной составляющей, не флюоресцирующей в диапазоне, характерном для оснований Шиффа. Эти фракции, по показателю R_f 75—85, 93—97, не обнаружены в составе липопигментов, экстрагированных из растений [1], а в образцах из тканей животных, они по видимому, отвечают за появление в спектре флюоресценции неидентифицированного пика «0» [7].

Цель нашей работы — изучение возрастных особенностей состава липопигментов, экстрагированных из печени и мозга крыс, по их спектральным характеристикам и фракционному составу.

Методика

В эксперимент были взяты крысы самки линии Вистар 1, 3, 12, 24-месячного возраста (по пять животных каждого возраста), содержавшихся на обычном рационе вивария. Животных декапитировали, извлекали печень и мозг, в которых определяли количество липопигментов по методу Tappel [17]. Спектральные характеристики хлороформенных вытяжек, полученных из 1 г соответствующей ткани, изучали на двухлучевом спектрофотометре Hitachi 356 в диапазоне длин волн от 240 до 700 нм. С целью разделения смеси липопигментов проводили тонкослойную хроматографию (ТСХ) на пластинках Силуфол. В качестве движущей фазы использовали хлороформ. Полноту разделения смеси контролировали в ультрафиолете [5]. Низкомолекулярные подвижные фракции с R_f 74—85 и 95—97 соскребали с пластин вместе с сорбентом и экстрагировали хлороформом. Экстракты использовали для спектрофотометрических измерений, а также для высокоэффективной жидкостной хроматографии на хроматографе Милихром. Полученные результаты обрабатывали с помощью методов математической статистики [2] и анализировали в виде гистограмм.

Результаты и их обсуждение

На рис. 1, а и б представлены типичные для крыс разного возраста дифференциальные спектры экстрактов липопигментов печени и спектры поглощения 2-й (R_f 75—85) и 3-й (R_f 95—97) фракций, полученных после ТСХ экстрактов липопигментов. Эти спектры обнаруживают два максимума поглощения света экстрактами в области 280 и 330 нм и показывают существование возрастных особенностей химического состава экстрагируемых липопигментов печени и мозга (спектры экстрактов из мозга аналогичны). Фракции 2-я и 3-я после ТСХ не флуоресцируют в диапазоне длин волн, характерных для липофусцина. Поэтому мы посчитали целесообразным исследовать возрастные изменения именно в этих фракциях, поскольку только при таком подходе можно оценить вклад флюорофоров в количество определяемых липопигментов.

Как показано на гистограммах, рис. 2, а, в спектрах поглощения экстрактов из тканей молодых неполовозрелых крыс (1 мес) нет максимума в области 330 нм. С возрастом интенсивность поглощения при длинах волн, характерных для обоих максимумов поглощения — 330 и 280 нм, увеличивается, достигая наибольшего значения в 12 мес, а затем уменьшается: в печени 24-месячных крыс — в 2,5 (330 нм) и 3,5 (280 нм) раза по сравнению с таковой 12-месячных животных.

Для ткани мозга характерна такая же возрастная зависимость, хотя и на более низком количественном уровне, что указывает на существование функциональных тканевых особенностей липидного обмена и процессов перекисного окисления липидов, конечным продуктом которого является липофусцин. Аналогичная картина наблюдается при адаптации человека к новым климатогеографическим условиям [3].

На рис. 2, б представлена суммарная гистограмма двух подвижных фракций (2-я и 3-я), не флуоресцирующих в области флуоресценции оснований Шиффа (максимум возбуждения их составляет 360 нм). На основании анализа результатов спектрофотометрии выделено четыре характерных максимума поглощения: 250, 260, 280, 430 нм, суммарная интенсивность поглощения обеих фракций при этих длинах волн и приведена на рис. 2, б. Общая структура спектров сходна в тканях печени и мозга. Однако у молодых половозрелых крыс (3 мес) количественно преобладает вещество с максимумом поглощения при 250 нм. В экстрактах же, полученных из мозга 1-месячных животных этого пика нет, а наибольшее количество вещества имеет максимум поглощения при 260 нм. Во второй половине онтогенеза в экстрактах печени и у крыс всех возрастных групп в экстрактах мозга содержится вещество с максимумом поглощения (λ) при 260 нм. Содержание вещества с $\lambda=280$ нм в экстрактах печени у молодых крыс (1—3 мес) соответствует количеству вещества с $\lambda=250$ нм, а второй половине онтогенеза —

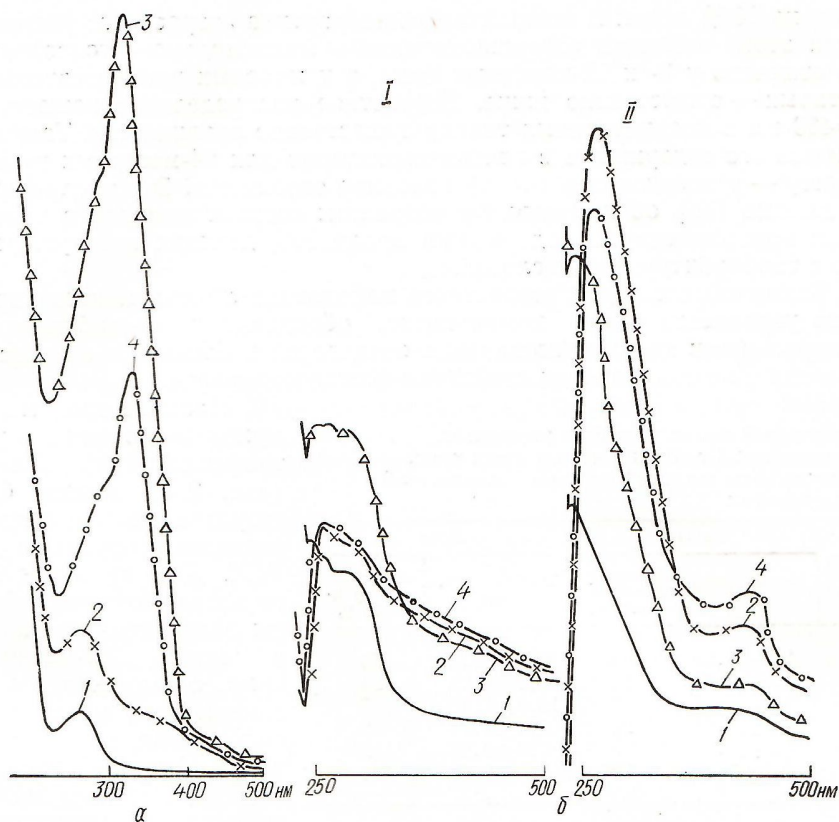


Рис. 1. Дифференциальные спектры (а) и спектры поглощения 2-й (I) и 3-й (II) фракций, полученных после тонкоструйной хроматографии (б), экстрактов липопигментов печени крыс разного возраста: 1 — 1, 2 — 3, 3 — 12, 4 — 24 мес.

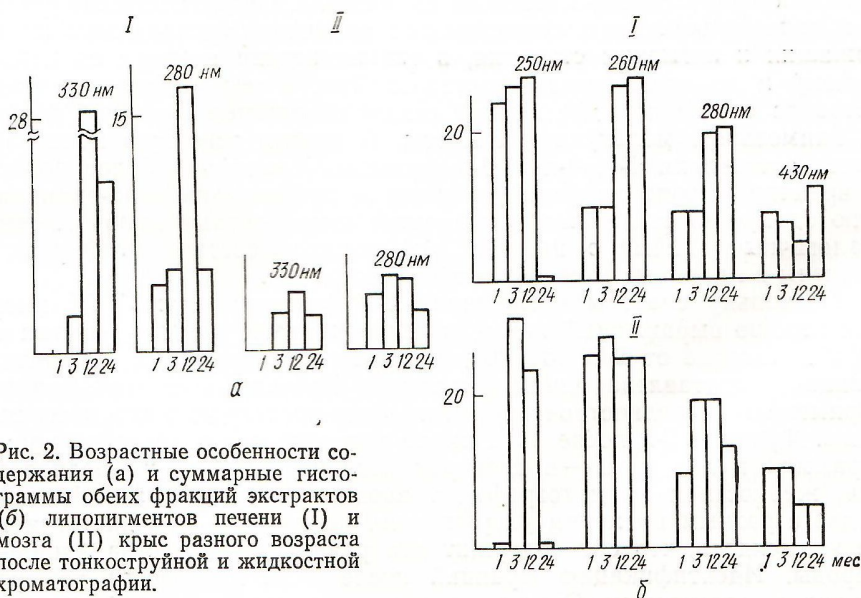


Рис. 2. Возрастные особенности содержания (а) и суммарные гистограммы обеих фракций экстрактов (б) липопигментов печени (I) и мозга (II) крыс разного возраста после тонкоструйной и жидкостной хроматографии.

почти на 20 % ниже. В экстрактах мозга картина возрастного распределения этого вещества совершенно иная — максимальное его содержание отмечено у 3- и 12-месячных крыс, а у молодых неполовозрелых и у старых — существенно ниже. Возрастное распределение вещества с $\lambda=430$ нм в исследованных тканях существенно различается. Так, наибольшее его содержание в печени характерно для 24-месячных крыс, а в мозгу — у животных в первой половине онтогенеза. Это подтверждают данные [16] об изменении с возрастом состава липидов в эритроцитах при неизменном содержании продуктов, дающих цветную реакцию с тиобарбитуровой кислотой.

Таким образом, для возрастного накопления липопигментов характерно увеличение числа компонентов, обладающих специфическими спектральными характеристиками в оптической и близкой к оптической областях и не обладающих свойством флюоресцировать.

Фракционный состав липидных экстрактов, полученных из 1 г ткани печени и мозга крыс, по результатам высокоэффективной жидкостной хроматографии

Номер фракции	Печень		Мозг	
	Высота пика, мм	Содержание фракций, %	Высота пика, мм	Содержание фракций, %
1	9,3±1,08	23	86,3±16,17	50
2	5,0±0,47	12	60,3±6,22	34
3	1,3±0,58	3	12,6±1,18	7
4	8,6±0,27	22	4,0±0,94	2
5	2,6±0,27	6	3,0±0,02	2
6	13,0±0,82	32	8,0±0,03	4

Примечание. Число животных составляет 5.

Результатам хроматографии, общий экстракт из обеих тканей содержит смесь веществ, состоящую из шести фракций, пронумерованных по времени выхода из колонки и отличающихся по молекулярной массе или способности сорбироваться на силикагеле. Представленные результаты свидетельствуют о существенных различиях состава липидов, содержащих и пигменты старения, в тканях печени и мозга по качественному и количественному составу. Так, в мозгу основную массу экстракта составляли две первые самые подвижные фракции, вероятно, наименьшей молекулярной массы. В печени основную массу экстракта составляли 1-я, 4-я и 6-я фракции. Среди них более поздние по времени выхода из колонки фракции представляют, по-видимому, долю стабильно связанных с тяжелыми компонентами липопигментов. Аналогичные данные о наличии особенностей состава флюорофоров получены в липидных экстрактах хрусталика [4].

Поскольку спектры поглощения 3-й фракции после ТСХ имеют один хорошо выраженный пик и не обнаруживают дополнительных пиков в диапазоне от 245 до 700 нм, можно предположить, что данная фракция представлена одним веществом. Исследование этой фракции с применением жидкостной хроматографии подтвердило это предположение. Фракция 2-я после ТСХ имела вид размытого пятна на хроматограммах и два пика — в спектрах поглощения. Как и предполагалось, жидкостная хроматография позволила разделить эту фракцию на две с разным временем удерживания на колонке, что дает основание утверждать, что она содержит два различных вещества липидной природы. Идентификацию фракций после ТСХ произвести не представлялось возможным. Однако некоторые предположения о их природе можно сделать опираясь на данные Sklan и Budowski [15], проводивших ТСХ смеси витаминов и стеролов. Используя в качестве по-

Наличие трех максимумов поглощения в ультрафиолетовой области (рис. 2, б) может быть результатом неполного разделения фракций при ТСХ. Для проверки этого предположения образцы экстрактов из печени и мозга 12-месячных крыс, с выраженным наличием всех максимумов поглощения, а также 2-ю и 3-ю фракции исследовали с помощью метода жидкостной хроматографии. Результаты этих исследований представлены в таблице. По ре-

движной фазы смесь хлороформа с ацетоном (9:1), авторы идентифицировали фракцию, имеющую R_f 97, с дегидроретинолом. Не устанавливая прямой аналогии с приведенными результатами, можно утверждать, что обнаружение в составе липопигментов жирорастворимых витаминов в неактивной форме, либо в виде комплексов с липидами, в качестве антиоксидантов не противоречит развиваемым в литературе представлениям о существовании запасных депо антиоксидантов, мобилизуемых клеткой в экстремальных состояниях.

Выводы

1. Возрастному накоплению пигментов старения сопутствует структурное преобразование всего липидного окружения.

2. Накопление пигментов старения не монотонно и имеет выраженные возрастные особенности.

3. Образование липопигментного комплекса тканеспецифично.

PECULIARITIES OF THE COMPOSITION OF FLUORESCENT LIVER AND BRAIN LIPOPIGMENTS IN RATS OF DIFFERENT AGE

A. V. Paranich, L. A. Chaikina, I. A. Ionov

Spectral characteristics of the lipid liver and brain extracts were studied in experiments on rats of different age (1, 3, 12, 24 months). The aim of the experiments was to study age peculiarities of the lipopigments composition by means of thin-layer and liquid chromatography. Different fractions of lipids which differ in spectral absorption and fluorescence were extracted. Proceeding from the results obtained certain conclusions may be derived: the processes of structural recombination of the whole lipid constituents are accompanied by the age accumulation of lipofuscin; the process of accumulation of lipofuscin is not monotonous and has pronounced age peculiarities; the formation of the lipid-pigment complex is tissue-specific.

A. M. Gorky State University, Ministry of Higher and Secondary Special Education of the Ukrainian SSR, Kharkov

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Мерзляк М. Н., Румянцева В. Б., Коврижных В. А., Гусев М. В. Липорастворимые «пигменты старения» растений // Надежность и элементарные события процессов старения биологических объектов.— М., 1986.— С. 176—182.
2. Рокицкий П. Ф. Биологическая статистика.— Минск: Высшейш. школа, 1973.— 352 с.
3. Ушкалова В. Н., Кадочникова Г. Д. Использование параметров, характеризующих активность перекисного окисления липидов, при изучении адаптации человека к новым климатогеографическим условиям // Бюл. эксперим. биологии и медицины.— 1987.— 103, № 5.— С. 571—573.
4. Шведова А. А., Платонов Е. С., Полянский Н. Б. и др. Химическая природа флюоресцирующих продуктов, накапливающихся в липидах хрусталиков мышей с наследственной катарактой // Там же, № 3.— С. 301—304.
5. Шталь Э. Хроматография в тонких слоях.— М.: Мир, 1965.— 396 с.
6. Basson A. B. K., Terblanche S. E., Oelofsen W. A comparative study on the effects of ageing and training on the levels of lipofuscin in various tissues of the rat // Comp. Biochem. and Physiol.— 1982.— 71A.— P. 369—374.
7. Altvägar T., Balcarage W. X. Fluorescence observation of membrane localized age pigment // Pharmacological intervention in the ageing process.— New York; London, 1979.— Vol. 97.— P. 293—296.
8. Blaayboer A. J., Novak L., Hooghwinkel G. J. M. Organic solvent soluble lipofuscin pigment in brain tissues of mice fed large amounts of polyunsaturated fats in presence and absence of various antioxidants // Int. J. Vitam. and Nutr. Res.— 1979.— 49.— P. 198—208.
9. Hiroshi I., Hisachi T., Tsuneko S. Fine structural analysis of lipofuscin in various tissues of rats of different ages // Mech. Ageing and Develop.— 1985.— 33.— P. 77—93.
10. Katz M. L., Robison W. A., Herrmann I. R. K. et al. Lipofuscin accumulation resulting from senescence and vitamin E deficiency: spectral properties and tissue distribution // Ibid.— 1984.— 25.— P. 149—159.