

В.В.Фролькіс, С.М.Новікова, Л.Н.Богацька, Р.І.Потапенко,
Т.Г.Мозжухіна, О.К.Кульчицький, М.К.Бурчинська, Г.В.Копилова

Вплив олівоміцину на спонтанну регресію експериментального атеросклерозу у кролів різного віку

Развитие экспериментального атеросклероза у кроликов и период его спонтанной регрессии показывают увеличение частоты и выраженности атеросклеротического процесса с возрастом. Исследование принципиально нового подхода к лечению этого заболевания показало, что воздействие на биосинтез белка оливомидин значительно ускоряет регрессию экспериментального атеросклероза, приводит к более быстрому и значительному снижению ряда показателей белкового и липидного обменов.

Вступ

Відомо, що розвиток атеросклерозу визначається факторами, серед яких провідну роль відіграють дисліпопротеїнемії (ДЛП). Вони характеризуються змінами у складі, вмісті та співвідношенні окремих ліпідів і ліпопротеїнів крові (ЛП) [5]. Зростання розповсюдження ДЛП у людей старших вікових груп є одним із факторів, які визначають взаємозв'язок старіння та атеросклерозу. Фролькісом [6] висунута концепція про зв'язок гено-регуляторних механізмів старіння з розвитком захворювань пов'язаних з віком. Зокрема, у розвитку атеросклерозу поряд зі змінами у ліпідному обміні велике значення мають порушення функції генома, що призводить до змін у складі, синтезі, властивостях і співвідношенні окремих аполіпопротеїнів - білкових компонентів ліпопротеїнових часток. Саме це визначає розвиток ДЛП, залежність атерогенних та антиатерогенних ЛП. Виходячи з цих уявлень, профілактика та лікування атеросклерозу мають базуватися не тільки на використанні засобів, що впливають на рівень ліпідів, а й на білкову частину ЛП - аполіпопротеїни.

Нашими дослідженнями [7, 10] було показано, що інгібітори біосинтезу білка незалежно від механізму дії запобігають розвитку ДЛП і атеросклерозу в експериментальних тварин.

Для вивчення вікових особливостей впливу інгібіторів біосинтезу білка на атеросклеротичний процес ми обрали етап його спонтанної регресії. Блокатором біосинтезу білка застосовано олівоміцин, який, зв'язуючись з ДНК, пригнічує функцію РНК-полімерази, тобто інгібує етап транскрипції [1].

Методика

Дослідження проведені на 42 кролях породи Шиншила віком 8-10 міс (дорослі) та 4,5-5,5 років (старі). Експериментальний атеросклероз моделювали тривалим (упродовж 4 міс) навантаженням холестерином (ХС) із розрахунку 0,25 г/кг за допомогою зонду у 10 %-му розчині соняшникової олії. Тварин утримували за стандартних умов віварію Інституту геронтології АМН України. При проведенні дослідів кролів умертвляли внутрішньовенним введенням етаміналу натрію (80 мг/кг). Олівоміцин вводили парантерально з розрахунку 50 мкг/кг щодобово протягом місяця після припинення навантаження ХС, тобто на етапі регресії атеросклеротичного процесу.

Кров для дослідження брали з краєвої вени вуха у вихідному стані та кожні 4 доби впродовж місяця. Після забою тварин проводили морфологічний аналіз ступеня розвитку атеросклеротичного процесу. Зразки тканин аорти (грудний відділ) виділяли відразу після забою тварин. Тканини фіксували протягом доби у 2,5 %-му розчині глютаральдегіду на фосфатному буфері (рН 7,4), а потім - у 2 %-му розчині чотирьохокису осмію на тому ж буфері. Промивку, дегідратацію та замикання у смолу епон-аралдіт здійснювали за загальновідомою методикою. Напівтонкі зрізи товщиною 1 мкм після фарбування толуїдиновим синім продивлялись у світовому мікроскопі. Ультратонкі зрізи контрастували ураніл-ацетатом і свинцем за методом Рейнольдса та досліджували на електронному мікроскопі JEM-100B (Японія). У плазмі крові визначали: загальний ХС [9], сумарні фосфоліпіди (ФЛ) [14], апо-В ЛП [4]. З плазми крові експериментальних тварин виділяли ЛП різної щільності (ЛПДНЩ, ЛПНЩ, ЛПВЩ2, ЛПВЩ3) за допомогою препаративного ультрацентрифугування у градієнті щільності NaBr [11]. В отриманих фракціях визначали: білок [12], загальний та вільний ХС, ефіри ХС [3]. Аполіпопротеїновий спектр вивчали в усіх вилучених фракціях ЛП за Swanney та Kuehl [15]. Біосинтез білка *in vitro* визначали у тканинах печінки та аорти експериментальних тварин [2].

Результати та їх обговорення

У першій серії дослідів встановлено вікові відмінності у розвитку атеросклеротичного процесу. Так, після припинення навантаження ХС, тобто в процесі зворотного розвитку експериментального атеросклерозу спостерігаються чіткі вікові відміни, які характеризують період його спонтанної регресії. Вони виявляються у більш значному зниженні рівня гіперхолестеринемії у дорослих тварин, порівняно зі старими (табл. 1). Якщо у дорослих тварин зниження концентрації загального ХС спостерігається вже на 21-шу добу, у старих це відбувається лише на 30-ту.

У процесі розвитку експериментального атеросклерозу вікові відмінності виявляються і у складі апо-білків фракцій атерогенних ЛП (табл. 2). Так, у дорослих тварин відзначається збільшення відносного

Таблиця 1. Динаміка холестеринемії при спонтанній регресії експериментального атеросклерозу у кролів різного віку, мг/дл

Доба	Група тварин	
	Дорослі	Старі
0	697,2±72,4	1334,2±54,4*
4	608,6±65,3	1192,7±72,5*
8	608,6±64,2	1156,7±56,2*
14	522,2±34,8	1154,0±64,6*
18	499,7±43,4	1099,2±70,8*
22	385,5±42,6	1095,2±48,2*
30	360,4±39,2	907,2±46,8*

* P<0,05 порівняно з дорослими тваринами.

Таблиця 2. Вміст (% від загальної оптичної щільності) апо-фракцій ліпопротеїнів низької щільності (ЛПНЩ) і ліпопротеїнів дуже низької щільності (ЛПДНЩ) у плазмі крові кролів різного віку за умов тривалого навантаження холестерином (ХС), М±m

Фракції апобілків	Молекулярна маса, КДа	Дорослі тварини		Старі тварини	
		Контроль	Введення ХС	Контроль	Введення ХС
ЛПНЩ					
АпоС	12,5	5,8±0,2	5,5±1,1	12,8±3,2**	0,6±0,02*
АпоЕ	35	2,8±0,5	6,9±1,0*	5,6±1,9**	1,5±0,2*
АпоAIV	51	4,0±0,5	11,8±1,4*	4,4±1,1	11,3±1,2*
АпоВ	100	87,4±3,1	80,3±4,2	79,4±5,7	86,5±2,5
ЛПДНЩ					
АпоС	12,5	8,6±2,0	5,4±0,4	5,9±1,1	7,8±1,2
АпоЕ	35	6,0±0,8	11,6±1,1*	10,6±1,9	9,5±0,4
АпоAIV	51	6,3±1,3	1,3±0,3*	5,7±1,4	0,8±0,2
АпоВ	100	85,8±2,2	82,5±3,2*	77,2±4,4**	80,0±4,2

* P<0,05 порівняно з контролем, ** P<0,05 порівняно з дорослими тваринами.

вмісту апоЕ та апоAIV, у старих - зниження апоС, апоЕ і збільшення апоAIV. Крім того, у ЛПНЩ крові старих тварин збільшується внесок високомолекулярних поліпептидів, які розцінювалися нами як неповні або деградовані молекули апоВ. Збільшення зони цих поліпептидів має місце і у фракції ЛПДНЩ як у дорослих, так і старих тварин. Відносний вміст апоAIV значно знижується у ЛПДНЩ крові кролів обох вікових груп, при цьому у дорослих тварин підвищується вміст апоЕ. Аналіз білкових спектрів ЛПНЩ і ЛПДНЩ виявляє підвищення відносної кількості субфракцій, які можна віднести до продуктів час-

ткової деградації апоВ. Наявність частково деградованих молекул апоВ-100 у ЛПНЩ розглядається у сучасній літературі як фактор, який підвищує атерогенність крові [13]. Сумарна кількість різних форм апоВ у ЛПНЩ з віком не змінюється.

Змінам, виявленим у спектрі апобілков при розвитку атеросклерозу, відповідають зрушення у вмісті білкової маси ліпопротеїнових фракцій у плазмі крові дорослих і старих кролів. У старих тварин навіть на фоні вікових змін збільшується вміст ЛПНЩ (на 492,6 %) та ЛПДНЩ (на 604,2 %). Менше підвищується кількість ЛПВЩ (на 246,9 %), що призводить до зменшення його долі в загальному пулі ЛП і свідчить про зниження антиатерогенних властивостей крові при старінні. У дорослих кролів виявлені зрушення не відрізняються за спрямованістю від старих тварин, але вони менше виразні. Ці зміни свідчать про зв'язок розвитку гіперхолестеринемії з процесом синтезу аполіпопротеїнів. На користь змін у біосинтезі білків при розвитку атеросклеротичного процесу свідчать і результати вивчення відносної питомої радіоактивності (ВПР) у тканинах аорти та печінки (табл. 3). Показано, що в тканинах старих тварин, порівняно з дорослими,

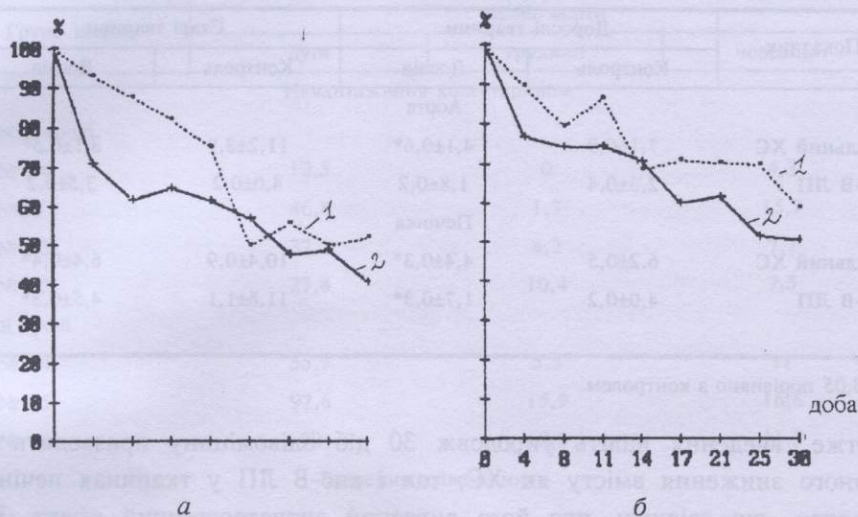
Таблиця 3. Відносна питома радіоактивність при синтезі білка *in vitro* у тканинах аорти та печінки дорослих і старих кролів (x 10)

Умова досліджу	Аорта		Печінка	
	Дорослі тварини	Старі тварини	Дорослі тварини	Старі тварини
Контроль	2,12±0,11	3,64±0,20	0,83±0,04	0,87±0,06
Спотанна регресія	10,16±0,25	1,09±0,13*	0,99±0,02	0,41±0,01*

* $P < 0,05$ порівняно з дорослими тваринами.

швидкість синтезу білків *in vitro* знижена. В той же час при тривалому навантаженні ХС, тобто за умов розвитку експериментального атеросклерозу виявляється значне підвищення протеїносинтезу, особливо у дорослих тварин. Усе це свідчить про вікові особливості розвитку експериментального атеросклерозу та етапу його регресії. Отримані результати підтверджуються морфологічними дослідженнями [8], які показали, що у старих тварин, порівняно з молодими, атеросклеротичний процес в аорті та коронарних судинах носить більш виражений характер.

Курсове введення олівоміцину значною мірою прискорює падіння рівня гіперхолестеринемії у дорослих і у старих кролів. Однак його гіпохолестеринемічний ефект виразніший у дорослих тварин (рисунк). У той час як у контрольній групі тварин (природна регресія) зниження концентрації загального ХС у крові на 4-ту добу після припинення навантаження становить всього 7,2 %, у дослідних, яким вводився олівоміцин, рівень гіперхолестеринемії спадає на 30,2 % і лише на 30-ту добу в контролі зниження гіперхолестеринемії - 48,3 %,.



Вплив олівоміцину на динаміку холестеринемії при спонтанній регресії експериментального атеросклерозу у дорослих (а) і старих (б) кролів: 1 - контроль, 2 - дослід.

що відповідає 17-й добі в дослідній групі. Схожі співвідношення складаються і в групі старих кролів, хоча темп падіння гіперхолестеринемії, порівняно з дорослими тваринами, сповільненіший і не такий значний.

Таким чином, використання олівоміцину протягом 30 діб на етапі регресії експериментального атеросклерозу призводить до значно швидшого, особливо у дорослих тварин, зниження ХС, збільшення якого в крові є визначаючим фактором у розвитку атеросклеротичних бляшок і клінічних проявів цього захворювання. Цьому відповідають результати, отримані при дослідженні тканин печінки та аорти. Так, через 30 діб після введення олівоміцину, незалежно від віку тварин, в аорті і значно більше в печінці, виявляється більш низький вміст як ХС, так і апо-В ЛПП (табл. 4). У той час як ХС (у печінці тварин з експериментальним атеросклерозом у 1,5 разів перевищує його концентрацію у інтактних тварин, у дорослих кролів, які отримували олівоміцин, він приблизно в тричі нижчий і становить всього 37 % від контрольного. Особливе значення має факт, який підтверджує антисклеротичний ефект дії блокатора біосинтезу білка - олівоміцину, це зниження під його впливом вмісту апо-В ЛПП, кількість яких значною мірою збільшується в процесі експериментального атеросклерозу і є важливим патогенетичним фактором його розвитку.

Таблиця 4. Вплив олівоміцину на вміст холестерину (ХС) та апоВ-ЛП у тканинах в період спонтанної регресії, мг/г ($M \pm m$)

Показник	Дорослі тварини		Старі тварини	
	Контроль	Дослід	Контроль	Дослід
Аорта				
Загальний ХС	7,1 $\pm$ 0,9	4,1 $\pm$ 0,6*	11,2 $\pm$ 3,9	3,1 $\pm$ 0,5*
Апо-В ЛП	2,3 $\pm$ 0,4	1,8 $\pm$ 0,2	4,0 $\pm$ 0,2	3,5 $\pm$ 0,2
Печінка				
Загальний ХС	6,2 $\pm$ 0,5	4,4 $\pm$ 0,3*	10,4 $\pm$ 0,9	6,4 $\pm$ 0,4*
Апо-В ЛП	4,0 $\pm$ 0,2	1,7 $\pm$ 0,3*	11,6 $\pm$ 1,1	4,5 $\pm$ 0,3*

* $P < 0,05$ порівняно з контролем.

Отже, введення навіть упродовж 30 діб олівоміцину призводить до значного зниження вмісту як ХС, так і апо-В ЛП у тканинах печінки та аорти, що свідчить про його виразний антиатерогенний ефект. Він менше виражений у старих кролів, що можливо пов'язано з віковими особливостями біосинтезу та деградації білків, зокрема аполіпопротеїнів, які визначають вміст та холестеринакцепторні властивості ЛП. Тим самим виявлена можливість використання для впливу на розвиток атеросклеротичного процесу принципово нового підходу - впливання на білкову частину атерогених ЛП - головної транспортної форми ХС - речовин, які блокують біосинтез білка. Про це свідчать результати досліджень, в яких, виходячи з можливого механізму дії олівоміцину - впливу на синтез білкової компоненти ЛП частки - визначення вмісту ЛП проводилося за кількістю білкової маси цих високомолекулярних сполучень. За умов регресії атеросклеротичного процесу, незалежно від віку, виявляється зниження вмісту всіх фракцій в крові дослідних тварин. При цьому зниження вмісту ЛП значною мірою спостерігається у дорослих кролів. Так, якщо в процесі спонтанної регресії рівень атерогених ЛПНЩ і ЛПДНЩ у дорослих кролів зменшувався на 28,2 і 10,3 % відповідно, то під впливом олівоміцину це зменшення становило вже 63,6 і 51,9 % відповідно. Такі ж співвідношення склалися при спонтанній регресії й у старих тварин. Так, вміст ЛПНЩ у контрольній групі знижувався на 22,1 %, ЛПДНЩ - на 11,6 %, а під впливом олівоміцину на 51,3 і 42,7 % відповідно. Все це свідчить про існування вікових особливостей метаболізму ліпідів і ЛП. На даному етапі досліджень ще не можна зробити висновок про механізм дії олівоміцину на вміст ЛП. Але пряме зниження білкової маси ЛП дозволяє припустити, що вплив олівоміцину на концентрацію ЛП у крові та тканинах пов'язаний з його дією на біосинтез білка, у тому числі і аполіпопротеїни. В той же час не можна виключити вплив олівоміцину на структуру та властивості плазматичних мембран, в першу чергу гепатоцитів,

Таблиця 5. Площа (% від загальної) атеросклеротичного ураження аорти через 1 міс після припинення навантаження холестериним (ХС) і на фоні введення олівоміцину

Група тварин	Відділ аорти		
	дуга	грудний	черевний
Навантаження холестериним			
Дорослі кролі			
№ 54	12,5	0	4,3
№ 60	46,8	1,3	15,7
№ 53	37,3	4,2	7,7
№ 67	27,8	10,4	7,5
Старі кролі			
№ 74	55,7	5,3	11
№ 75	97,6	15,9	16,8
№ 76	90	10,2	11,3
Введення олівоміцину			
Дорослі кролі			
№ 52	3,0	0	1,3
№ 56	3,8	0	0
№ 57	7,3	1,8	4,0
№ 58	0	0	0
Старі кролі			
№ 73	17,5	1,5	6,8
№ 71	21,8	8,4	1,9
№ 45	0	0	0
№ 47	27,3	3,4	7,8

проникність судинної стінки, її реактивність тощо, що потребує подальших досліджень.

Важливим доказом антиатерогенної дії блокатора біосинтезу білка - олівоміцину є результати морфологічного дослідження (табл. 5). У структурі бляшок, а також у функціональному стані ендотеліальних та гладком'язових клітин чіткі зміни - зменшення активності піноцитозу і ендоцитозу, кількості некрозів у ендотелії, пінних клітин у бляшках, що свідчить про початок регресії бляшки під впливом олівоміцину.

Таким чином, проведені дослідження свідчать про протекторну дію олівоміцину на спонтанну регресію атеросклеротичного процесу. Отримані результати обґрунтовують пошуки засобів, які сприяють регресії атеросклерозу серед речовин, котрі вибірково блокують синтез апо-В білків.

EFFECT OF OLIVOMYCIN ON THE PROCESS OF SPONTANEOUS REGRESSION
OF EXPERIMENTAL ATHEROSCLEROSIS
IN RABBITS OF DIFFERENT AGE

Development and regression of experimental atherosclerosis in rabbits is an expressed age-related phenomenon, showing the increase in occurrence and pronouncement of atherosclerotic process with age. A new approach to the disease treatment by means of olivomycin is described. It has shown that while influencing considerably the protein biosynthesis of experimental animal, one can accelerate the regression of atherosclerosis by means of olivomycin and reduce protein and lipid metabolism indicators characterizing the disease development.

Institute of Gerontology,
Academy of Medical Sciences of Ukraine, Kyiv

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. Ашмарин И.П., Ключкарев Л.А. Ингибиторы синтеза белка. - Л.: Медицина, 1975. - 208 с.
2. Бурдаков В.А., Бакулов И.А., Макаров В.В., Чумак Р.М. Радионуклидные методы исследования в вирусологии и микробиологии. - М.: Энергтоиздат, 1990. - 168 с.
3. Кейтс М. Техника липидологии. - М.: Мир, 1975. - 332 с.
4. Климов А.Н., Ловагина Т.Н., Баньковская Э.В. Турбометрический метод определения бета-липопротеидов и хиломикрон в сыворотке крови и тканях // Лаб. дело. - 1966. - № 5. - С. 276-280.
5. Климов А.Н., Никульчева Н.Г. Липопротеиды, дислипидемии и атеросклероз. - Л.: Медицина, 1984. - 166 с.
6. Фролькис В.В. Генорегуляторные механизмы старения - основа развития возрастной патологии // Физиол. журн. - 1990. - 36, № 5. - С. 3-11.
7. Фролькис В.В., Богацкая Л.Н., Новикова С.Н. Ингибиторы биосинтеза белка и развитие дислипидемий у кроликов // Вопросы мед. химии. - 1989. - № 6. - С. 23-27.
8. Экспериментальный атеросклероз и возраст / Под ред. Н.Н.Горева. - М.: Медицина, 1972. - 208 с.
9. Abell L.L., Levy B.B. A simple method for the estimation of total cholesterol in serum and demonstration of its specificity // J.Biol. Chem. - 1952. - 195. P. 357-365.
10. Frolkis V.V., Bogatskaya L.N., Novikova S.N. Effect of inhibitors of protein synthesis on lifespan and development of dyslipoproteinemias: Experimental analysis // Z. Alternsforsch. - 1990. - 45, № 5. - P. 259-265.
11. Lindgren F.T., Jensen L.C., Hatch F.T. The isolation and quantitative analysis of serum lipoproteins // In: Blood Lipids and Lipoproteins: Quantitation, Composition, and Metabolism. - New York: John Wiley and Sons, Inc, 1972. - P. 181-274.
12. Markwell M.A., Haas S.M., Rieberg L.L., Tolbert N.E. A modification of the Lowry procedure to simplify protein determination in membrane and lipoprotein samples // Analytical Biochem. - 1978. - 87. - P. 206-210.
13. Soria L.F., Ludwig E.H., Clarke H.R. et al. Association between a specific apolipoprotein B mutation and familial defective apolipoprotein B-100 // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. - 1989. - 86. - P. 587-591.
14. Svanborg A., Svenersholm L. Plasma lipid, cholesterol, phospholipids and fatty acids in healthy scandinavian population // Acta. Med. scand. - 1961. - 109, № 1. - P. 43-49.
15. Swaney I.B., Kuehl K.S. Separation of apolipoproteins by an acrylamide-gradient sodium dodecyl sulfate gel electrophoresis system // Biochim. et Biophys. acta. - 1976. - 446, № 2. - P. 581-565.

Ін-т геронтології АМН України,
Київ

Матеріал надійшов
до редакції 08.06.95