

делирования новых имплантанных материалов, а также открывает новые возможности в исследовании тонких механизмов реорганизации костной ткани как в норме, так и при патологических процессах.

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Денисов-Никольский Ю.И., Жилкин Б.А., Докторов А.А., Матвейчук И.В. Ультраструктурная организация минерального компонента пластинчатой костной ткани у людей зрелого и старческого возраста // Морфология. — 2002. — Т. 122. — № 5. — С. 79–83.
2. Fratzl P., Groschner M., Vogl G., Plenk H., Eschberger J., Fratzl-Zelman N. et al. Mineral crystals in calcified tissues – a comparative study by SAXS. // J. Bone Miner Res. — 1992. — № 7. — P. 329–334.
3. Hassenkam T., Fantner G., Cutroni J.A., Weaver C., Hansma P.K. High-resolution AFM imaging of intact and fractured trabecular bone. // Bone. — 2004. — V. 35. — № 1. — P. 4–10.
4. Jaschouz D., Paris O., Roschger P., Hwang H.S., Fratzl P. Pole figure analysis of mineral nanoparticle orientation in individual trabecular of human vertebral bone. // J. Appl. Crystallogr. — 2003. — V. 36. — P. 494–498.
5. Kim H.M., Rey C., Glimcher M.J. Isolation of calcium-phosphate crystals of bone by non-aqueous methods at low temperature. // J. Bone Miner Res. — 1995. — № 10. — P. 1589–1601.
6. Kuangshin T., Hang J.Q., Ortis C. Effect of mineral content on the nanoindentation properties and nanoscale deformation mechanisms of bovine tibial cortical bone. // J. Materials science: Materials in medicine. — 2005. — V. 16 — № 8. — P. 1–12.
7. Landis W.J., Song M.J., Leith A., McEwen L. Mineral and organic matrix interaction in normally calcifying tendon visualized in three dimensions by high-voltage electron microscopic tomography and graphic image reconstruction. // J. Struct. Biol. — 1993. — № 110. — P. 39–54.
8. Landis W.J., Hodgens K.J. Mineralization of collagen may occur on fibril surfaces: evidence from conventional and high-voltage electron microscopy and three-dimensional imaging. // J. Struct. Biol. — 1996. — V. 117. — C. 24–35.
9. Lees S., Probst K.S., Ingle V.K., Kjoller K. The loci of mineral in turkey leg tendon as seen by atomic force microscope and electron microscopy. // Calcif. Tissue Int. — 1994. — V. 55. — P. 180–189.
10. Rubin M.A., Jasiuk L., Taylor J., Rubin J., Ganey T., Apkarian R.P. TEM analysis of the nanostructure of normal and osteoporotic human trabecular bone. // Bone. — 2003. — V. 33. — № 3. — P. 270–282.
11. Su X., Sun K., Cui F.Z. and Landis W.J. Organization of apatite crystals in human woven bone. // Bone. — 2003. — V. 32. — № 2. — P. 150–162.
12. Tong W., Glimcher M.J., Katz J.L., Kuhn L., Eppell S.J. Size and shape of mineralites in young bovine bone measured by atomic force microscopy. // Calcif. Tissue Int. — 2003. — V. 75. — P. 592–598.
13. Weiner S.T., Traub W. and Wagner D. Lamellar bone: structure-function relations. // J. Struct. Biol. — 1999. — V. 126. — № 3. — P. 241–255.

Поступила 03.03.2006

УДК 616.36-092.9:615.212

### ВЛИЯНИЕ ЛЕЙЦИНА НА МОРФО-ФУНКЦИОНАЛЬНОЕ СОСТОЯНИЕ ПЕЧЕНИ ЖИВОТНЫХ

В.М. Шейбак, Р.И. Кравчук, Т.Л. Степура, М.В. Горецкая

Гродненский государственный медицинский университет

Ежедневное пятикратное энтеральное введение незаменимой аминокислоты лейцин в дозе 100 мг/кг массы приводит к стимуляции биосинтетических процессов в печени, которое находит свое подтверждение в изменении ультраструктуры гепатоцитов. Это дает основание полагать, что длительных прием лейцина в условиях депривации энергетических субстратов может оказывать негативное влияние на печень.

Ключевые слова: лейцин, крысы, печень, ультраструктура.

### EFFECT OF LEUCINE ON THE MORPHO-GUNCTIONAL STATE OF RAT LIVER

V.M. Sheibak, R.I. Kravchuk, T.L. Stepuro, M.V. Haretskaya

Grodno State Medical University

Enteral administration of essential amino acid leucine (dose 100 mg/kg for five days) results into the stimulation of hepatic biosynthetic processes which correlated with a change in hepato-

cyte's ultrastructure. Therefore, we think that the long-lasting leucine administration during the deprivation of energetic substrates can induced negatively effects on the liver.

Keywords: leucine, rats, liver, ultrastructure.

### **Введение**

Исследование особенностей обмена аминокислот в отдельных органах и тканях позволило разработать и создать на основе этих соединений препараты для метаболической коррекции функционального состояния печени, ЦНС и сердечно-сосудистой системы [4, 8]. Эффективность аминокислот определяется их специфическими фармакологическими эффектами на уровне метаболических реакций (гликолиз, глюкозоаланиновый цикл, цикл мочевинообразования, обмен нейроактивных соединений), определяющих функциональное состояние органов и систем [5, 6, 10]. В настоящее время для коррекции обменных нарушений широко применяются композиции аминокислот, обладающих общими или взаимосвязанными путями метаболических превращений. При таком подходе обеспечивается реализация совокупных фармакологических эффектов. Так, например, сочетание аминокислот с разветвленной углеводородной цепью — АРУЦ (изолейцин, лейцин и валин) в препаратах для энтерального и парентерального применения позволяет использовать их не только в качестве питательных смесей при поражениях печени, но и для коррекции метаболического дисбаланса [7, 11]. Хотя эта группа аминокислот метаболически тесно связана между собой, тем не менее, лейцин является самым мощным стимулятором белкового синтеза. Между аминокислотами этой группы существует антагонизм на уровне транспорта, аффинитета и степени участия в процессах биосинтеза белка. Так, избыточное введение лейцина нарушает утилизацию изолейцина и валина. Вместе с тем незаменимость L-лейцина для организма млекопитающих, его специфическое метаболическое действие (активация синтеза белка и ДНК, транспорта мРНК, ингибирование протеолиза) и фармакологическая иммуномодуляторная активность, реализуемая в процессе метаболической биотрансформации, делают монотерапию этим соединением привлекательной [5, 11].

**Целью** нашей работы явился анализ морфо-функциональных изменений в печени после курсового энтерального введения животным лейцина.

### **Материалы и методы**

Лейцин вводили через зонд белым крысам самкам массой 180–220 г в дозе 100 мг/кг массы ежедневно однократно в течение 5 дней. Общепринятыми методами в сыворотке крови определяли активности ферментов-маркеров поражения печеночной ткани — аланин- и аспартатаминотрансфераз, малонового диальдегида и диеновых конъюгатов, кроме того, в ткани печени — дополнительно количество малонового диальдегида и диеновых конъюгатов. Электронно-микроскопические исследования проводили в образцах печени животных, фиксированных 1% раствором четырехокси осмия на 0,1 М буфере Миллонига, pH 7,4 при +4°C в течение 2 часов. После дегидратации в спиртах восходящей концентрации и ацетоне образцы заливали в смесь эпон — аралдит. Из полученных блоков на ультрамикротоме MT-7000 ULTRA (USA) готовили полутонкие срезы, которые окрашивали метиленовым синим. Препараты просматривали в световом микроскопе и выбирали участок для дальнейшего изучения ультраструктурных изменений (для соблюдения стандартности при окончательной заточке образца печени отбирали однотипные участки печеночной дольки). Затем изготавливали ультратонкие срезы, которые контрастировали 2%-ым раствором уранилацетата на 50% метаноле и цитратом свинца. Препараты изучали в электронном микроскопе JEM-100 CX (Япония) при увеличениях 7000–36000.

### **Результаты и обсуждение**

Определение соматических коэффициентов (соотношение массы печени к массе животного) не выявило существенных изменений в исследуемых группах животных —  $3,53 \pm 0,13\%$  в контрольной группе и  $3,27 \pm 0,13\%$  в группе животных, получавших лейцин, соответственно. Анализ активности сывороточных ферментов, характеризующих функцию печени, аланинаминотрансферазы и

аспаратаминотрансферазы, также не выявил существенных изменений ( $53,3 \pm 2,13$  Ед/л и  $146,3 \pm 11,55$  Ед/л в контрольной группе и  $55,1 \pm 3,54$  Ед/л и  $169,7 \pm 10,17$  Ед/л после введения лейцина соответственно). Это является подтверждением не токсичности данной дозы аминокислоты. Вместе с тем, если в сыворотке крови содержание малонового диальдегида в контрольной группе составило  $1,69 \pm 0,17$  мкМ/л, а в опытной —  $1,98 \pm 0,22$  мкМ/л, то в ткани печени после введения лейцина содержание малонового диальдегида существенно повышалось —  $25,03 \pm 1,79$  мкМ/кг против  $15,1 \pm 1,34$  мкМ/кг ткани в контрольной группе. Хотя уровень диеновых конъюгатов при этом практически не изменялся как в сыворотке крови ( $0,41 \pm 0,078$  Ед/мл против  $0,43 \pm 0,089$  Ед/мл), так и в ткани печени ( $10,6 \pm 3,19$  Ед/г и  $7,5 \pm 3,57$  Ед/г) в контрольной и опытной группах соответственно.

На светооптическом уровне в печени выявлялось неравномерное расширение синусоидных капилляров долек печени как в центральных, так и периферических отделах. Методом электронной микроскопии установлено, что пятикратное введение лейцина вызывает ряд обратимых ультраструктурных изменений в печени. Регистрировали стимуляцию биосинтетических процессов, морфологическим подтверждением которых являются признаки активации ядерного аппарата (гиперплазия и гипертрофия ядрышек, с преобладанием в них гранулярного компонента) (рис. 1, 2), повышенная степень активности гранулярной эндоплазматической сети (ГрЭС), резкое увеличение числа митохондрий с многочисленными кристами и отличающихся полиморфизмом. При этом отмечался тесный топографический контакт митохондрий с цистернами ГрЭС (рис. 3). Последнее является свидетельством процессов, протекающих с использованием большого количества энергии. Одновременно, в цитоплазме гепатоцитов чаще, чем в печени контрольных животных, выявляются компоненты комплекса Гольджи. Во многих гепатоцитах повышалось содержание липидных включений, которые в отличие от печени контрольных животных, отличались полигональной формой (рис. 3). При морфологическом изучении печени экспериментальных животных при моделирова-

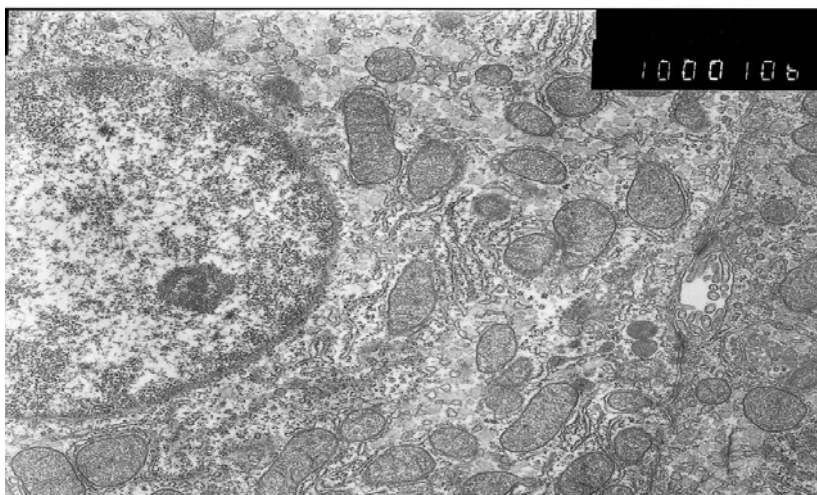
нии различных патологических состояний почти всегда обнаруживаются липидные включения разнообразного характера. Появление их в печени может быть вызвано тремя различными механизмами: инфильтрацией, декомпозицией, трансформацией или их сочетанием [1, 3]. Жировая инфильтрация вызывается отложением триглицеридов, принесенных в печень лимфой или кровью. Триглицериды, синтезированные в гепатоците *de novo*, также можно отнести к инфильтративным, хотя они чаще всего отличаются по виду и химическому составу. В лимфатических сосудах хиломикроны на 99% состоят из липидов, из которых 80–85% — триглицериды. Попадая в печень и проходя по синусоидам печеночной дольки, хиломикроны захватываются эндоцитозом на сосудистом полюсе гепатоцита. Внутри печеночной клетки мономерные липидные компоненты, высвобождаясь из хиломикронов, вступают в метаболические процессы и могут использоваться для энергообеспечения жизнедеятельности любых клеточных систем, а также в синтезе интегральных (цитоплазматических) жироподобных соединений, в частности,  $\beta$ -липопротеидов [2]. В ряде гепатоцитов выявлялись участки с разреженной цитоплазмой. Этот феномен связан с локальной редукцией цитоплазматических органелл и рассматривается как защитная реакция клетки. В то же время в цитоплазме гепатоцитов возрастало количество вторичных образований, представленных мультивезикулярными тельцами, пластинчатыми структурами, окруженными двойной мембраной, а также мелкими электронно-плотными гранулами. Помимо описанных выше ультраструктурных изменений в печени лейцин приводил к усилению межклеточных обменных процессов. Об этом свидетельствовали выраженные интердегитации мембран латеральных поверхностей гепатоцитов с образованием глубоких карманов (рис.4). Со стороны микрососудистого русла существенных деструктивных изменений не обнаруживалось: синусоидные капилляры умеренно расширены, заполнены мелкозернистой субстанцией, в которой регистрировались единичные макрофаги, фибробласты и многочисленные форменные элементы крови. Желчные капилляры имели типич-

ное строение, содержали многочисленные микроворсинки, обращенные в слегка суженный за счет ворсинок просвет. Следует отметить, что в пределах одной дольки, рядом с гепатоцитами, характеризующимися изменением структурной организации клетки, находились гепатоциты с нормопластическим вариантом строения.

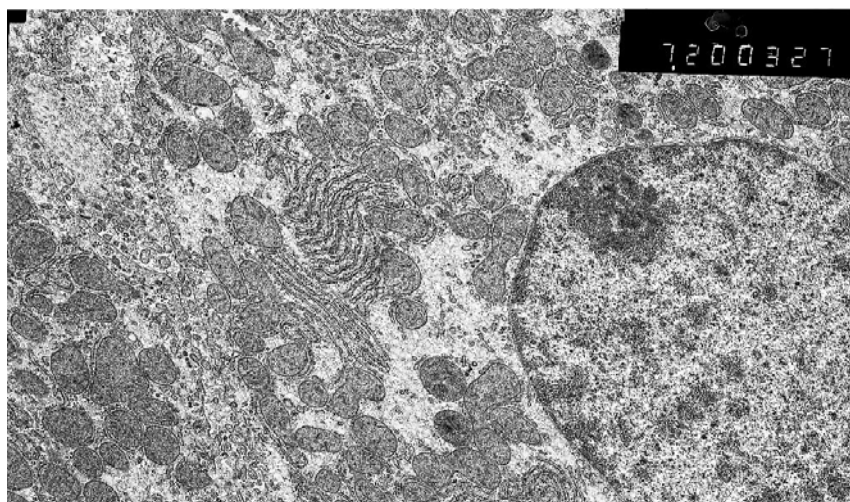
#### **Заключение**

Ежедневное пятикратное энтеральное введение незаменимой аминокислоты лейцин в дозе 100 мг/кг массы приводит к стимуляции биосинтетических процессов в печени, которое находит свое подтверждение в изменении ультраструктуры гепатоцитов: стимуляция биосинтетических процессов (признаки активации ядерного аппарата, повышенная степень активности ГрЭС, резкое

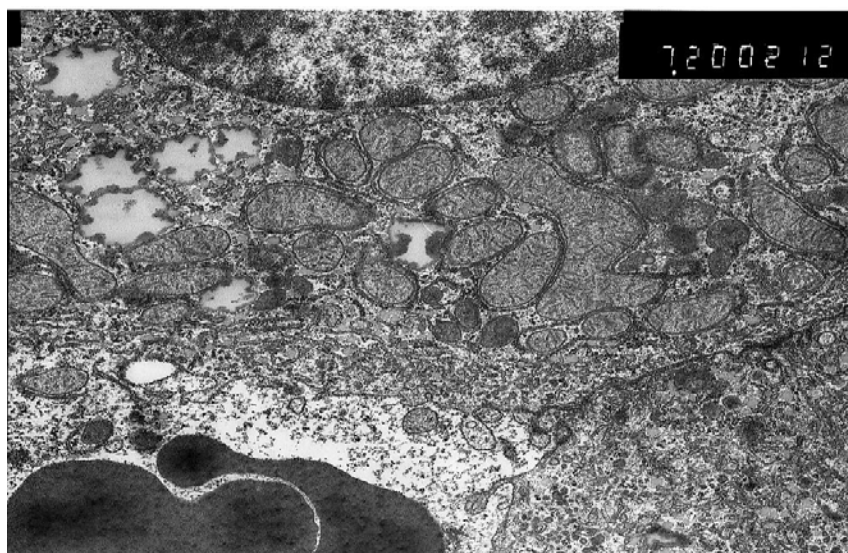
увеличение числа митохондрий с многочисленными кристами и отличающихся полиморфизмом). Это дает основание предположить, что длительных прием лейцина в условиях депривации энергетических субстратов может оказать негативное влияние на состояние печени. В этой связи требуются дальнейшие исследования, результатом которых должны стать патофизиологически обоснованные показания для монотерапии препаратом данной аминокислоты. При разработке лекарственных соединений на основе аминокислот, а также при применении индивидуальных аминокислот в течение длительного периода времени необходимо уделять должное внимание возможности возникновения морфо-функциональных изменений со стороны печени.



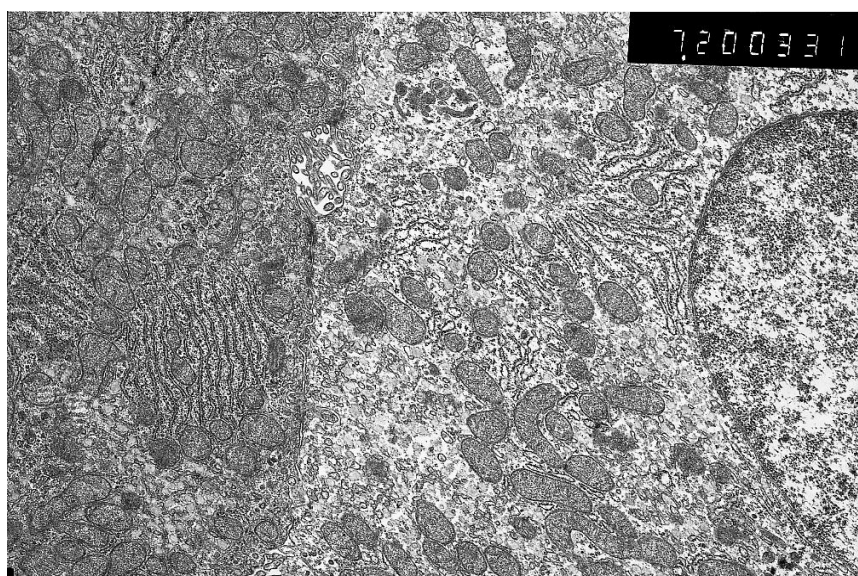
**Рис. 1.** Фрагмент гепатоцита контрольного животного. Увеличение 10 тыс.  
Контрастирование уранилацетатом и цитратом свинца



**Рис. 2.** Гипертрофия ядрышка с преобладанием гранулярного компонента, эксцентричное расположение в кариоплазме. Увеличение 7,2 тыс.  
Контрастирование уранилацетатом и цитратом свинца



**Рис. 3.** Повышение в гепатоцитах содержания липидных включений. Увеличение 7,2 тыс. Контрастирование уранилацетатом и цитратом свинца



**Рис. 4.** Интердегитации мембран латеральных поверхностей гепатоцитов с образованием глубоких карманов. Увеличение 7,2 тыс. Контрастирование уранилацетатом и цитратом свинца

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Морозов И.А., Лысков Ю.А., Хвыля С.И. Электронно-микроскопическое исследование процесса печеночно-кишечной рециркуляции // Физиол. Журн. СССР — 1985. — № 11. — С. 1419–1427.
2. Морозов И.А. Липидные включения печени // Гепатология. — 2005. — № 3. — С. 11–17.
3. Струков А.И., Серов В.В. Патологическая анатомия. — М., Медицина — 1979. — 528 с.
4. Шейбак В.М., Тис А.А., Шейбак Л.Н. Фагоцитарная активность нейтрофилов пуповинной крови новорожденных *in vitro* в присутствии лейцина // Эксп. и клин. фармакология. — 2005. — № 1. — С. 48–49.
5. Baker D.H. Animal models of human amino acid responses // J Nutr. — 2004. — Vol. 134. — № 6. — P. 1646S–1650.
6. Burrin D.G., Davis T.A. Proteins and amino acids in enteral nutrition // Curr Opin Clin Nutr Metab Care. — 2004. — Vol. 7. — № 1. — P. 79–87.
7. Holecek M. Glutamine and branched-chain amino acids-practical importance of their metabolic relations // Cas Lek Cesk. — 2005. — Vol. 144, № 3. — P. 9–12.
8. Kilberg MS, Pan YX, Chen H, Leung-Pineda V. Nutritional control of gene expression: how mammalian cells respond to amino acid limitation // Annu Rev Nutr. — 2005. — V. 25. — P. 59–85.

9. *Matthews D.E.* Observations of branched-chain amino acid administration in humans // *J Nutr.* — 2005. — Vol. 135, № 6. — P. 1580–1584.

10. *Millward D.J.* An adaptive metabolic demand model for protein and amino acid Requirements // *Br J Nutr.* — 2003. — Vol. 90, № 2. — P. 249–260.

11. *Yoshizawa F.* Regulation of protein synthesis by branched-chain amino acids in vivo // *Biochem Biophys Res Commun.* — 2004. — Vol 313, № 2. — P. 417–422.

Поступила 20.02.2006

УДК 616.155.13: 612.127.4

### ОСОБЕННОСТИ ПОЙКИЛОЦИТОЗА, ВЫЗВАННОГО ДЕЙСТВИЕМ АКТИВНЫХ ФОРМ АЗОТА

М.Н. Стародубцева, Т.Г. Кузнецова, Т.А. Кузнецова,  
Дж.К. Эллори, С.Н. Черенкевич, С.О. Абетковская

Гомельский государственный медицинский университет  
Институт тепло-массообмена НАН Беларуси им. А.В. Лыкова  
Оксфордский университет  
Белорусский государственный университет

В работе методами световой, электронной сканирующей и атомно-силовой микроскопии были изучены изменение формы, структуры и механических свойств мембраны эритроцита после обработки цельной человеческой крови пероксинитритом. Установлено, что первичными механизмами изменения формы эритроцита (акантоцитоз и сфероцитоз) при действии активных форм азота являются фазовое разделение липидов, связанное с перекисным окислением липидов, и агрегация спектрина.

Ключевые слова: пероксинитрит, пойкилоцитоз, акантоцит, мембранные домены

### PECULIARITIES OF POIKILOCYTOSIS INDUCED BY REACTIVE NITROGEN SPECIES ACTION

M.N. Starodubtseva, T.G. Kuznetsova, T.A. Kuznetsova,  
J.C. Ellory, S.N. Cherenkevich, S.O. Abetkovskaya

Gomel State Medical University  
Institute Heat-and-mass Transfer of NAS of Belarus of a name A.V. Likov  
Oxonian University  
Belarussian State Medical University

The changes in a shape, a structure and mechanical properties of erythrocyte membrane after the treatment of whole human blood with peroxy-nitrite were studied by the methods of light, electron scanning and atomic force microscopy. The primary mechanisms of the changes in erythrocyte shape (acanthocytosis and spherocytosis) at the action of reactive nitrogen species state to be lipid phase separation as a result of lipid peroxidation and spectrin aggregation.

Key words: peroxy-nitrite, poikilocytosis, acanthocyte, membrane domains.

#### **Введение**

Активные формы азота могут участвовать как в физиологических, так и патологических процессах в организме [9, 12]. Такие активные формы азота, как пероксинитрит и диоксид азота, в основном, участвуют в развитии патологических состояний организма человека [2, 6, 8]. Активные фор-

мы азота реагируют с белками и липидами мембраны эритроцита, изменяя ее механические и транспортные свойства, а также форму клетки [7, 10, 13, 14]. Часто невозможно выделить роль конкретной активной формы азота в этих процессах, так как в реакциях активных форм одного типа с другими молекулами образуются новые