13. *Шустин Н. А.* Физиология лобных долей головного мозга. 223. Л., 1959.
14. *Gambarian L. S., Kazarian A. G., Garibian A. A.* Folia clinica Internacional (Barcelona), *26*, 5, 2—12, 1976.
15. *Gambarian L. S., Koval I. N., Garibian A. A. and Sarkisian J. S.* Exp. Brain Res., *15*, 1, 15—28, 1982.
16. *Garibian A. A.* Folia clinica Internacional (Barcelona), *25*, 9, 2—8, 1975.
17. *Garibian A. A., Sarkisian J. S., Kazarian G. M.* Folia clinica Internacional., *24* 10, 1—7, 1974.
18. *Hecht K., Nguyen Van Hai, Garibian A. A. and Hecht T.* Acta Physiol. Sci. Hungaricae, *48*, 4, 387—389, 1976.
19. *Park G.* Electronic News, *391*, 10—15, 1963.

«Биолог. ж. Армении», т. XXXVII, № 2, 1984

УДК 615.24+612.015.32:616.45—001.1/3

РЕГУЛЯЦИЯ ДИБУНОЛОМ ПЕРЕКИСНОГО ОКИСЛЕНИЯ ЛИПИДОВ ПРИ ИММОБИЛИЗАЦИОННОМ СТРЕССЕ

Э. М. МИКАЕЛЯН, В. Г. МХИТАРЯН

Установлено, что при иммобилизационном стрессе в сердце, мозге и печени белых крыс интенсифицируется аскорбат- и НАДФ-Н-зависимое индуцируемое перекисное окисление липидов. Активность СОД подавляется, а глутатионпероксидазы и глутатионредуктазы активируется. Запасы биоантиоксиданта α-токоферола в тканях значительно понижаются. Дибунол, введенный на фоне иммобилизационного стресса, регулирует интенсивность ПОЛ, уровень α-токоферола в тканях, а также активность ферментов, предупреждающих образование активных форм кислорода и устраняющих липоперекиси.

Ключевые слова: стресс иммобилизационный, перекисное окисление, дибунол, α-токоферол, супероксиддисмутаза, глутатионредуктаза, глутатионпероксидаза.

Интенсивность процесса перекисного окисления липидов как в физиологических, так и в экстремальных условиях зависит от жирнокислотного состава фосфолипидов мембран, уровня антиоксидантов и активности ферментных систем, генерирующих и детоксицирующих перекиси. Бурлаковой [3] была выдвинута гипотеза регуляции процессов перекисного окисления липидов биомембран системой природных антиоксидантов по замкнутому контуру, по принципу отрицательной обратной связи.

Нами ранее было установлено, что при иммобилизационном стрессе повышается интенсивность перекисного окисления липидов (ПОЛ) в тканях [5]. Было интересно проследить, как синтетический антиоксидант дибунол регулирует ПОЛ при иммобилизационном стрессе (ИМО). Дибунол отличается низкой токсичностью, быстро переходит из крови в ткани, накапливается в их липидах, благодаря чему в организме длительно сохраняется его стабильная концентрация [1].

Антирадикальная активность дибунола на 2 порядка ниже природного антиоксиданта α-токоферола. Однако в условиях in vivo дибунол

как пространственно экранированный фенол проявляет большую антиокислительную активность, так как радикал дибунола, возникающий в реакции ROO· + HJn→ROOH + Jn·, не обладает способностью реагировать с жирнокислотными остатками и разветвлять цепь [8]. Все это послужило основанием для использования дибунола с целью регуляции ПОЛ при инфаркте миокарда, лечении ожогов, ран, язвы желудка и других патологических состояний.

Первоначально механизм регуляторного действия дибунола целиком относили к его антирадикальным свойствам. В последнее время некоторые исследователи постулируют действие дибунола на интенсивность ПОЛ через регуляцию активности ферментных систем утилизации активных форм кислорода (СОД) и липопероксидов (глутатионпероксидазы и глутатионтрансферазы) [7].

В предыдущих исследованиях нами было показано, что дибунол после четырехкратной инъекции в дозе 120 мг/кг ежедневно интактным животным подавляет интенсивность индуцированного аскорбат- и НАДФН-зависимого ПОЛ в печени, сердце, мозге и эритроцитарных мембранах. Интерес представляет влияние дибунола на распределение α-токоферола в тканях. В работах Бурлаковой и Храповой [2] показано, что дибунол после разовой инъекции в дозе 100 мг/кг интактным мышам увеличивает АОА липидов печени с одновременным понижением уровня токоферола. По мнению авторов, последний интенсивней затрачивается на тушение свободных радикалов ввиду сравнительно низкой антирадикальной активности дибунола по отношению к α-токоферолу.

Нами установлено, что влияние дибунола на уровень α-токоферола имеет тканевую специфичность: значительно дезинтегрируется в эритроцитарных мембранах и несколько повышается в мозге, в печени и в сердце уровень его ниже контроля.

Дибунол стадийно изменяет активность ферментов антирадикальной защиты клетки: СОД в основном ингибируется, а ферменты, детоксицирующие липоперекиси, глутатионпероксидаза и глутатионредуктаза, активируются.

Материал и методика. Опыты ставили на 150-ти беспородных белых крысах-самцах массой 120—150 г, разделенных на 3 группы. I — интактные крысы, II — животные, которых иммобилизировали ежедневно в течение 150 мин фиксацией головы и конечностей (число иммобилизаций — от одной до семи). За это время происходит максимальная активация адреномедулярной и адренокортикальной системы, что соответствует фазе напряжения стресса. III группа — животные, которым на фоне иммобилизационного стресса предварительно вводили дибунол в дозе 120 мг/кг ежедневно за 3 дня до стресса и в день первой фиксации.

У животных всех трех групп в сердце, печени и мозге определяли интенсивность индуцированного аскорбат- и НАДФН-зависимого перекисного окисления липидов, содержание и активность супероксиддисмутазы, глутатионпероксидазы, глутатионредуктазы. Содержание витамина Е в тканях определяли флуорометрически по методу Дитана максимумом возбуждения при 295 нм и максимумом флуоресценции при 340 нм [9]. Количество витамина Е выражали в мкг на мг белка.

Об активности супероксиддисмутазы (СОД) судили по ингибированию генерации супероксидных анион-радикалов в модели феназинметосульфат-НАДН-нитротетразолий синий, за единицу активности принимали такое количество раствора фермента, которое

при добавлении к модельной системе, генерирующей супероксидный анион-радикал, подавляет его генерацию на 50% [11]. Пересчет единиц активности производили на мг белка.

Глутатионпероксидазную и глутатионредуктазную активность определяли по ранее описанной нами методике [6], выражая ее соответственно в мкмоль восстановленного глутатиона, окисленного за 1 мин на 1 мг белка, и мкмоль НАДФН, окисленного за 1 мин на 1 мг белка.

Ферментативное НАДФ-зависимое и неферментативное аскорбатзависимое индуцированное перекисное окисление липидов определяли по уровню одного из конечных продуктов перекисного окисления—малонового диальдегида—по цветной реакции с тиобарбитуровой кислотой. Ткани тщательно перфузировали охлажденным 0,15 М KCl. Все операции проводили на холоду при 4°. Ткани гомогенизировали в 0,154 М KCl, готовили 10%-ный гомогенат. Объем инкубационной среды составлял 1,2 мл, содержал 0,3 мл гомогената, время инкубации—30 мин при 37°. Инкубационная среда для аскорбат-зависимого перекисного окисления также включала 0,3 мл 40 мМ трис-HCl pH 7,4, 0,3 мл 0,8 мМ аскорбата, 0,3 мл $12 \cdot 10^{-6}$ М соли Мора. В случае ферментативного НАДФН-зависимого перекисного окисления—0,3 мл $2 \cdot 10^{-4}$ М пирофосфата натрия, 0,3 мл $12 \cdot 10^{-6}$ М соли Мора, 0,3 мл 1 мМ НАДФН. Содержание липидных перекисей выражали в нмоль малонового диальдегида на мг белка гомогената. Для расчета использовали коэффициент молярной экстинции $1{,}56 \cdot 10^5 М^{-1}$ см$^{-1}$. Содержание белка определяли по методу Лоури [10].

Результаты и обсуждение. Установлено, что иммобилизационный стресс (ИМО) вызывает выраженную интенсификацию ферментативного и неферментативного перекисного окисления липидов в сердечной мышце, мозге и печени. Активирование НАДФН-зависимого ПОЛ в основном более выражено. Интенсивность сдвигов липопереокисления проявляет некоторую органную специфичность и зависит от срока иммобилизации. В мозге и печени к 7-му дню стресса активность ПОЛ приближается к контрольному уровню (рис. 1, 2). В сердце при иммобилизационном стрессе ПОЛ активируется с большей интенсивностью.

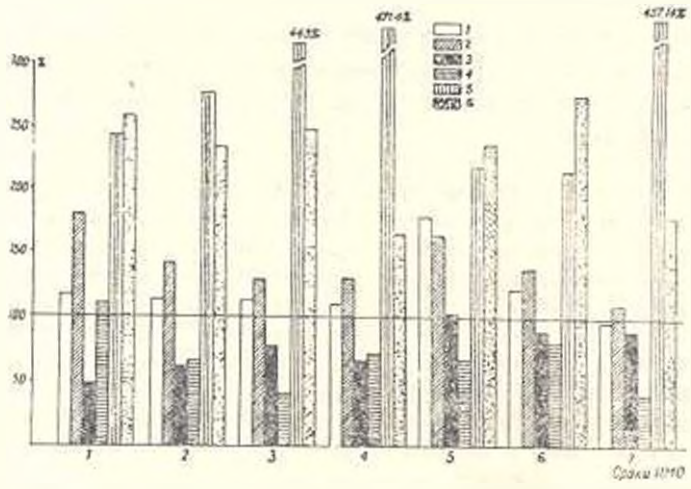

Рис. 1. Аскорбат и НАДФН-зависимое ПОЛ, содержание витамина Е, активность СОД, глутатионредуктазы и глутатионпероксидазы в мозге при иммобилизационном стрессе, % по отношению к контролю. Условные обозначения: 1. Аскорбат-зависимое ПОЛ. 2. НАДФН-зависимое ПОЛ. 3. Витамин Е. 4. Активность СОД. 5. Активность глутатионредуктазы. 6. Активность глутатионпероксидазы.

чем в мозге и печени (рис. 3), причем наибольшие сдвиги приходятся на первые три фиксации, к 4-й иммобилизации появляется тенденция к адаптации, проявляющаяся в постепенном затухании ПОЛ (рис. 3).

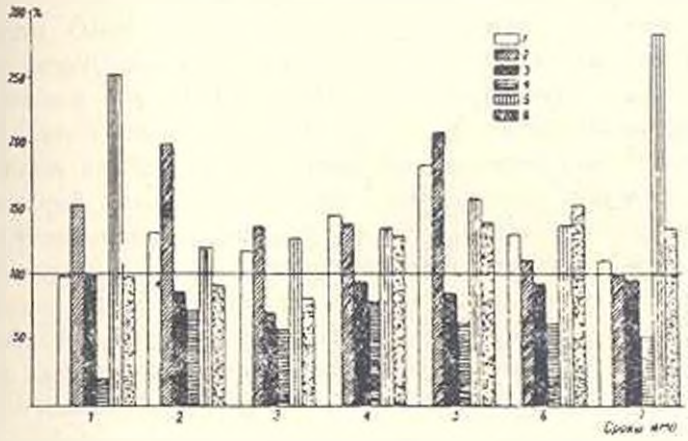

Рис. 2. Аскорбат- и НАДФН-зависимое ПОЛ, содержание витамина Е, активность СОД, глутатионредуктазы и глутатионпероксидазы в печени при иммобилизационном стрессе, % по отношению к контролю. Условные обозначения—те же.

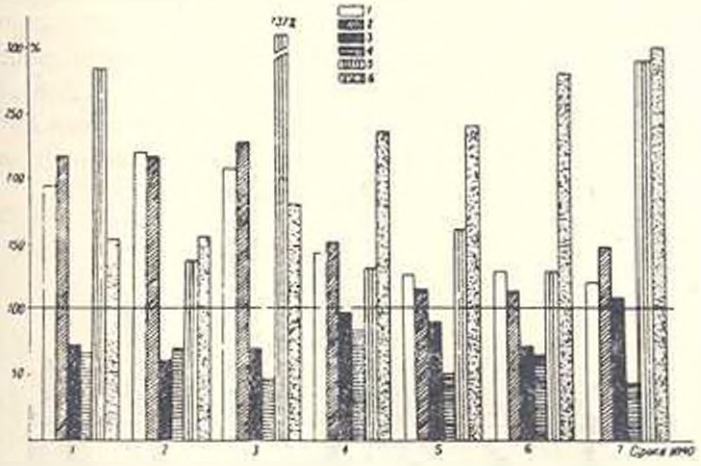

Рис. 3. Аскорбат- и НАДФН-зависимое ПОЛ, содержание витамина Е, активность СОД, глутатионредуктазы и глутатионпероксидазы в сердце при иммобилизационном стрессе, % по отношению к контролю. Условные обозначения—те же.

В печени и мозге интенсификация ПОЛ происходит стадийно с максимумами на 1—2-й и 5-й иммобилизациях (рис. 1, 2).

Активирование перекисного окисления липидов при ИМО связано с ингибированием фермента антиокислительной защиты СОД. Как показали наши исследования, в мозге, печени и сердце во все сроки ИМО СОД ингибируется в среднем на 30—60% (рис. 1, 2, 3). Это усиливает неферментативную диспропорцию супероксидного анион-радикала с образованием агрессивных форм кислорода—синглетного кислорода и гидроксидного радикала, резко активирующих свободнорадикальное окисление липидов биомембран.

$$\overline{O_2} + \overline{O_2} + 2H^+ \rightarrow H_2O_2 + {}^1O_2$$

$$H_2O_2 + \overline{O_2} \rightarrow OH^- + OH + {}^1O_2$$

Симбатно интенсификации ПОЛ в тканях при ИМО растет активность ферментных систем, детоксицирующих липоперекиси,—глутатионпероксидазы и глутатионредуктазы (рис. 1, 2, 3). Эти ферменты прерывают липопероксидирование на стадии разветвления цепи. Глутатионпероксидаза утилизирует липоперекиси ненасыщенных жирных кислот и соответствующие оксикислоты. Между указанными ферментами имеется тесная функциональная связь. Для функционирования глутатионпероксидазы в качестве субстрата необходим восстановленный глутатион, который является продуктом глутатионредуктазной реакции.

Аналогичная зависимость активности ферментов, детоксицирующих липоперекиси, от уровня субстрата наблюдалась и другими авторами в печени при канцерогенезе, в митохондриях старых крыс [4, 12].

Резкое возрастание уровня липоперекисей в тканях при иммобилизационном стрессе на фоне активирования ферментной системы их детоксикации указывает на несбалансированность процессов образования и устранения липоперекисей. Симбатно интенсификации ПОЛ и повышению содержания активных форм кислорода при ИМО в реакции антирадикальной защиты включается эндогенный антиоксидант токоферол. Это приводит к истощению его запасов и понижению содержания в тканях до уровня, ниже контрольного (рис. 1, 2, 3). Наибольшие затраты витамина Е в основном совпадают с пиками интенсификации аскорбат- и НАДФН-зависимого путей переокисления липидов. К 7-й фиксации указанные сдвиги выравниваются.

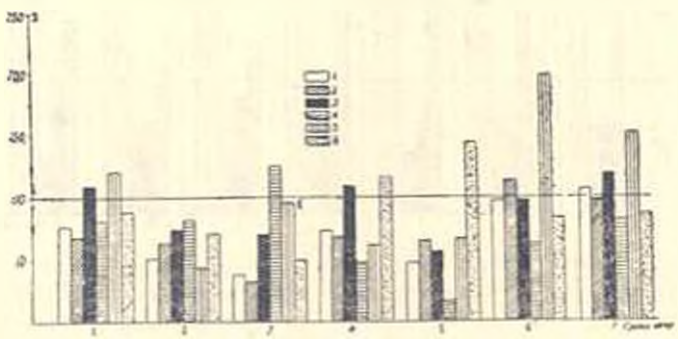

Рис. 1. Аскорбат- и НАДФН-зависимое ПОЛ, содержание витамина Е, активность СОД, глутатионредуктазы и глутатионпероксидазы в мозге при иммобилизационном стрессе на фоне предварительного введения дибунола, % по отношению к контролю. Условные обозначения—те же.

Предварительное введение дибунола существенно регулирует ПОЛ при иммобилизационном стрессе. Под его влиянием значительно подавляется активность обоих путей переокисления липидов-ферментативного НАДФН-зависимого и неферментативного аскорбат-зависимого. Эффект столь выражен, что в сердце, печени и мозге активность ПОЛ снижается значительно ниже контрольного уровня (рис. 4, 5, 6).

Влияние дибунола на распределение токоферола в тканях у интактных животных и на фоне ИМО неоднозначно. В печени интактных животных, как уже отмечалось, он понижает уровень токоферола. На фоне иммобилизационного стресса дибунол обогащает печеночную ткань токоферолом, уровень которого, кроме 5- и 6-кратной иммобилизации, значительно повышается, превосходя контрольный (рис. 5).

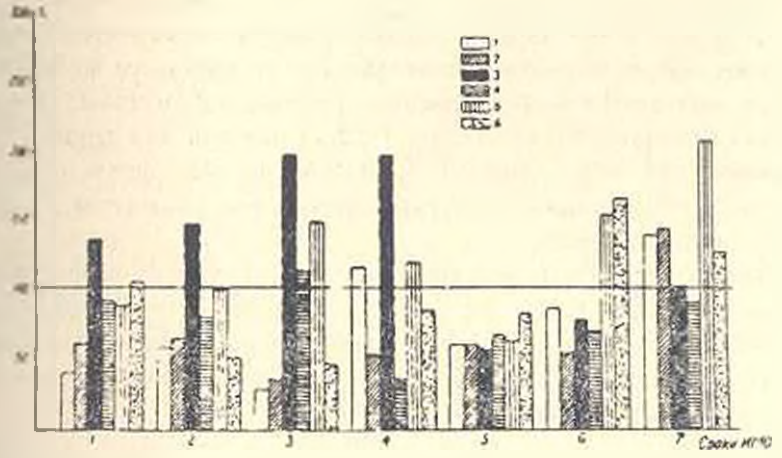

Рис. 5. Аскорбат- и НАДФН-зависимое ПОЛ, содержание витамина Е, активность СОД, глутатионредуктазы и глутатионпероксидазы в печени при иммобилизационном стрессе на фоне предварительного введения дибунола, % по отношению к контролю. Условные обозначения — те же.

В мозге и сердце под влиянием дибунола на фоне ИМО содержание токоферола также повышается по сравнению с его количеством в те же сроки иммобилизации, за исключением трех- и пятикратной ИМО для мозга, пяти- и семикратной для сердца (рис. 4 и 6).

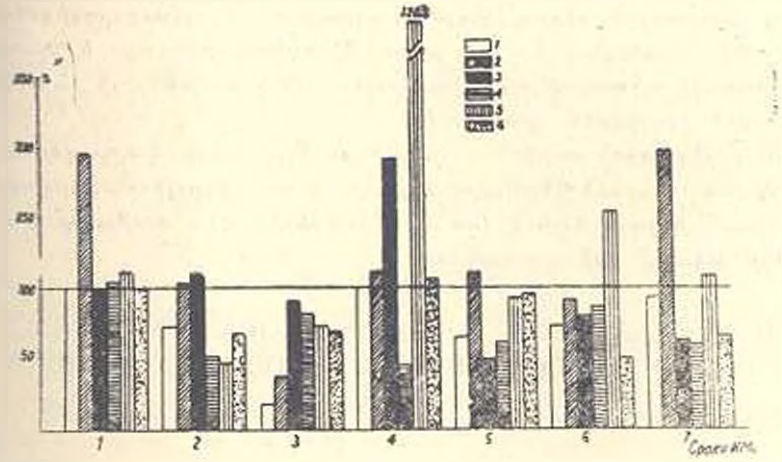

Рис. 6. Аскорбат- и НАДФН-зависимое ПОЛ, содержание витамина Е, активность СОД, глутатионредуктазы и глутатионпероксидазы в сердце при иммобилизационном стрессе на фоне предварительного введения дибунола, % по отношению к контролю. Условные обозначения — те же.

На основании полученных результатов можно заключить, что дибунол, наряду с токоферолом, вовлекается в реакции антирадикальной защиты при ИМО, благодаря чему регулирует уровень последнего в тканях.

Степень вовлечения каждого из них в реакции тушения свободных радикалов определенным образом зависит от исходного метаболического фона, тканевой специфичности и срока иммобилизации. Активность СОД при ИМО на фоне введения дибунола меняется стадийно в зависимости от вида ткани и длительности стрессорного воздействия. В основном отмечается активирование супероксиддисмутазы, кроме 4-разовой иммобилизации для печени; 1-, 2-, 4-разовой для сердца; 1-, 4-, 5- и 6-разовой для мозга (рис. 4, 5, 6). Активность ферментной системы глутатионпероксидазы—глутатионредуктазы снижается, следуя за уровнем липоперекисей.

Таким образом, антиоксидант дибунол регулирует перекисное окисление липидов при стрессе непосредственно путем его антирадикального и антиокислительного действия, а также косвенно, через изменение активности ферментов, предупреждающих образование активных форм кислорода и устраняющих липоперекиси.

Ереванский медицинский институт,
кафедра биохимии

Поступило 8.VII 1983 г.

ԼԻՊԻԴՆԵՐԻ ԴԵՐՕՔՍԻԴԱՑՄԱՆ ԿԱՐԳԱՎՈՐՈՒՄԸ ԴԻԲՈՒՆՈԼՈՎ ԻՄՄՈԲԻԼԻԶԱՑԻԱՅԻ ՍՏՐԵՍԻ ՊԱՅՄԱՆՆԵՐՈՒՄ

Է. Մ. ՄԻՔԱՅԵԼՅԱՆ, Վ. Գ. ՄԿՀԻԹԱՐՅԱՆ

Իմմոբիլիզացիոն ստրեսի պայմաններում ասկորատ և NADPH կախում ունեցող լիպիդային դերօքսիդացման պրոցեսը։ Սուպերօքսիդդիսմուտազայի ակտիվություն ճնշվում է, իսկ գլուտաթիոնդերօքսիդազայի և գլուտաթիոնռեդուկտազայի ակտիվություն բարձրանում է։ α-տոկոֆերոլի քանակը հյուսվածքներում զգալիորեն նվազում է։

Իմմոբիլիզացիոն ստրեսի պայմաններում դիբունոլը կարգավորում է վերօքսիդացման պրոցեսի ինտենսիվությունը, α-տոկոֆերոլի մակարդակը հյուսվածքներում, ինչպես նաև նշված ֆերմենտների ակտիվություն և կանխում թթվածնի ակտիվ ձևի գոյացումը։

THE REGULATION OF LIPIDS PEROXIDATION BY DIBUNOL UNDER THE IMMOBILIZATION STRESS CONDITIONS

E. M. MIKAELIAN, V. G. MKHITARIAN

Under the immobilization stress conditions the ascorbate and NADPH-dependent lipid peroxidation processes increase in the brain, liver and myocardium.

The activity of superoxiddismutase decreases, while the glutathione peroxidase and glutathione reductase activities increase with the decrease

of α-tocopherol content in tissues. Dibunol regulates the intensity of lipid peroxidation processes, the level of α-tocopherol in tissues, the activity of the named enzymes.

Dibunol inhibits the appearance of the active form of the oxygen, too.

ЛИТЕРАТУРА

1. *Барсов В. А.* Тез. Всесоюзн. совещ. «Биоантиоксиданты», 118, Черноголовка, 1983.
2. *Бурлакова Е. Б.* и др. Биоантиоксиданты в лучевом поражении и злокачественном росте. 52, М., 1975.
3. *Бурлакова Е. Б., Кухтина Е. И., Храпова Н. Г., Аристратова С. А.*, Биохимия, *892*, 47, 6, 1982.
4. *Ланкин В. З., Гурович С. М.* Докл. АН СССР, *67*, 228, 3, 1976.
5. *Мхитарян В. Г., Араратян Э. А., Микаелян Э. М., Мелконян М. М.* Ж. эксперим. и клин. медицины, *13*, 17, 5, 1977.
6. *Микаелян Э. М., Мелконян М. М., Мелик-Агаева Е. А., Мхитарян В. Г.* Ж. эксперим. и клин. медицины, *11*, 19, 5, 1979.
7. *Ракита Д. Р., Коновалова Г. Г., Черпаненко Н. М.* и др. Тез. Всесоюзн. совещ. «Биоантиоксиданты», 46, Черноголовка, 1983.
8. *Храпова Н. Г.* Биоантиокислители в регуляции метаболизма в норме и патологии, 59, М., 1982.
9. *Duggan D. E.* Arch. Biochem. Biophys., *84*, 116, 1959.
10. *Morimitsu Nishihimi N., Appaji Rao Jmento Jagu.* Biochem. Biophys. Res. Commun., *46*, 3, 849, 1972.
11. *Nohl H., Hegner D.* Mech. Ageing Develop, *11*, 145, 1979.
12. *Lowry O. H., Rosenbrough A., Beer K., Raymond F.* J. Biol. Chem., *193*, 265, 1951.

«Биолог. ж. Армении», т. XXXVII, № 2, 1984

УДК 612.447+591.177

АКТИВНОСТЬ Ca^{2+}-АТФазы САРКОПЛАЗМАТИЧЕСКОГО РЕТИКУЛУМА БЕЛЫХ СКЕЛЕТНЫХ МЫШЦ ПРИ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОМ ГИПОПАРАТИРЕОЗЕ

Д. Н. ХУДАВЕРДЯН, Э. Э. МХЕЯН

Показано, что в условиях гипофункции околощитовидных желез, на 5—6-е сутки после операции снижается активность Ca^{2+}-АТФазы белых скелетных мышц крыс, что, по-видимому, может способствовать возникновению судорог.

Ключевые слова: гипопаратиреоз, Ca^{2+}-АТФаза, саркоплазматический ретикулум.

Гипофункция околощитовидных желез проявляется в двигательных, трофических и токсических расстройствах. Судорожный синдром, наиболее выраженный в симптомокомплексе этого заболевания, протекает на фоне уменьшения содержания ионов кальция в биологических жидкостях организма [3].

В настоящее время окончательно не выяснена роль процессов, протекающих на различных уровнях нервно-мышечного аппарата, в разви-