

УДК 615.2+612.015.32:616.45—001.1/3

ДИНАМИКА ПЕРЕКИСНОГО ОКИСЛЕНИЯ ЛИПИДОВ ПРИ СТРЕССЕ

Э. М. МИКАЕЛЯН, В. Г. МХИТАРЯН

Изучены динамика ПОЛ, аскорбат-, НАДФН-зависимого ПОЛ и уровень липидных перекисей в тканях, содержание α -токоферола, активность СОД, глутатионпероксидазы и глутатионредуктазы, содержание свободного и эстерифицированного холестерина в эритроцитарных мембранах при остром и хроническом стрессе. При остром стрессе разной продолжительности наблюдается фазовое активирование ПОЛ, наиболее выраженное в сердечной мышце. При повторяющемся стрессе интенсификация ПОЛ продолжается, подавляется СОД и активизируется система глутатионпероксидаза—глутатионредуктаза. Хронический стресс вызывает понижение активности ПОЛ. Во все фазы стресса в тканях наблюдается дефицит α -токоферола, что обосновывает необходимость антиоксидантной профилактики и терапии патологических последствий стресса.

Ключевые слова: стресс, перекисное окисление липидов, α -токоферол.

Изучение биохимических аспектов стресса является одной из актуальных проблем современной биохимии. Многочисленные исследования, проведенные в последнее десятилетие в этом направлении, выявили дополнительный к известной триаде Селье компонент неспецифической ответной реакции организма на стресс — усиление интенсивности перекисного окисления липидов (ПОЛ). ПОЛ есть естественный путь обновления липидной компоненты биологической системы, строго лимитированной во всех биомембранах. Существует тесная взаимосвязь между скоростью окислительных превращений липидов, системой природных антиоксидантов, структурой и функцией биомембран [1]. ПОЛ играет существенную роль в контроле клеточного метаболизма.

Цель настоящей работы состояла в изучении динамики перекисного окисления липидов при остром стрессе разной продолжительности и при хроническом стрессе.

Материал и методика. Опыты ставили на белых крысах-самцах массой 100—150 г, используя классическую модель иммобилизационного стресса (ИМО), предложенную Селье, которая обеспечивает значительное активирование симпатико-адренормедулярной и гипоталамико-адреноргангикальной систем.

Животные были разделены на 7 групп по 10 в каждой: 1—питательные крысы—контроль; 2, 3, 4 и 5 группы—острый стресс (2—5 мин ИМО, 3—15 мин ИМО, 4—30 мин ИМО, 5—150 мин ИМО); 6—хронический стресс (150 мин ИМО ежедневно в течение 40 дней); 7—адантированный контроль (150 мин ИМО ежедневно в течение 39 дней). Забой осуществляли через 24 ч после последней иммобилизации.

Ткани тщательно перфузировали охлажденным 0,15 М КСl. Все операции проводили на холоде.

Эритроциты освобождали от плазмы и клеток белой крови центрифугированием. Мембраны эритроцитов выделяли по методу Лимбера [12]. Содержание витамина Е в плазме крови, эритроцитарных мембранах, гомогенатах сердца, печени и мозга определяли флуорометрически по методу Дугана, выражая его в $\mu\text{кг}$ на мг белка [9].

Белок во всех пробах определяли по методу Лоурри [13]. Глутатионпероксидазную и глутатионредуктазную активность определяли по ранее описанной методике; активность супероксиддисмутазы (СОД)—по ингибированию генерации супероксидных анион-радикалов в модели феназин—метосульфат-НАД—интротетразолий синий. Единицы активности пересчитывали на мг белка [11].

О ферментативном НАДФН-зависимом и неферментативном аскорбат-зависимом индуцированном ПОЛ судили по уровню одного из конечных продуктов перекисного окисления—малонесного диальдегида по цветной реакции с тиобарбитуровой кислотой [2].

Исходный уровень ПОЛ в плазме крови, гомогенатах сердца, печени, мозга определяли добавлением к 0,5 мл пробы 2,5 мл 20-процентного раствора трихлоруксусной кислоты и 1 мл 0,67-процентного раствора тиобарбитуровой кислоты с последующим кипячением на водяной бане в течение 30 минут. После охлаждения к исследуемой пробе добавляли 4 мл бутанола, пробы встряхивали, центрифугировали; ТБК-окрашенные продукты определяли в бутанольном слое [10]. Для расчета использовали коэффициент молярной экстинкции $1,56 \cdot 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ см}^{-1}$.

Глюкозо-6-фосфатдегидрогеназную и суммарную пероксидазную активность (СПА) в плазме крови определяли по методикам, описанным ранее [6]; холестерин, эстерифицированный и свободный, в плазме крови и эритроцитарных мембранах—по методу Златкис-Зака [8].

Результаты и обсуждение. Нами установлены фазовые изменения в системе образования и устранения липоперекисей, направленность и интенсивность которых зависят от стадии стресса и тканевой специфичности.

При остром стрессе разной продолжительности отмечается интенсификация ПОЛ, выражающаяся как в повышении фонового уровня липидных перекисей, так и в способности липидов тканей к индуцированному ферментативному и неферментативному перекисному окислению (рис. 1—4). Наибольшее активирование ПОЛ при остром стрессе

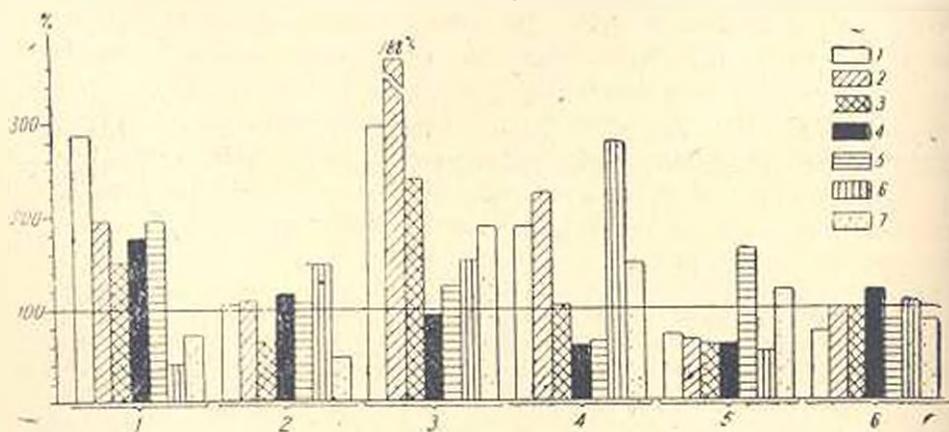


Рис. 1. ПОЛ, содержание витамина Е, активность СОД, глутатионредуктазы и глутатионпероксидазы в сердце при ИМО (в процентах к контролю). Здесь и на всех рисунках по оси абсцисс—фазы стресса: 1—острый стресс, 5 мин ИМО; 2—острый стресс, 15 мин ИМО; 3—острый стресс, 30 мин ИМО; 4—острый стресс, 150 мин ИМО; 5—хронический стресс—40-разовая иммобилизация по 150 мин; 6—адаптированный контроль. Условные обозначения: 1. аскорбат-зависимое индуцированное ПОЛ; 2. НАДФН-зависимое индуцированное ПОЛ; 3. фоновое липидное перекисное; 4. витамин Е; 5. активность СОД; 6. активность глутатионредуктазы; 7. активность глутатионпероксидазы.

наблюдается в сердце, особенно при 30-минутной иммобилизации (рис. 1). Защитные системы, регулирующие ПОЛ мозговой ткани, проявля-

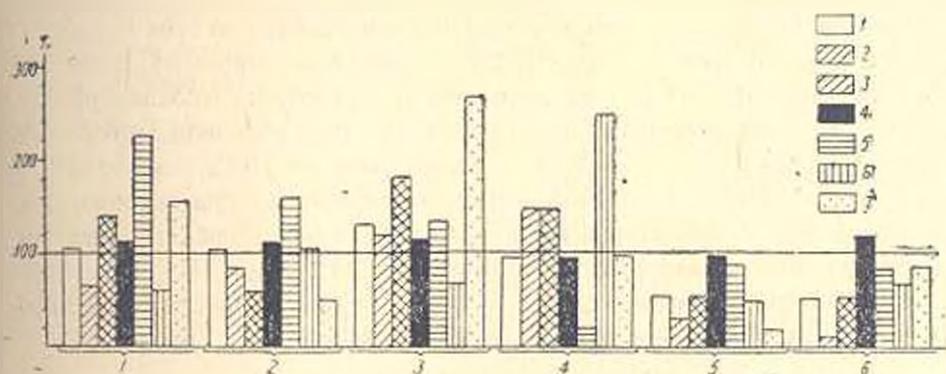


Рис. 2. ПОЛ, содержание витамина Е, активность СОД, глутатиопероксидазы, глутатиопредуктазы в печени при ИМО (в процентах к контролю; обозначения, как на рис. 1).

ют в тех же условиях большую устойчивость (рис. 3), что обусловлено, по-видимому, более высокой исходной емкостью запасов α -токоферола [4]. Это теоретически обосновывает сравнительно высокую частоту возникновения инфаркта миокарда при остром стрессе и необходимость включения в комплексную терапию средств, регулирующих интенсив-

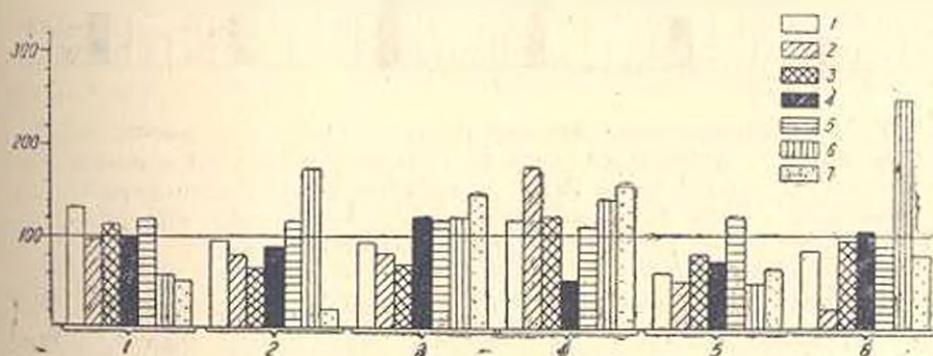


Рис. 3. ПОЛ, содержание витамина Е, активность СОД, глутатиопредуктазы и глутатиопероксидазы в мозге при ИМО (в процентах к контролю; обозначения, как на рис. 1)

ность ПОЛ. Исследованиями Мерсона показано, что при эмоционально-болевым стрессе в результате активирования ПОЛ повреждается мембранная система мионитов, ответственная за транспорт кальция, избыток которого вызывает очаговые контрактурные, а в дальнейшем и некробиотические изменения миокарда [7]. Предварительное введение антиоксиданта дибунола в известной мере нормализует указанные сдвиги.

Как показали наши исследования, при остром стрессе продолжительностью 5, 15 и 30 мин содержание α -токоферола в плазме крови и эритроцитарных мембранах снижается по сравнению с исходным на 30—60%, тогда как в сердце, печени и мозге находится на уровне кон-

троля или несколько превышает его (рис. 1—5). При продолжительности иммобилизации до 150 мин витамин Е активно затрачивается на регулирование ПОЛ путем тушения свободных радикалов и синглетного кислорода, в связи с чем запасы его уменьшаются во всех изученных тканях. При остром стрессе СОД в основном активируется, а система глутатионпероксидаза—глутатионредуктаза работает несбалансированно, так как активирование одного из ферментов сопровождается ингибированием другого (рис. 1—5). Активирование ПОЛ, снижение содержания витамина Е в эритроцитарных мембранах при остром стрессе приводят к структурно-функциональной перестройке: изменяется содержание холестерина и соотношение его фракций, повышается проницаемость, о чем свидетельствует резкое повышение в плазме крови активности глюкозо-6-фосфатдегидрогеназы и СПА (рис. 4 и 5).

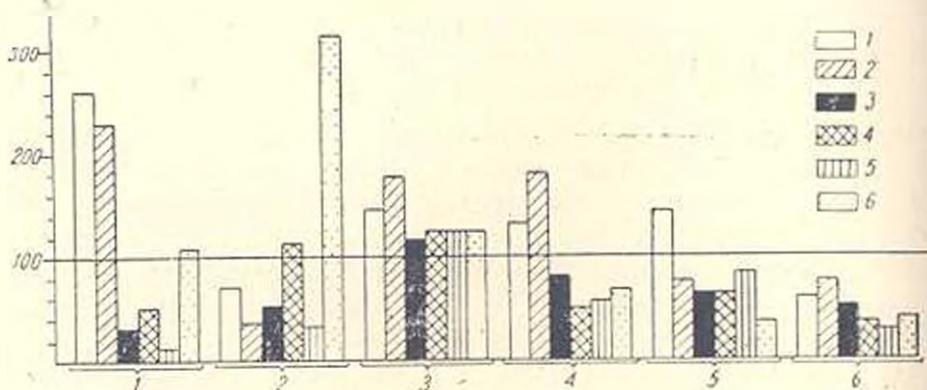


Рис. 1. ПОЛ, содержание витамина Е и холестерина в эритроцитарных мембранах (в процентах к контролю). Условные обозначения: 1. аскорбат-зависимое индуцированное ПОЛ; 2. НАДФН-зависимое индуцированное ПОЛ; 3. витамин Е; 4. холестерин общий; 5. холестерин эстерифицированный; 6. холестерин свободный.

При повторяющемся стрессе (от 1 до 7 ИМО) активирование ПОЛ в тканях продолжается. К 7-й иммобилизации во всех тканях, кроме сердца, ПОЛ нормализуется, приближаясь к контролю [5]. Запасы витамина Е в тканях значительно понижаются. Активность ферментных систем, предотвращающих образование липоперекисей и устраняющих их, качественно меняется. Симбиотно росту уровня липидных перекисей активируется система, детоксифицирующая их, — глутатионпероксидаза—глутатионредуктаза. СОД при этом в основном ингибируется, что углубляет нарушения в регуляции ПОЛ в результате увеличения в тканях агрессивных форм кислорода.

Наши установлен интересный факт, неизвестный в литературе, — подавление интенсивности ПОЛ при хроническом стрессе (40 ИМО).

В сердце, печени и мозге примерно на 50 процентов понижается как исходный уровень липидных перекисей, так и способность к индуцированному аскорбат- и НАДФН-зависимому перекислению (рис. 1—3). Однако в плазме крови уровень липоперекисей остается на уровне, выше контрольного на 50 процентов, и несколько активируется аскорбат-

зависимый путь ПОЛ в эритроцитарных мембранах (рис. 4 и 5). В тканях существует дефицит витамина Е, в особенности в крови и эритроцитарных мембранах. Содержание холестерина в эритроцитарных мембранах понижено, они все еще не стабилизированы, о чем свидетельствует несколько высокий уровень активности глюкозо-6-фосфатдегидрогеназы и СПА в плазме.

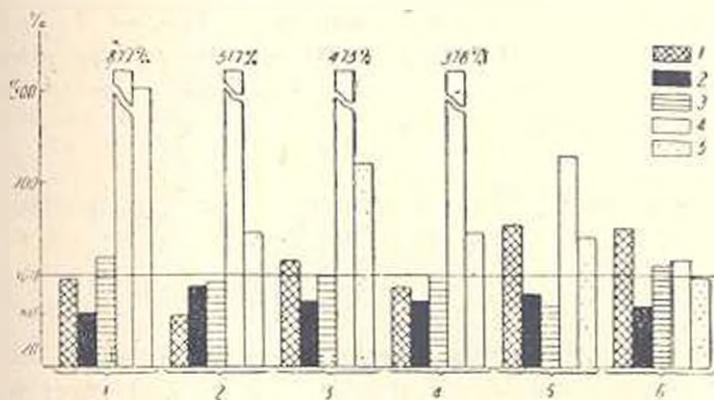


Рис. 5. Содержание липидных перекисей, витамина Е, активность СОД, глюкозо-6-фосфатдегидрогеназы и СПА в крови (в процентах к контролю). Условные обозначения: 1. фоновые липидные перекисей; 2. витамин Е; 3. активность СОД; 4. глюкозо-6-фосфатдегидрогеназа; 5. СПА.

У адаптированных животных (адаптированный контроль) все изученные показатели процесса ПОЛ только в сердце приближаются к контролю, в остальных тканях еще наблюдается некоторая несбалансированность его.

Полученные результаты свидетельствуют о том, что во все фазы стресса нарушается регуляция ПОЛ, снижается содержание α -токоферола в тканях, что изменяет структуру и функцию биомембран, вносит определенную дисгармонию в метаболизм клетки. Это обосновывает необходимость антиоксидантной профилактики патологических последствий стресса.

Ереванский медицинский институт,
кафедра биохимии

Поступило 12.VIII 1984 г.

ՈՒՊԻՆԵՐԻ ԳԵՐՈՋՍԻԿԱՑՄԱՆ ԴԻԱԳՆՈՎԱՆ ԱՏՐԵՍԻ ՊԱՅՄԱՆՆԵՐՈՒՄ

Է. Մ. ՄԻՔԱՅՈՅԱՆ, Վ. Ն. ՄԻՔԱՐԱՆ

Սուր և բրոնխիալ ստրեսի պայմաններում ուսումնասիրվել է լիպիդների ղերոքսիդացման դինամիկան, ապոբոլիտի և NADPH-կախում ունեցող ղերոքսիդացման պրոցեսը, α -տոկոֆերոլի պարունակությունը հյուսվածքներում, սուպերօքսիդի ստացման արագությունը, գլուտաթիոն ղերոքսիդացման արագությունը, ազատ և էսթերացված խոլեստերինի քանակությունը էրիթրոցիտների թաղանթում:

Սուր ստրեսի տարբեր տևողության պայմաններում նկատվում է լիպիդային ղերոքսիդացման պրոցեսի ֆազային ակտիվացում, որն առավել արտահայտված է սրտամկանում:

Կրկնվող ստրեսի պայմաններում լիպիդային գերօքսիդացումը շարունակում է մնալ ինտենսիվ, ճնշվում է սուպերօքսիդի սամատազայի ակտիվությունը և ակտիվանում գլուտաթիոնգերօքսիդազա-գլուտաթիոնոկոլուկտազա սիստեմը:

Քրոնիկ ստրեսի պայմաններում լիպիդային գերօքսիդացման ակտիվությունը ճնշվում է:

Պարզվել է, որ ստրեսի բոլոր ֆազաներում նվազում է հյուսվածքներում α -տոկոֆերոլի քանակը, որով հիմնավորվում է հակաօքսիդանտային պրոֆիլակտիկան և բուժումը՝ ստրեսի պաթոլոգիկ հետևանքործուծությունը կանխելու համար:

DYNAMICS OF LIPIDS PEROXIDE OXIDIZATION DURING THE STRESS

E. M. MIKAELIAN, V. G. MKHITARIAN

Dynamics of lipids peroxide oxidization, ascorbate, NADPH-dependent lipids peroxide oxidization and the level of lipid peroxides in the tissues, the content of α -tocopherol, the activity of superoxide dismutase, glutathione peroxidase and glutathione reductase, the content of free and esterized cholesterol in the erythrocyte membranes have been studied during acute and chronic stress. During acute stress of different length phase activation of lipids peroxide oxidization has been observed, what is more expressed in the heart muscle. During the repeated stress the intensification of lipids peroxide oxidization goes on, is suppressed the superoxide dismutase and is activated the GSH-peroxide-GSH-reductase system. The chronic stress decreases the lipids peroxide oxidization activity. In all phases of the stress a deficit of α -tocopherol is observed in tissues what proves the necessity of antioxidant prophylaxy and therapy of the stress pathological results.

Л И Т Е Р А Т У Р А

1. Буракова Е. В., Кухтина Е. Н., Храпова Н. Г., Аристрахова С. А. Биохимия, 47, 5, 822, 1982.
2. Владимиров Ю. А., Арчаков А. И. Перекисное окисление липидов в биологических мембранах. 242, М., 1972.
3. Микаелян Э. М., Мелконян М. М., Мелик-Агаева Е. А., Мхитарян В. Г. Журн. эксперим. и клин. мед., 19, 11, 5, 1979.
4. Микаелян Э. М., Мкртчян С. Л., Мелик-Агаева Е. А., Мхитарян В. Г. Журн. эксперим. и клин. мед., 23, 407, 5, 1983.
5. Микаелян Э. М., Мхитарян В. Г. Биолог. ж. Армении, 16, 108, 2, 1984.
6. Микаелян Э. М., Шагджен А. Л., Мхитарян В. Г. Журн. эксперим. и клин. мед., 26, 123, 2, 1984.
7. Мерсон Ф. З., Малышева В. В., Петрова В. А., Лифантьева В. И. Кардиология, 9, 85, 1983.
8. Сентебова Н. А. Лабор. дело, 6, 375, 1977.
9. Duggan D. E. Arch. Biochem. Biophys., 64, 116, 1959.
10. Yoshitaka, Kawada K., Shimada J., Mori M. Amer. J. Obstet and Gynecol., 372, 3, 1979.
11. Murimitsu Nishimi N., Appaji Rao, Jmento Jagl. Biochem. Biophys. Res. Commun., 849, 46, 3, 1972.

12. Limber G. K., Davis R. F., Bakerman. Blood, 36, 111, 1970.
13. Lowry O. H., Rosenbrengh A., Beer K., Raymond F. J. Biol. Chem., 193, 265, 1951.

«Биолог. ж. Армения», т. XXXVIII. № 5, 1985

УДК 577.15+577.3+591.39

ВЛИЯНИЕ ПРЕДШЕСТВЕННИКОВ ИЗОЦИТРАТА НА АКТИВНОСТЬ НАДФ-ЗАВИСИМОЙ ИЗОЦИТРАТДЕГИДРОГЕНАЗЫ В ТКАНЯХ КУР

Р. А. СИМОНЯН, Л. А. АРУТЮНЯН, А. А. СИМОНЯН

Изучали влияние цитрата, пирувата и оксалоацетата на активность НАДФ-зависимой изоцитратдегидрогеназы в цитоплазме и митохондриях мозга и печени кур в процессе онтогенетического развития. Показано, что активность фермента в тканях кур стимулируют низкие концентрации цитрата и пирувата и высокие концентрации оксалоацетата. Активирующее воздействие использованных эффикторов проявляется заметнее на ранних стадиях онтогенеза.

Ключевые слова: куры, изоцитратдегидрогеназа, цитрат, пируват, оксалоацетат, онтогенез.

В проведенных нами ранее исследованиях были выявлены некоторые закономерности становления НАДФ-зависимой изоцитратдегидрогеназы (НАДФ-ИДГ) в онтогенезе кур, в частности, четкая зависимость динамики активности фермента от вида ткани и стадий ее морфофункциональной дифференциации [1]. Естественно было задаться вопросом о влиянии на течение изоцитратдегидрогеназной реакции различных соединений, уровень которых изменяется в ходе индивидуального развития. К настоящему времени нет данных, касающихся роли различных регуляторных факторов в метаболизме изоцитрата в тканях кур, в связи с чем представлялось интересным изучить особенности их влияния на НАДФ-ИДГ в ходе онтогенеза.

Выяснение роли различных эффикторов в системе контроля над активностью НАДФ-ИДГ мы начали с предшественников изоцитрата: цитрата, пирувата и оксалоацетата. В настоящей работе приводятся результаты этих исследований.

Материал и методика. Работа выполнена в лаборатории эмбриологии Института биологии АН Армянской ССР. Опыты проводили на мозговой и печеночной тканях 20-дневных эмбрионов (стадия вылупления), 5-дневных цыплят (ранний постэмбриональный период) и зрелых кур. Цитоплазматическую и митохондриальную фракции тканей получали описанным ранее методом; активность НАДФ-ИДГ определяли спектрофотометрически и выражали в мкмольх НАДФН/мг белка/мин [1].

Инкубационная смесь содержала 50 мМ трис-НСl буфера (рН 8,5), 2 мМ $MnCl_2$, 0,2 мМ ЭДТА, 1 мМ НАДФ, 2 мМ изоцитрата и различные концентрации цитрата, пирувата или оксалоацетата.

Результаты и обсуждение. В первой серии опытов исследовали влияние цитрата на активность цитоплазматической и митохондриальной