

## ВЛИЯНИЕ ВИТАЖЕНА НА ОКСИДАТИВНЫЙ СТРЕСС В ПЕЧЕНИ БЕЛЫХ КРЫС ПРИ ОСТРОЙ АЛКОГОЛЬНОЙ ИНТОКСИКАЦИИ

Л.А. АМИРЯН

*Ереванский государственный медицинский университет им. М.Гераци, 375025*

Показано, что при 30-часовой острой алкогольной интоксикации (ОАИ) на фоне увеличения продукта липидной пероксидации - малонового диальдегида (МДА), снижаются активности Cu,Zn-супероксиддисмутазы (СОД) и каталазы в печени крыс. Снижение активности каталазы связано с уменьшением ее содержания, а потеря СОД активности - с обратимым восстановлением  $Cu^{2+}$  в активном центре фермента. Под воздействием перорально введенного растительного препарата витажен (90-100 мг/кг) происходит приближение этих показателей к норме. Предполагается, что витажен способен смягчить эффект оксидативного стресса в печени при ОАИ в эксперименте.

Ցույց է տրվել, որ 30 ժամյա սուր ալկոհոլային ինտոքսիկացիայի (ՍԱԻ) արդյունքում լիպիդային պերօքսիդացման պրոդուկտ մալոնային դիալդեհիդի (ՄԴԸ), քանակական ածի բարձր ֆոնի վրա, նկատվում է Cu,Zn-սուպերօքսիդիզիսմուտազայի (ՍՕԴ) և կատալազայի ակտիվությունների անկում առնետների լյարդում: Կատալազայի ակտիվության անկումը կապված է նրա պարունակության նվազման, իսկ ՍՕԴ-ի ակտիվության անկումը ֆերմենտի ակտիվ կենտրոնում  $Cu^{2+}$  դարձելի վերականգնման հետ: *Per os* տրված բուսական ծագման «Վիտաժեն» պրեպարատի ազդեցությամբ (90-100մգ/կգ) տեղի է ունենում վերոհիշյալ ցուցանիշների մոտեցում նորմային: Ենթադրվում է, որ վիտաժենը ընդունակ է մեղմացնելու օքսիդատիվ սթրեսի ազդեցությունը լյարդում ՍԱԻ ժամանակ էքսպերիմենտում:

During 30 h acute alcohol intoxication (AAI) on background of increased lipid peroxidation product - the malonic dialdehyde (MDA), decrease of Cu,Zn-superoxidedismutase (SOD) and catalase activities is observed in rats liver. Decrease of catalase activity is connected with decrease of its content and the lost of SOD activity - by reversible reduction of  $Cu^{2+}$  in active centre of the enzyme. Application of phytopreparation «Vitajen» (90-100 mg/kg) *per os* approaches the above mentioned indices to norma. It is supposed that «Vitajen» is able to do mildly the effect of oxidative stress in liver during AAI in experiment.

*Острая алкогольная интоксикация - Cu,Zn-супероксиддисмутаза - каталаза - малоновый диальдегид - витажен*

При острой алкогольной интоксикации наблюдается усиление перекисного окисления липидов (ПОЛ) биосистем и снижение активности антиоксидантных ферментов в печеночной ткани в эксперименте [7, 13], что является причиной развития различных патологических процессов в печени крыс.

Для смягчения повреждающих эффектов оксидативного стресса, связанных с увеличением при ОАИ физиологического уровня активных форм кислорода (АФК), используются препараты антиоксидантного действия: Cu,Zn-супероксиддисмутаза [4], алоин [8], дубинол и б-каротин [6]. Однако в последние годы внимание исследователей привлекает адаптоген растительного происхождения витажен, в состав которого входят экстракт женьшеня, витамины антиоксидантного действия, микроэлементы и др., за

счет чего препарат приобретает выраженные антиоксидантные свойства и нормализует уровень АФК [1].

Нами изучались молекулярные механизмы инактивации печеночной Cu,Zn-супероксиддисмутазы и каталазы печени крыс с определением уровня МДА в ее гомогенатах и эффекты витажена на процесс регулирования уровней этих соединений при ОАИ.

**Материал и методика.** В каждой серии исследований ОАИ у белых крыс обоего пола (средняя масса 66-180г) вызывали внутрибрюшинным введением этанола (6 г/кг) после 24-часового голодания при сроке интоксикации 30 ч. Животные были разбиты на три группы (по 10 крыс в каждой): I - интактные (контрольные), II - получавшие с пищей этанол и III - получавшие этанол и препарат витажен, смешанный с пищей (средняя доза >100 мг/кг для каждой крысы). Животные были декапитированы под эфирным наркозом. Печень животных (по 50 г) всех групп обрабатывали одновременно, в одинаковых условиях. В частности, печень гомогенизировали в 0,1М калий фосфатном буфере (КФБ), рН=7,4 (объем гомогената 100 мл), затем брали по 5 мл гомогената для определения содержания МДА; остальную часть гомогенатов в каждой группе обрабатывали по методу [3] для получения Cu,Zn-СОД и каталазы. Для этого ацетоновые порошки гомогенатов этих групп осушали, повторно гомогенизировали в 0,1М КФБ и после удаления нерастворимых частей осаждали насыщенным раствором сульфата аммония. Далее этот осадок растворяли в воде, диализировали против воды и повторно центрифугировали. Надосадочный раствор, содержащий Cu,Zn-СОД и каталазу, разделяли и очищали методом ионообменной хроматографии на целлюлозе DE $\bar{E}$ -52 («Whatman», Англия) и сефадексом DEAE A-50 («Pharmacia», Швеция). Срок получения СОД и каталазы - 45-48 ч.

МДА в гомогенатах печени определяли методом [5] и выражали в микромолях в расчете на 1 г печени. Оптические спектры регистрировали на спектрофотометре «Хитачи» (Япония) с длиной оптического пути 1 см. Спектры электронного парамагнитного резонанса (ЭПР) Cu,Zn-СОД регистрировали на спектрометре «Varian E-9» (США) в следующих условиях: диапазон поля - 1000 Гс, постоянное времени - 0,3 сек, амплитуда модуляции - 5 Гс, чувствительность записи - 10<sup>3</sup>, микроволновая мощность - 10 МВ, микроволновая частота - 9,12 ГГц, температура в резонаторе прибора - 196°. СОД содержащие фракции помещали в кварцевые трубки (3x7см) и после охлаждения в жидком азоте сразу же переносили в соответствующий дюар и производили запись ЭПР спектров.

СОД активность фракций определяли методом [10], а каталазную активность - перманганометрией, рассчитав количество расщепляющейся перекиси водорода (в молях) определенным количеством каталазы. В обоих случаях удельную активность этих ферментов определяли в расчете на 1г печени.

В исследованиях был использован препарат антиоксидантного действия витажен (Болгария). Всего были проведены четыре серии таких исследований. Статистическую обработку осуществляли методом Стьюдента- Фишера.

**Результаты и обсуждение.** При ОАИ в печени крыс II группы наблюдалось снижение, по сравнению с контролем, Cu, Zn-СОД и каталазной активности и увеличение уровня МДА (табл 1). Эти данные хорошо коррелируют с оптическими и ЭПР спектральными показателями Cu,Zn-СОД в группах (табл. 2). Действительно, во II группе (при ОАИ) интегральная

Таблица 1. Изменения активности СОД и каталазы, а также уровня МДА при ОАИ, без подачи (I) и при подаче витажена (II), % (n=4)  
(контроль принимается за 100%).

Метаболиты	I	II
Cu, Zn-СОД	-43,4± 2,1	-18 ±1,4
Каталаза	-36,2±1,6	-13,3±0,4
МДА	+27,4 ±1,3	+15,2±1,1

Таблица 2. Интегральные интенсивности (I) ЭПР спектров (в относительных единицах) и величина максимального оптического поглощения ( $A_{680}$ ) Cu,Zn-СОД в контрольной (I), II, II $\phi$  и III группах с острой алкогольной интоксикацией (n=4).

Показатели Cu,Zn-СОД	I	II (ОАИ)	II $\phi$	III (ОАИ+ витажен)
I	2,2 $\pm$ 0,11	1,3 $\pm$ 0,04	2,1 $\pm$ 0,21	2,0 $\pm$ 0,12
$A_{680}$	0,024 $\pm$ 0,002	0,015 $\pm$ 0,001	0,022 $\pm$ 0,002	0,019 $\pm$ 0,001

интенсивность (в относительных единицах) ЭПР спектров Cu,Zn-СОД, по сравнению с контролем (I группа), снижается, однако после аэрации кислородом в течение 45-50 мин (объем раствора после аэрации доводят до первоначальной величины добавлением воды) или после добавления окислителя феррицианида (группа II $\phi$  интенсивность ЭПР спектров, а также величина плотности максимального оптического поглощения увеличиваются. Это свидетельствует о том, что в результате ОАИ происходит процесс  $Cu^{2+} \rightleftharpoons Cu^{1+}$  в центре фермента, а аэрацией или окислением  $Cu^{1+}$  происходит обратный процесс  $Cu^{1+} \rightarrow Cu^{2+}$ , что приводит к такому же увеличению интегральной интенсивности ЭПР спектров Cu, Zn-СОД (табл. 2). Фактически в результате ОАИ во II группе происходит обратимое

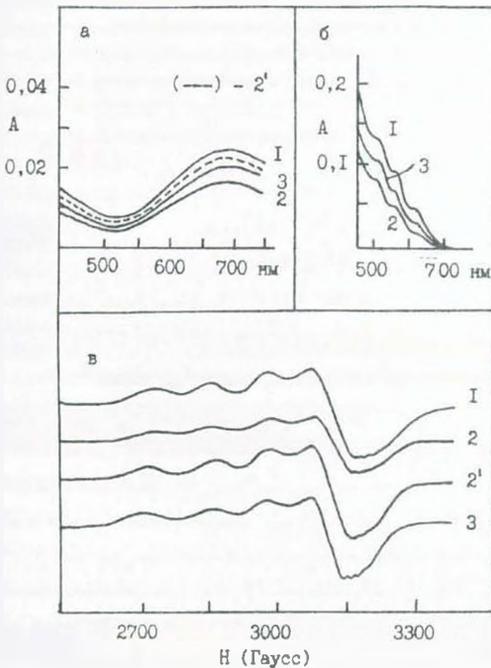


Рис. 1. Оптические и ЭПР спектральные изменения Cu,Zn-СОД и каталазы при ОАИ с подачей витагена: а - оптические спектры поглощения Cu,Zn-СОД из печени крыс контрольной группы (1), I группы (при ОАИ без подачи витагена) (2) и после аэрации или окисления  $Cu^{2+}$  (2 $\phi$ , 3 - II группа, при подаче витагена); б - оптические спектры поглощения каталазы из печени крыс контрольной (1), I (2) и II (3) групп; в - ЭПР спектры Cu,Zn-СОД контрольной (1) и I (2) групп, после окисления или аэрации кислородом (2 $\phi$ , 3 - II группа при подаче витагена).

восстановление  $Cu^{2+}$  в активном центре фермента. Это свидетельствует о том, что при ОАИ образующиеся в избытке АФК ( $O_2$  и особенно липоперекиси) могут быть источником электронов при восстановлении  $Cu^{2+}$  в активном центре Cu,Zn-СОД, что неоднократно выявлялось в опытах *in vitro* в апротонных [12] и водных [2] средах. Не исключается, что в процессе восстановления  $Cu^{2+}$  в активном центре СОД могут участвовать и малые дозы  $H_2O_2$ , (большие дозы  $H_2O_2$  могут привести к необратимому восстановлению  $Cu^{2+}$  и инактивации СОД) [11]. В пользу этих соображений свидетельствуют и показатели, полученные при воздействии витагена. Действительно, проявляя антиоксидантное действие, витажен путем снижения АФК, соответственно и МДА (липоперекисей), предотвращает процесс  $Cu^{2+} \rightleftharpoons Cu^{1+}$  в

активном центре Cu,Zn-СОД, приближая этим активность фермента к норме (табл. 1). С другой стороны, АФК, в первую очередь  $O_2^-$ , могут инактивировать каталазу [9], поэтому витажен способен несколько снизить и этот процесс, приблизив активность каталазы III группы к норме.

При ОАИ Cu,Zn-СОД претерпевают обратимые качественные изменения за счет восстановления  $Cu^{2+}$  в активном центре фермента (табл. 2), а его количество практически не уменьшается, и потеря активности есть только результат восстановления меди (парамагнитные свойства имеет только  $Cu^{2+}$ , а не  $Cu^{1+}$ , соответственно снижение интегральной интенсивности ЭПР спектров Cu,Zn-СОД есть результат увеличения уровня  $Cu^{1+}$  или восстановления  $Cu^{2+}$  в активном центре этого фермента). Потеря же активности каталазы связывается с уменьшением ее содержания при ОАИ (рис. 1). Фактически при ОАИ и под воздействием витажена оптические спектры поглощения и ЭПР спектры Cu,Zn-СОД претерпевают только количественные сдвиги, но не качественные.

Повышение уровня МДА при ОАИ может быть связано с многократным увеличением уровня  $O_2^-$  этанолом (при расщеплении  $H_2O_2$  и этот феномен неоднократно был показан в опытах *in vitro*), образующиеся же  $O_2^-$  способны инициировать процесс ПОЛ биосистем. Видимо, при 30-часовой ОАИ организм еще не успевает создать соответствующий уровень антирадикальных защитных систем, а описанные изменения СОД еще носят обратимый характер. Таким образом, уменьшая уровень АФК, витажен заметно снижает возможность возникновения оксидативного стресса в печени животных, предотвращая дальнейшее углубление патологических процессов в этом органе.

## ЛИТЕРАТУРА

1. Багдасарян Г.Г., Бороян Р.Г., Овсян Г.А., Симонян М.А. Итоги и перспективы развития современной медицины в контексте XXI века. 764-767, Бишкек, 1998.
2. Симонян М.А. Биохимия, 49, 11, 1792-1798, 1984,
3. Симонян М.А. АС 1413139, СССР, 1988.
4. Симонян М.А., Амирханян Л.Т., Карагезян К.Г. II Всесоюзн. науч. конф. "Биоантиоксидант", тез. докл, 84, Черногоровка, 1986.
5. Владимиров Ю.А., Арчаков А.И. ПОЛ в биомембранах. 252, Наука, М., 1972.
6. Миненкова Е.А., Барсель В.А., Гагарина А.Б., Паромонова М.Ю., Евтеева Н.М., Пахомов В.Ю., Жигачева И. В. Хим.-фармацевт. журн., 31, 10, 15-17, 1997
7. Ashakumary L., Vijayamal P.L. J. Appl. Toxicol., 16, 4, 305-308, 1996.
8. Chung J.H., Cheong J.C., Lee J.Y., Roh H.K., Cha Y.N. Biochem. Pharmacol., 52, 9, 1461-1468, 1996.
9. Kono Y., Fridovich I. J. Biol. Chem, 257, 10, 5751-5762, 1982.
10. Nishikimi M., Rao N.A., Jagi K. Biochem. Biophys. Res. Commun., 64, 949-956, 1972.

11. *Simonyan M.A., Nalbandyan R.M.* FEBS LETT., 28, 1, 22-24, 1972.
12. *Simonyan M. A., Nalbandyan R. M.* Biochim. Biophys. Acta, 446, 11, 432-444, 1976.
13. *Strzydlewska E.* Roczn. Akad. Mad. Bialymst., 41, 2, 397-404, 1996.

Поступила 26.XI.1998

Биолог. журн. Армении, 3-4 (52), 1999

УДК 579.67:614.31

## МИКРОМИЦЕТЫ, КОНТАМИНИРУЮЩИЕ ЗЕРНО ПШЕНИЦЫ В ПЕРИОД ХРАНЕНИЯ

Օ.Ա. ԵՍԵՓ

*Ереванский государственный университет, биологический факультет,  
кафедра ботаники, 375049, Ереван*

Проведен анализ 13 образцов зерна местной и ввезенной в Армению из Греции и САР в 1997 и 1998 гг пшеницы. Выделено 33 вида грибов-контаминантов из 8 родов гиофимицетов. Отмечена слабая токсичность некоторых видов. Микотоксины афлатоксин В<sub>1</sub>, зеараленон, дезоксиниваленол не выявлены.

Կատարվել է տեղական և Հունաստանից ու Սիրիայի Արաբական հանրապետությունից 1997-98թթ-ին ներմուծված ցորենի հատիկների 13 նմուշների անալիզ: Հիֆոմիցետների 8 ցեղերից անջատվել է աղտոտող սնկերի 33 տեսակ: Որոշ տեսակներ օժտված են թույլ տոքսիկությամբ: Միկոտոքսիններ աֆլատոքսին В<sub>1</sub>, զեարալենոն, դեօքսինիվալենոլ չեն հայտնաբերվել:

13 samples of domestic and imported from Greece and Syrian Arab Republic wheat grains have been tested in 1997-1998. 33 species of fungi-contaminants from 8 genera of hyphomycetes have been isolated. It is noted that some species are low toxic. Mycotoxins - Aflatoxin B<sub>1</sub>, Zearalenon, Desoxynivalenol are not revealed.

### *Зерно пшеницы - грибы-контаминанты - микотоксины*

Знание видового состава грибов, поражающих пшеничное зерно в период хранения, имеет практическое значение, обусловленное токсигенностью многих видов грибов-контаминантов. Видовому составу грибов, загрязняющих зерно пшеницы, и содержанию в нем микотоксинов посвящены многочисленные исследования.

По данным Лейси с соавт. [7], основными микроклиматическими параметрами, определяющими характер микрофлоры, являются температура и влажность зерна. Среди грибов, выделенных из проб зерна, наиболее часто встречаются виды родов *Alternaria alternata*, *Arthrimum*, *Botrytis*, *Cladosporium sp.*, *Drechslera*, *Epicoccum*, *Fusarium sp.*, *Hyaladendron*, *Phoma*, *Phomopsis*, *Stemphylium*, *Ulocladium*.

Жуковой [1] после 15-летнего хранения зерна пшеницы были выделены и идентифицированы 10 видов грибов рода *Penicillium*, которые сохраняли свою жизнеспособность при температуре 5-7<sup>o</sup>. Доминирующими видами были