

УДК 577.174.5:577.153.211:612.35.576.314+577.156:541.459

БИОХИМИЯ

А. Л. Шалджян, С. Л. Мкртчян, Ш. А. Казарян
 член-корреспондент АН Армянской ССР В. Г. Мхитарян

Адреналинзависимая модификация ферментативного гидролиза фосфолипидов печени крыс.

(Представлено 2/IX 1987)

Одним из обязательных компонентов стресс-реакции, как известно, являются процессы перекисного окисления липидов (ПОЛ), роль и механизмы запуска которых при стрессе пока мало изучены. Согласно нашим представлениям (1) в развитии этих процессов чрезвычайно важную роль играют катехоламины, количество которых резко увеличивается при стрессе, а также метаболизм основных субстратов ПОЛ— фосфолипидов биомембран. Целью настоящей работы явилось изучение взаимосвязи этих основных механизмов инициации ПОЛ путем исследования активности ферментов, деацилирующих фосфолипиды— фосфолипаз А (ФЛ А) у животных на фоне предварительного введения адреналина.

Адреналин (Sigma, США) вводили 80 белым крысам-самцам (150—180 г) в дозе 0.1 мг/кг массы за 15 мин до декапитации. Контрольным животным вводили физиологический раствор. Субклеточные фракции печени (микросомы, митохондрии, плазматические мембраны) получали методом дифференциального центрифугирования в градиенте плотности сахарозы (2-4). Активность ФЛ А определяли по выходу свободных жирных кислот (СЖК) из эндогенных фосфолипидов, индуцированному ионами кальция после инкубации в соответствующих средах каждой указанной фракции в течение 1 ч при 37° С (5). В дальнейшем СЖК выделяли последовательным экстрагированием хлороформом, метанолом, гексаном, метилировали обработкой диазометаном и полученные метиловые эфиры анализировали на газожидкостном хроматографе «Хром-5» (УССР). Количественный анализ проводили с использованием маргаритовой кислоты (C₁₇O) в качестве внутреннего стандарта. Активность ФЛ А определяли по разнице между количеством СЖК в опытных и контрольных пробах, в которые хлороформ добавлялся до инкубации. ПОЛ определяли по накоплению малонового диальдегида (МДА) (6), белок— по Лоури. При статистической обработке был использован непараметрический критерий Уилкоксона—Манна—Уитни (7).

Несмотря на то, что избранный нами метод изучения фосфолипазной активности не позволял дифференцированно измерять активности ФЛ А₁ и А₂, нам кажется, что об этом можно косвенно судить по на-

коплению насыщенных и полиненасыщенных жирных кислот (ПНЖК), а также по индексу ненасыщенности (сумма произведений относительного содержания отдельных ПНЖК на количество двойных связей в их молекулах), так как известно, что ФЛ A_1 отщепляет в основном насыщенные кислоты, в то время как ФЛ A_2 — ненасыщенные. Судя по этим данным, у интактных крыс (таблица) во всех исследованных фракциях отмечается аналогичное общепринятому мнению распределение активностей ФЛ A_1 и A_2 , т. е. превалирование ФЛ A_1 в микросомах, ФЛ A_2 в митохондриях.

Действие адреналина на состав СЖК субклеточных фракций печени крыс

Жирные кислоты, мм/мг белка	Микросомы				Митохондрии				Плазматические мембраны			
	контроль		ИМО		контроль		ИМО		контроль		ИМО	
	0	1	0	1	0	1	0	1	0	1	0	1
14:0	1.1	1.8	0.55	1.9	1.05	1.5	0.49	1.4	2.35	1.35	0.3	0.7
15:0	0.3	0.85	0.4	1.1	0.6	1.1	0.2	0.9				
16:0	24.3	98.8	52.3	134.75	18.3	66.6	21.1	56.0	42.1	89.25	54.85	151.3
18:0	0.6	1.2	0.4	2.35	0.5	1.1	0.3	1.1	0.5	0.4	0.3	2.3
18:1	8.4	31.5	27.4	58.8	7.05	22.2	10.5	23.1	18.5	27.75	19.1	85.4
18:2	4.2	18.0	10.9	29.6	1.1	3.1	0.7	3.9	9.8	15.45	10.3	31.9
20:4	20.3	51.0	40.3	156.0		18.6	2.7			23.05	10.3	81.7
Сумма	57.2	206.1	132.3	384.5	29.3	111.4	31.0	98.3	73.0	157.25	101.12	352.5
И. Н.	165.4	132.9	159.1	193.1	34	89.6	64.8	79.7	52.5	54.8	91.9	133.8

Примечание: 0—пробы, инкубированные с хлороформом; 1—пробы, где хлороформ добавлялся после инкубации, И. Н.—индекс ненасыщенности; $x-p > 0.5$.

Введение животным адреналина изменяет как качественный состав СЖК, так и их количество (таблица). Это относится в основном к микросомам и плазматическим мембранам. Количество СЖК увеличивается уже в пробах, инкубированных с хлороформом, свидетельствуя, очевидно, об уже возросшей интенсивности липолиза в этих фракциях. Инкубация с Са²⁺ также резко повышает уровень СЖК и активность фосфолипаз по сравнению с интактными животными—на 70% в микросомах и на 198% в плазматических мембранах (рис. 1). Надо отметить, что судя по увеличению индекса ненасыщенности возрастание уровня СЖК в значительной степени обеспечивается ненасыщенными жирными кислотами, т. е. активируется ФЛ A_2 . В митохондриях активность фосфолипаз не только не увеличивается, но и снижается ниже контрольного уровня на 36,1% (рис. 1).

Сопоставляя эти данные с интенсивностью ПОЛ (рис. 2), можно видеть, что наиболее значительное активирование фосфолипаз в плазматических мембранах сопровождается падением уровня МДА, в то время как в микросомах, где наблюдалось не столь выраженное активирование, и в митохондриях, где имело место даже инактивирование, интенсивность ПОЛ практически не изменялась.

В последнее время появились работы (8, 9), где в экспериментах *in vitro* прямо подтверждено ингибирующее воздействие ФЛ A_2 на ПОЛ. Интерпретируются эти данные в плане большей доступности гидропероксицилов фосфолипидов биомембран для ФЛ A_2 и даль-

нейшего их выхода в цитоплазму для восстановления их глутатион-пероксидазой, т. е. активирование ФЛ A_2 необходимо в качестве одного из звеньев защитного механизма при увеличении уровня ПОЛ. Вероятно, неизменный (в микросомах) и даже уменьшенный (в плазм-

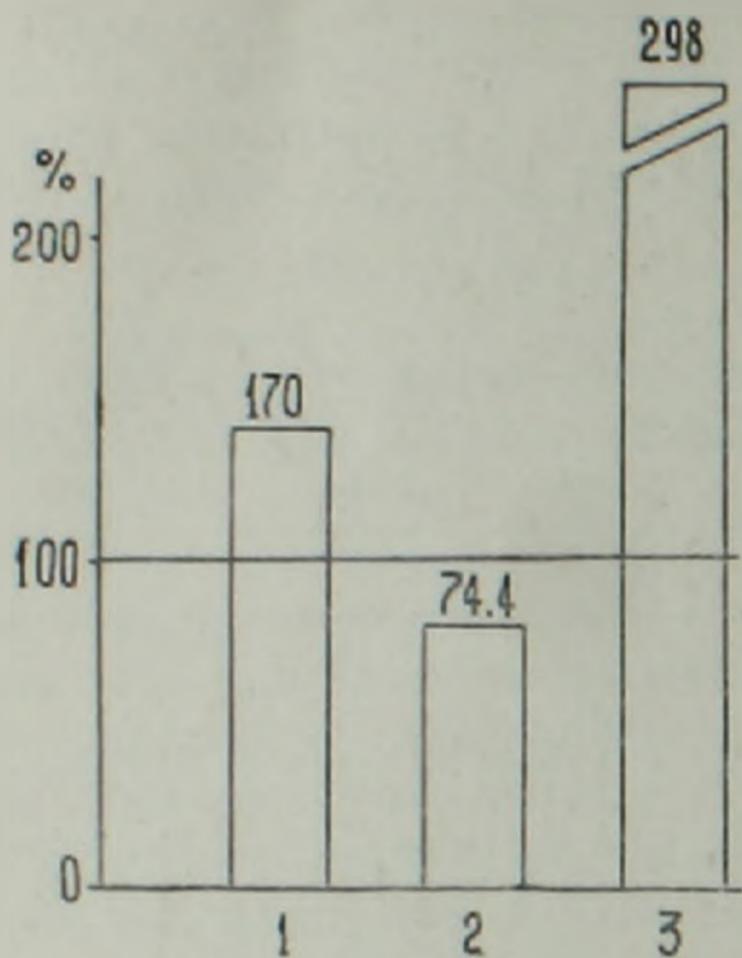


Рис. 1. Активность ФЛ А в микросомах (1), митохондриях (2), плазматических мембранах (3) печени крыс при действии адреналина (в процентах от контрольного уровня)

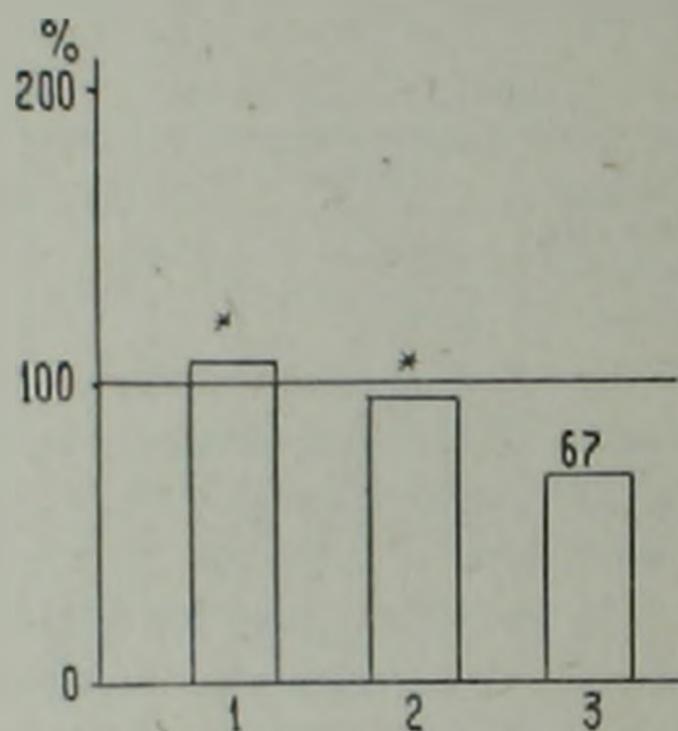


Рис. 2. Уровень МДА в микросомах (1) митохондриях (2), плазматических мембранах (3) печени крыс при действии адреналина (в процентах от контрольного уровня); *— $p > 0,5$

матических мембранах) уровни ПОЛ являются следствием соответствующего повышения активности ФЛ A_2 , наблюдаемого в наших экспериментах, тем более, что, как было показано выше, активируется именно ФЛ A_2 . В то же время наблюдается некоторое несоответствие этой гипотезе данных по ПОЛ и активности ФЛ А в митохондриях — уменьшение уровня ПОЛ не сопровождается активированием ФЛ А. Можно думать, что если в первых двух фракциях снижение ПОЛ адреналином было вызвано стимулированием липазной активности, то для митохондрий данная доза адреналина была чрезмерно высока, что и вызвало уменьшение ПОЛ, так как большие концентрации адреналина оказывают антиоксидантное действие (¹⁰).

Ереванский медицинский институт

Ա. Լ. ՇԱԼՋՅԱՆ, Ս. Լ. ՄԿՐՏԳՅԱՆ, Շ. Շ. ՂԱԶԱՐՅԱՆ, Հայկական ՍՍՀ ԳԱ
բրազիլցի անդամ Վ. Գ. ՄԻՒԹԱՐՅԱՆ

Առնետների ֆոսֆորիլիզների ֆերմենտատիվ հիպոլիզի
ձևափոխումը կախված ադրենալինից

Հայտնի է, որ ստրեսս ունակցիայի անպայման բաղկացուցիչ մասերից մեկը հանդիսանում է գերօրոսիդացման պրոցեսը, որի դերը և սկզբնական մեխանիզմը դեռևս քիչ է ուսումնասիրված:

Համաձայն մեր տվյալների, այդ պրոցեսի պարզացման ընթացքում առավել կարևոր նշանակություն ունեն, ինչպես կատեխոլամինները, որոնց բանակը ստրեսի պայմաններում խիստ շատանում է, այնպես էլ լիպիդային գերօքսիդացման հիմնական սուբստրատ-բիոթաղանթների ֆոսֆատիդների փոխանակությունը:

Տվյալ հետազոտության նպատակն է եղել ուսումնասիրել այդ երկու հիմնական մեխանիզմների փոխադարձ կապը գերօքսիդացման պրոցեսի նախաձեռնության վրա, հետազոտելով ֆոսֆոլիպիդները դիպլոլացնող ֆերմենտի—ֆոսֆոլիպազա A ակտիվությունը նախօրոք ադրենալին ներարկված կենդանիների մոտ:

Հետազոտությունները կատարվել են առնետների վրա, որոնց նախօրոք ներարկվել է ներորովայնային 0,1 կգ/կգ բաշին ադրենալին: Անջատված լյարդից առանձնացված են փորձի համար միկրոսոմները, միտոքոնդրիաները և պլազմատիկ թաղանթը: Ֆոսֆոլիպազայի ակտիվությունը որոշվել է էնցիմիկ ֆոսֆոլիպիդներից անջատված ազատ հարպաթթուների քանակով, որը որոշվել է դադա-հեղուկային բրոմատոգրաֆիկ մեթոդով: Լիպիդային գերօքսիդացման մակարդակը որոշվել է մալոնդիալդեհիդի բանակի էուտակմամբ:

Ստացած տվյալները ցույց են տվել, որ միկրոսոմներում և պլազմատիկ թաղանթում ֆոսֆոլիպազայի ակտիվությունը բարձրանում է, իսկ միտոքոնդրիաներում նրա ակտիվությունը իջնում է:

Միաժամանակ որոշվել է լիպիդային գերօքսիդների քանակը, որը միկրոսոմներում և միտոքոնդրիաներում մնում է անփոփոխ, իսկ պլազմատիկ թաղանթում իջնում:

Ստացված տվյալներից կարելի է եզրակացնել, որ ադրենալինից ակտիվանում է առավել շարժվող ֆոսֆոլիպազա A-ի ակտիվությունը և միաժամանակ նկատվում փոխադարձ կապ լիպիդային գերօքսիդացման պրոցեսի միջև:

ЛИТЕРАТУРА — ՓՐԱՎԱՆՈՒԹՅՈՒՆ

- ¹ С. Л. Мкртчян, К. А. Алексанян, Э. А. Араратян, В. Г. Мхитарян, Журн. экпер. и клинич. медицины, т. 27, № 1 (1987). ² И. А. Карузина, А. И. Арчаков, в кн.: Современные методы в биохимии, Медицина, М., 1977. ³ W. C. Schneider, J. Biol. Chem., v. 176, p. 259 (1948). ⁴ А. В. Поспелова, в кн.: Современные методы в биохимии, Медицина, М., 1977. ⁵ V. C. Chern, G. Bruchner, V. E. Kinsella, Nutr. Res., v. 3, p. 571—581 (1983). ⁶ И. Д. Стальная, Т. Б. Гаришвили, в кн.: Современные методы в биохимии, Медицина, М., 1977. ⁷ Е. В. Гублер, Вычислительные методы анализа и распознавания патологических процессов, Медицина, Л., 1978. ⁸ A. Sevastian, S. F. Miakkasah, S. Nontestique, Arch. Biochem. Biophys., v. 223, № 2 (1983). ⁹ Hong Tan K., D. V. Meyer, J. Bellin e. a., Biochem J., v. 220, p. 243—252 (1984). ¹⁰ В. М. Гукасов, В. К. Федоров, Тр. Моск. 2-го мединститута, вып. 1, 1977.