

М. И. АГАДЖАНОВ

РОЛЬ ЛИПИДНОЙ ПЕРОКСИДАЦИИ И НЕКОТОРЫХ
АНТИОКСИДАНТОВ В ПАТОГЕНЕЗЕ ОЖОГОВОЙ БОЛЕЗНИ
И ВЛИЯНИЕ α -ТОКОФЕРОЛА НА ЕЕ ТЕЧЕНИЕ

Нами показано, что ожоговая травма приводит к усилению в печени липидной пероксидации, которая сопровождается снижением содержания эндогенного α -токоферола, количества фосфолипидов в основном за счет лецитинов и этаноламинфосфатидов, уменьшением процентного содержания ненасыщенных жирных кислот в фосфолипидах. Количество общих и небелковых SH-групп снижается значительно в течение первых суток. Понижается активность супероксиддисмутазы. Резко возрастает проводимость бислойных фосфолипидных мембран для ионов K^+ и Ca^{+2} .

Внутрибрюшинное введение α -токоферола после ожоговой травмы ежедневно в дозе 100 мг/кг веса животного резко подавляет липидную пероксидацию, многократно увеличивает содержание тканевого α -токоферола, снижает содержание фосфолипидов в большей степени, чем при одной ожоговой травме. При этом продолжительность жизни животных сокращается. Применение α -токоферола в дозе 1 мг/кг веса сразу после ожога, через 3, 7, 12 и 17 дней в целом нормализует все изучаемые показатели, удлиняя срок жизни животных.

Ожоговая травма по характеру воздействия является стрессовым фактором. Известно, что стресс сопровождается усилением свободно-радикальных реакций [7], что приводит к повышению уровня липидной пероксидации, генерации супероксиданиона. Липидные перекиси, являясь агрессивными соединениями, окисляют тканевые антиоксиданты, как α -токоферол, фосфолипиды, различные тиоловые соединения, приводят к развитию соответствующей клинической картины.

В связи с этим перед нами стояла задача при экспериментальной ожоговой болезни изучить процесс липидной пероксидации, содержание α -токоферола (α -ТФ), фосфолипидов, жирнокислотный состав последних, а также содержание свободных и связанных SH-групп, активность фермента супероксиддисмутазы (СОД), ответственного за обезвреживание супероксиданиона, активного радикала кислорода. Учитывая важную роль изученных факторов в структуре клеточных мембран, предстояло изучить на бислойных фосфолипидных мембранах (БФМ) проницаемость их в различные сроки после ожоговой травмы.

С целью регулирования процесса липидной пероксидации, а следовательно, и всего характера развития ожоговой болезни предполагалось изучить влияние α -ТФ на организм пораженных животных. Известно, что ожоговая травма сопровождается тяжелым поражением

всего организма и, в первую очередь, печени [10, 11]. В данной работе ставилась задача на модельных опытах изучить сдвиги указанных компонентов при ожоговой болезни в печени животных, а также возможность регулирования их содержания.

Методы исследования

Опыты ставили на белых крысах-самках весом 120—160 г. Ожоги IIIб степени (12—15% поверхности тела) вызывали водой с $t=80^\circ$ при 10 сек экспозиции. В одной серии опытов провели сравнительное изучение влияния различных моделей ожоговой травмы на процесс липидной перекисидации. Другие модели ожоговой травмы создавали с помощью спиртового факела (на предварительно депилированную кожу спины накладывали 7 слоев марли размером 5×5 см, пропитывали их 3 мл спирта и поджигали), а также аппликацией медной пластинки, нагретой до $t=200^\circ$, до подкожной температуры 55° (под контролем термопары).

Части животных после ожоговой травмы ежедневно внутрибрюшинно вводили витамин Е в виде α -токоферилацетата (α -ТФА) в дозе 100 мг/кг веса, другим по 1 мг/кг веса сразу после ожоговой травмы, на 3-, 7-, 12- и 17-й дни. Известно, что α -ТФА в организме гидролизруется до α -ТФ [12].

Интенсивность липидной перекисидации определяли по реакции с тиобарбитуровой кислотой [16], содержание α -токоферола по флуорометрическому методу Далгена [18], фосфолипиды—методом одномерной восходящей хроматографии экстрактов, приготовленных из ацетоновых порошков тканей [8, 15, 22]. Жирнокислотный состав фосфолипидов, экстрагированных [19] и подвергнутых очистке методом тонкослойной хроматографии, изучали газожидкостной хроматографией их метиловых эфиров на хроматографе «Цвет-5» с капиллярной колонкой диаметром 0,35 мм, длиной 40 м; неподвижная фаза—полипропиленгликольадипат, газ-носитель—водород, температура колонки— 202° , температура испарителя— 275° , детектор ионизационный. Время анализа 150—170 мин. Для интерпретации хроматограмм использовали метод А. В. Андреева и др. [1]. Содержание общих и небелковых SH-групп определяли по Седлаку и Линдсену по цветной реакции с 5,5-дитиобисдинитробензойной кислотой [25]. Активность СОД изучали по способности ее тормозить степень автоокисления адреналина при 490 нм [23]. БФМ формировали из фосфолипидов, экстрагированных из тканей [19] с последующим растворением их в гептане в концентрации 20 мг/мл. Электрическую проводимость БФМ измеряли в растворах 0,1 М КСl и 0,1 М CaCl₂ электрометром постоянного тока при различных значениях рН [3].

Исследования проводили через 1 час, 1, 3, 7, 15 и 30 дней после ожоговой травмы.

Результаты и обсуждение

Полученные результаты показывают (рис. 1), что при всех способах нанесения ожоговой травмы имеет место значительное усиление липидной перекисидации, несколько более выраженное в печени, чем в мозге. Эти данные свидетельствуют о том, что с точки зрения адекват-

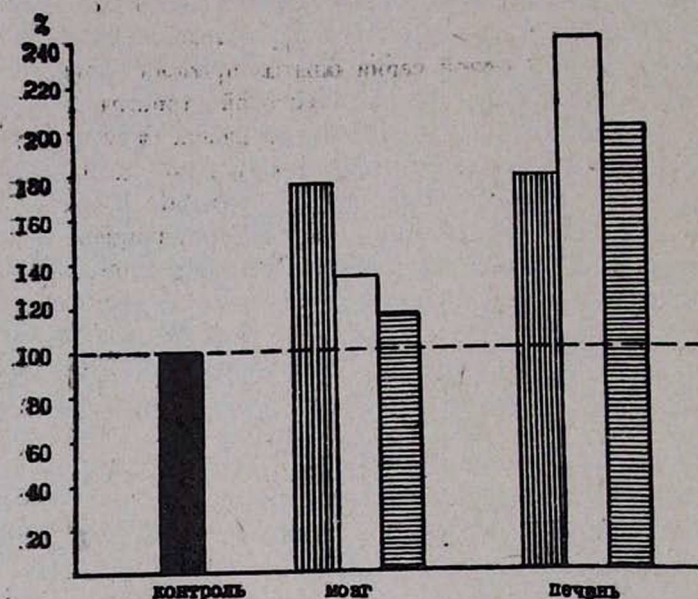


Рис. 1. Уровень липидной перекисидации при различных моделях ожоговой болезни
 III — вода, $t=80^\circ$, 10 сек; □ — металл. пластинка 200° до подкожной $t=55^\circ$,
 ≡ — спиртовой факел.

ности все избранные модели являются приемлемыми. Это связано с возникающей при ожоговой травме общей неспецифической реакцией организма на стрессовое воздействие. Как видно из рис. 2, наиболее выраженное усиление липидной перекисидации имеет место в течение первых суток после травмы, в дальнейшем проявляется постепенная тенденция к нормализации, вплоть до 30-го дня.

Содержание α -ТФ (рис. 3), по нашим данным, в печени интактных крыс в среднем составляет 14,6 $\mu\text{кмоль/г}$ свежей ткани, что совпадает с литературными данными. Ожоговая травма во все исследуемые сроки приводит к значительному снижению его содержания, причем через 1 день их количество уменьшается на 56%.

Сумма фосфолипидов в печени нормальных крыс составляет в среднем 1111,7 $\mu\text{кгР/г}$ свежей ткани, в том числе: монофосфоинозитиды—105,4, сфингомиелины—68,5, лецитины (Л)—560,0, фосфатидилсерин—64,3, фосфатидилэтаноламин (ФЭ)—260,0 и полиглицерофосфолипиды—53,5 $\mu\text{кгР/г}$ свежей ткани; отношение суммы нейтральных фосфолипидов к сумме кислых равно 4,0. Это

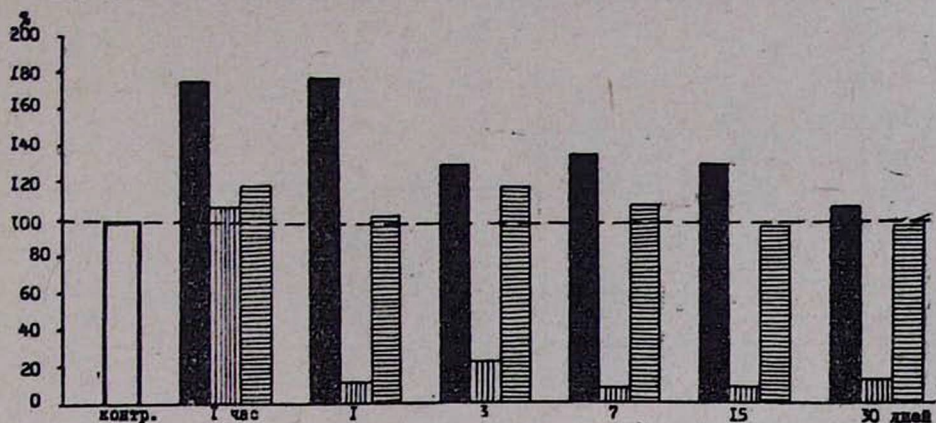


Рис. 2. Влияние α -токоферола на уровень липидной пероксидации в печени крыс при ожоговой болезни (в %). I — ожог, II — ожог + α -ТФ 100 мг/кг, III — ожог + α -ТФ 1 мг/кг

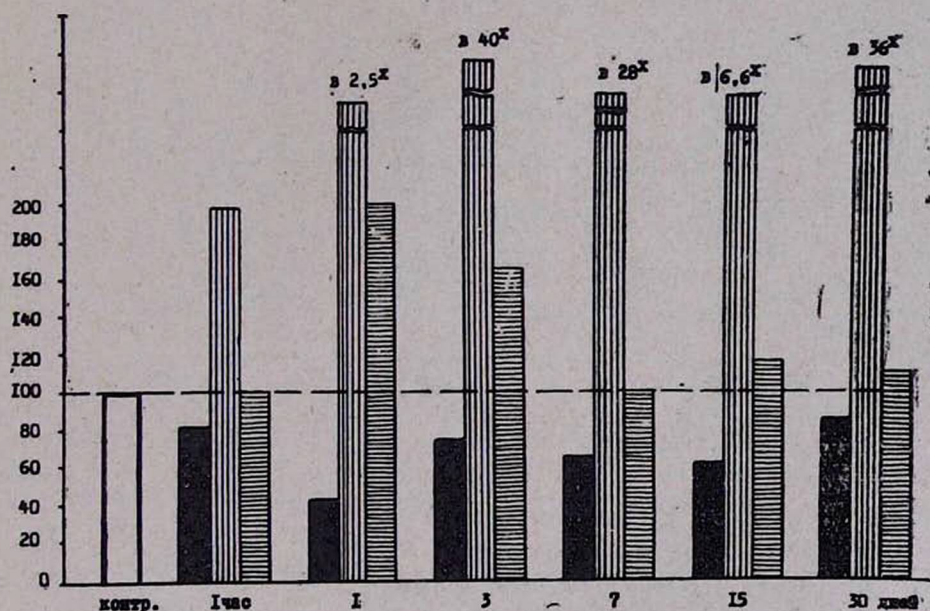


Рис. 3. Влияние α -токоферола на уровень эндогенного α -токоферола в печени крыс при ожоговой болезни (в %). Обозначения, как на рис. 2

также соответствует литературным данным [11]. После ожоговой травмы содержание общих фосфолипидов (рис. 4) оказывается сниженным во все исследуемые сроки, причем к 30-му дню, как и в случае с липидной пероксидацией, отмечается нормализация их содержания. Показано, что эти изменения обусловлены в основном фракциями Л и ФЭ. Изучение жирнокислотного состава фосфолипидов печени (рис. 5) показало, что при ожоговой травме имеет место уменьшение ненасыщенности жирных кислот и соответственно возрастание степени их насыщенности.

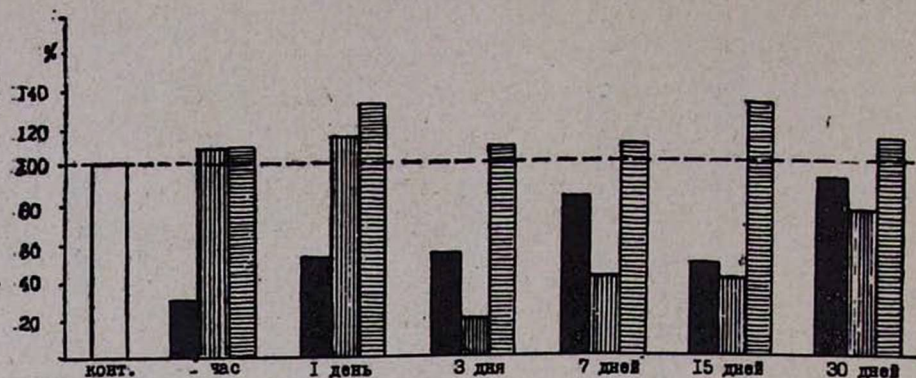


Рис. 4. Влияние α -токоферола на содержание суммарных фосфолипидов в печени крыс при ожоговой болезни (в %). Обозначения, как на рис. 2.

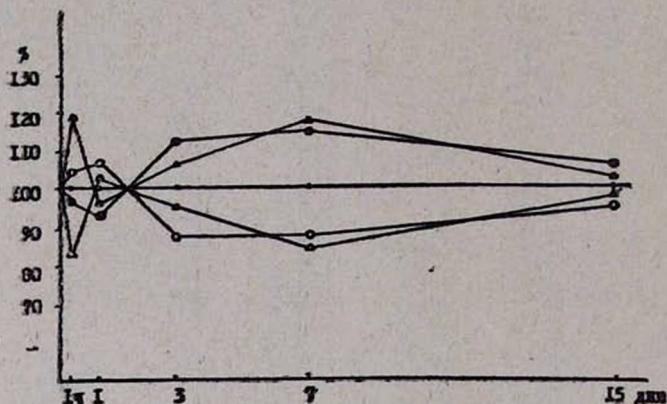


Рис. 5. Влияние α -токоферола на содержание жирных кислот в фосфолипидах печени крыс при ожоговой болезни (в %): ● — насыщенные, ○ — ненасыщенные, ▲ — насыщенные + α -ТФ 1 мг/кг, △ — ненасыщенные + α -ТФ 1 мг/кг

Интересные данные получены при изучении содержания общих и небелковых SH-групп. Показано, что в печени интактных крыс содержание общих SH-групп в среднем составляет 1,53 ммоль/100 г свежей ткани, а содержание небелковых SH-групп—0,24 ммоль/100 г. Эти данные совпадают с результатами, полученными в других лабораториях [25]. При ожоговой болезни имеет место значительное снижение содержания как общих (рис. 6), так и небелковых (рис. 7) SH-групп, причем наибольший эффект наблюдается в первые часы после травмы, а начиная с 7-го дня отмечаеся некоторая тенденция к нормализации.

Что касается СОД (рис. 8), то во все исследуемые сроки ее активность значительно подавлена, а к 15-му дню она нормализуется.

Изучение проводимости БФМ из фосфолипидов печени показало, что в норме проводимость в среднем составляет для ионов K^+ $9 \cdot 10^{-7}$

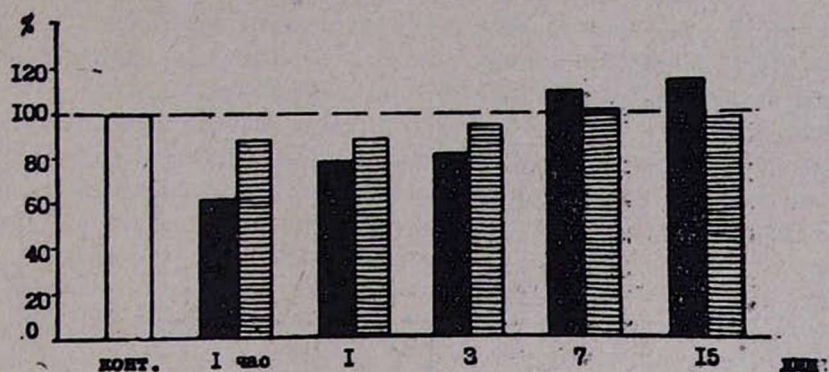


Рис. 6. Влияние α -токоферола на содержание общих SH-групп в печени крыс при ожоговой болезни (в %). Обозначения, как на рис. 2.



Рис. 7. Влияние α -токоферола на содержание небелковых SH-групп в печени крыс при ожоговой болезни (в %). Обозначения, как на рис. 2.

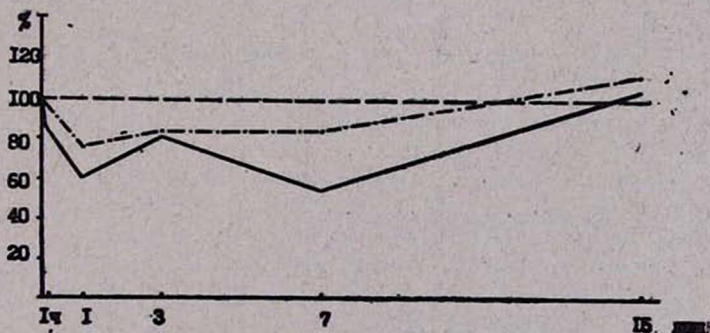


Рис. 8. Влияние α -токоферола на активность супероксиддисмутазы в печени крыс при ожоговой болезни (в %)

----- контроль
 — ожог
 -.-.-.- ожог + α -ТФ 1 мг/кг

$\text{ом}^{-1} \text{см}^{-2}$ (рис. 9а), для ионов Ca^{+2} $5 \cdot 10^{-8} \text{ом}^{-1} \text{см}^{-2}$ (рис. 10а) и не зависит от рН среды. Показано, что во все сроки после ожога имеет место повышение проводимости БФМ на несколько порядков, зависящее от рН среды. Интересно, что для ионов калия максимальное повышение проводимости БФМ отмечено при значениях рН, близких к физиологическому (6,0 и 7,4), в то время как для кальция максимальная проводимость установлена при экстремальных значениях рН (3,0 и 9,0).

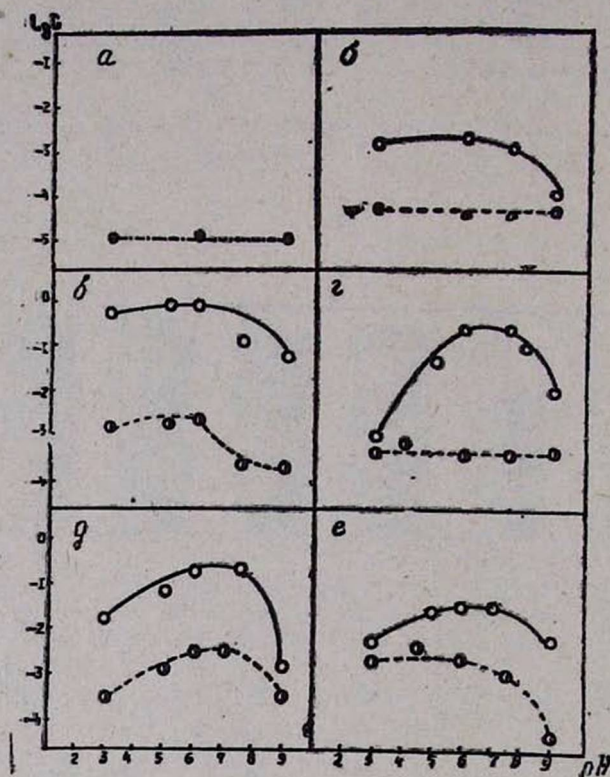


Рис. 9. Влияние α -токоферола на проводимость бислойных мембран из фосфолипидов печени крыс в растворе 0,1 М КСl. а) проводимость мембран из фосфолипидов нормальных крыс; б) проводимость мембран из фосфолипидов крыс через 1 час после ожога; в) то же через 1 день; г) то же через 3 дня; д) то же через 7 дней; е) то же через 15 дней. По оси абсцисс — значения рН, при которых проведено измерение, по оси ординат — логарифмы удельной проводимости мембран

$\lg G$ в $\text{ом}^{-1} \text{см}^{-2}$.

○ — ожог, ● — ожог + α -ТФ 1 мг/кг.

Таким образом, полученные данные свидетельствуют о том, что ожоговая травма приводит к глубоким изменениям в метаболизме веществ или непосредственно входящих в состав структуры мембран (фосфолипиды, α -ТФ), или влияющих на их целостность (липидные перекиси, SH-группы). Эти изменения являются следствием инициирования реакции перекисного окисления липидов. Это окисление инду-

цируется при разложении гидроперекисей, образованных из ненасыщенных жирных кислот фосфолипидов под влиянием супероксидного радикала. Последний образуется в мембранных структурах в присутствии ионов двухвалентного железа [5]. Фонг и соавторы [20] считают, что перекисное окисление липидов может инициироваться в присутствии систем, образующих супероксиданион. По их схеме, супероксидный радикал непосредственно не участвует в инициировании, но он образует перекись водорода и восстанавливает трехвалентное железо, что приводит к появлению гидроксильных радикалов, инициирующих перекисное окисление. Наши исследования показали, что при ожоговой болезни активность супероксиддисмутазы, ответственной за дисмутацию супероксиданиона на перекись водорода и молекулярный кислород, снижается, т. е. это звено защиты клетки от свободных радикалов кислорода истощается себя.

Перекисное окисление находится в прямой зависимости от концентрации гидроперекисей и в обратной от концентрации как тиоловых соединений, так и липидных антиоксидантов [6], в частности α -ТФ [5], фосфолипидов [4]. Из тиоловых соединений важны, с одной стороны, белки (общие SH-группы), а с другой—глутатион, цистеин (не-

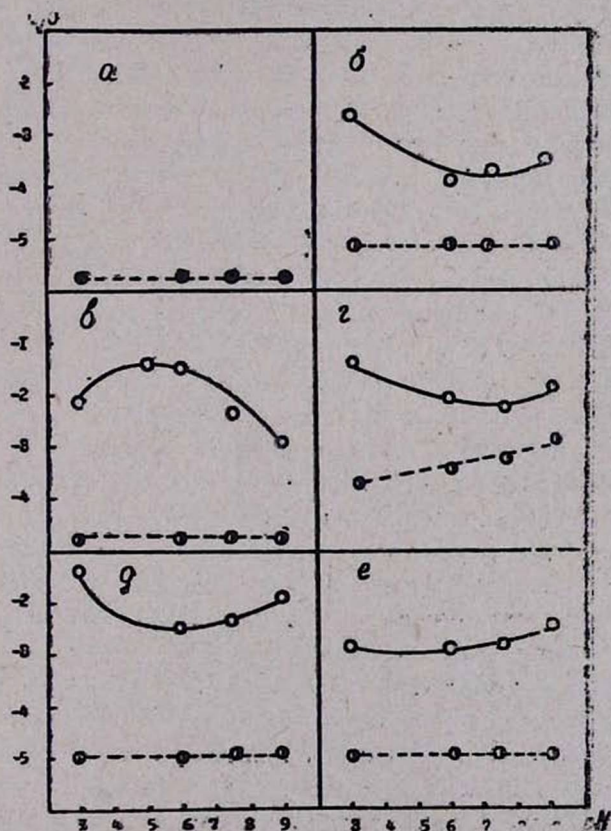


Рис. 10. То же, что на рис. 2, только в растворе 0.1 M CaCl_2 .

белковые SH-группы). Участие SH-групп в реакциях перекисного окисления было показано при Е-авитаминозе. Кроме того, при острой этанольной интоксикации, а также внутрибрюшинном введении ионов Fe^{+2} и аскорбиновой кислоты развивалось перекисное окисление липидов, которое в первом случае сопровождается снижением уровня глутатиона в печени, а во втором — уменьшением количества сульфгидрильных групп на 1 мг белка [6]. Показано, что этанольная интоксикация, сопровождаемая липидной перекисидацией, а также Е-авитаминоз сопровождаются увеличением глутатионпероксидазной и глутатионредуктазной активностей. Именно во взаимодействии с этими ферментами SH-группы составляют защитную систему, регулирующую уровень гидроперекисей в тканях. Значительное усиление перекисного окисления липидов в клетке должно приводить к истощению этой защитной системы, к появлению дефицита ферментов, витаминов, гормонов и различных тиоловых соединений, к повышению проницаемости мембран, в частности митохондриальных, для ионов K^+ и Cl^- [6].

Биологические последствия увеличения проницаемости мембран при ожоговой болезни для различных ионов, в частности для ионов K^+ и Ca^{+2} , должны быть очень значительными, т. к. известно, что, во-первых, основная биоэнергетическая функция митохондрий в клетке как раз и основана на непроницаемости мембран для иона K^+ [14] и, во-вторых, накопление ионов Ca^{+2} в клетке активирует фосфолипазы [5]. Эти механизмы, наряду с непосредственным действием перекисей на мембранные структуры, способствуют гибели клетки.

По данным Диплока и Луци [17], α -ТФ стабилизирует мембранные структуры путем специфического физико-химического взаимодействия между его фитильной боковой цепью и аллильными остатками полиненасыщенных жирных кислот фосфолипидов, особенно производных арахидоновой кислоты. Именно этим механизмом, очевидно, и связывается витамин Е в биологических мембранах, этим и обеспечивается торможение окислительного разрушения полиненасыщенных жирных кислот в клетках и клеточных мембранах, снижение проницаемости биологических фосфолипидных мембран и предупреждение распада фосфолипидов мембран *in vivo* в норме. Показанное при ожоговой болезни снижение содержания витамина Е, связанное, в первую очередь, с липидной перекисидацией, приводит к окислению молекул фосфолипидов, в первую очередь Л и ФЭ. Последние, по мнению Поликара [13], составляют основную часть фосфолипидов мембран. Интересно, что при этом вследствие окисления непредельных жирных кислот фосфолипидов понижается степень их ненасыщенности.

С целью регулирования количественного содержания изученных при ожоговой болезни компонентов животным после ожоговой травмы вводили α -ТФА. Одной группе животных витамин Е вводили в дозе 100 мг/кг веса сразу после травмы и далее ежедневно в течение всего срока исследования.

Показано, что при этом уровень липидной перекисидации резко по-

давляется (рис. 2), α -ТФ, наоборот, усиленно накапливается в печени (рис. 3). Что касается фосфолипидов, то содержание их понижается еще в большей степени, чем от только ожоговой травмы (рис. 4). Эта закономерность обусловлена, в основном, фракциями Л и ФЭ.

Картина, создавшаяся в организме при столь высоких концентрациях α -ТФ, хорошо объяснима с точки зрения данных С. А. Аристарховой и др. [2], согласно которым избыток антиоксидантов активизирует процессы свободнорадикального окисления липидов. Эти процессы, в свою очередь, ускоряют расходование антиоксидантов, чем обеспечивается возможность сохранения антиокислительной активности ткани на стационарном уровне и тем самым поддерживается состояние нормального гомеостаза.

В результате многочисленных исследований удалось установить, что нормализация уровня липидной перекисидации на фоне ожоговой травмы достигается при введении витамина Е в дозе 1 мг/кг веса, причем вводить его следует сразу после травмы, на 3-, 7-, 12-й и 17-й дни (рис. 2). При этом содержание α -ТФ (рис. 3), фосфолипидов (рис. 4), в том числе Л и ФЭ, в целом нормализуется, происходит полная нормализация содержания как общих (рис. 6), так и небелковых (рис. 7) SH-групп. Определенная нормализация отмечается и со стороны активности СОД (рис. 8). Восстанавливается проводимость БФМ (рис. 9, 10).

Полученные нами данные о регулирующем действии α -ТФ на различные биохимические показатели подчеркивают важную мысль о необходимости правильного подбора его дозы. Высокие дозы витамина Е оказывают патогенный эффект, приводят к тяжелым расстройствам со стороны организма. Нормализующее действие оптимальных количеств α -ТФ на процесс липидной перекисидации, содержание антиоксидантов, активность СОД и, наконец, проводимость БФМ при ожоговой болезни связано, очевидно, с антиоксидантной функцией его, с защитой всех компонентов от разрушающего действия перекисного окисления.

Полученные нами экспериментальные данные о положительном влиянии α -ТФ на течение ожоговой болезни позволили рекомендовать его в составе мази при лечении ожоговых ран.

Кафедра биохимии
Ереванского медицинского института

Поступила 20/IX 1977 г.

Մ. Ի. ԱՂԱՋԱՆՈՎ

ԼԻՊԻԴԱՅԻՆ ՊԵՐՕԶՍԻԴԱԿՆԵՐԻ ԵՎ ՄԻ ՇԱՐՔ-ՉԱՎԱՐՔՍԻԴԱԿՆԵՐԻ
ԴԵՐԸ ԱՅՐՎԱԾՔԱՅԻՆ ՀԻՎԱՆԴՈՒԹՅԱՆ ՊԱՌՈՑՆԵՆՋՈՒՄ
ԵՎ α -ՏՈԿՈՖԵՐՈՒԼԻ ԱԶԴԵՑՈՒԹՅՈՒՆԸ ՆՐԱ ԸՆԹԱՑՔԻ ՎՐԱ

Ա Մ Փ Ն Փ Ն Ի Մ

Ցույց է տրված, որ այրվածքների ժամանակ լյարդում ուժեղանում է լիպիդային պերօքսիդացիան, որի հետևանքով պակասում է էնդոգեն α -տոկո-

ֆերուլի և ֆոսֆուլիպիդների (հիմնականում լիցիտինների և էթանոլամինոսֆատիդների) քանակը:

Այրվածքից մեկ օր հետո նկատելի իջնում է ընդհանուր և ոչ սպիտակուցային SH-խմբերի քանակը:

Ճնշվում է սուպերօքսիդի սամուազայի ակտիվությունը: Նշանակալից շափով բարձրանում է երկշերտ ֆոսֆուլիպիդային թաղանթի հաղորդականությունը՝ K^+ և Ca^{+2} իոնների համար:

Այրվածքից հետո, α -տոկոֆերուլի ամենօրյա ներորովայնային ներարկումից (100 մգ/կգ քաշին) ճնշվում է լիպիդային պերօքսիդացիան և մի քանի անգամ շատանում է α -տոկոֆերուլի քանակը հյուսվածքներում: Այդ պայմանում ֆոսֆուլիպիդների քանակը իջնում է ավելի շատ, քան այդ տեղի է ունենում այրվածքի ժամանակ:

α -տոկոֆերուլի (1 մգ/կգ քաշին) կիրառումը այրվածքից անմիջապես հետո և ապա 3, 7, 12 և 17 օրերին կարգավորում է վերը նշված ցուցանիշները և երկարացնում կենդանիների կենսոսնակությունը:

Л И Т Е Р А Т У Р А

1. Андреев А. В., Афанасьев М. И., Чаброва О. Г., Вигдергауз М. С. Успехи химии, 1965, 34, 5, стр. 920.
2. Аристархова С. А., Бурлакова Е. Б., Храпова Н. Г. Липиды в организме животных и человека. М., 1974, стр. 20.
3. Баджиян С. А. Биол. ж. Армении, 1976, 26, 6, стр. 23.
4. Бурлакова Е. Б. В сб.: Витамины, т. 8 (Биохимия витамина Е и селена). Киев, 1975, стр. 37.
5. Владимиров Ю. А., Арчаков А. И. Перекисное окисление липидов в биологических мембранах. М., 1972.
6. Владимиров Ю. А., Оленов В. Н., Суслова Т. Б., Поталенко А. Я. В кн.: Биофизика, т. 5 (Молекулярная патология мембранных структур). М., 1975, стр. 56.
7. Казначеев В. П. Материалы пленума общества патофизиологов. Ереван, 1974, стр. 73.
8. Карагезян К. Г. Лабораторное дело, 1969, I, стр. 23.
9. Карагезян К. Г., Амирханян О. М., Амирханян Д. В. Вопр. мед. химии, 1976, 1, 22, стр. 30.
10. Кочетыгов Н. И. Ожоговая болезнь. Л., 1973.
11. Лемус В. Б., Давыдов В. В. Нервные механизмы и кортикостероиды при ожогах. Л., 1974.
12. Петров И. Р. Хирургия, 1950, 1, стр. 107.
13. Поликар А. Молекулярная цитология мембран животной клетки и ее микроокружение. Новосибирск, 1975.
14. Скулачев В. П. Трансформация энергии в биомембранах. М., 1972.
15. Смирнов А. А., Чирковская Е. В., Манукян К. Г. Биохимия, 1961, 26, стр. 1027.
16. Blery G. G., Anderson A. A. Arch. Biochem. Biophys., 1960, 90, 105.
17. Diploek A. T., Baum H., Lucy J. Biochem. J., 1971, 123, 721.
18. Duggan D. E. Arch. Biochem. Biophys., 1959, 84, 116.
19. Folch C. B., Lees M., Sloane J. H. J. Biol. Chem., 1957, 226, 1, 497.
20. Fong Kuo-Lan, McCay P. B., Poyer G. L., Keele B. B., Misra H. J. Biol. Chem., 1973, 248, 7792.
21. Gallo-Torres H. S., Miller O. N. Inter. J. Vitamin Nahrungsforsth., 1971, 41, 3, 339.
22. Marinetti G. V., Stotz E. Biochem. Biophys. Acta, 1956, 21, 168.
23. Misra H. P., Fridovich J. J. Biol. Chem., 1972, 247, 3170.
24. Misra H. P., Fridovich J. J. Biol. Chem., 1972, 247, 183.
25. Sedlak J., Lindsay K. N. Anal. Biochem., 1968, 25, 192.