

УДК 616—035.4—008.939.155

В. Г. МХИТАРЯН, Г. Е. БАДАЛЯН

ВЛИЯНИЕ ПЕРОКСИДИРОВАННЫХ И
НЕПЕРОКСИДИРОВАННЫХ НЕНАСЫЩЕННЫХ ЖИРНЫХ
КИСЛОТ НА АКТИВНОСТЬ СУПЕРОКСИДДИСМУТАЗЫ

Изучено влияние пероксидированных и непероксидированных ненасыщенных жирных кислот (НЖК) на активность супероксиддисмутазы (СОД) в мозге, печени и крови. Показано, что интенсивность подавления активности СОД зависит как от степени ненасыщенности НЖК, так и от их пероксидированности.

Одним из основных свободных радикалов, возникающих в организме и усиливающих липидную пероксидацию, является супероксидный анион-радикал $^{\circ}\text{O}_2^-$, образующийся при одновалентном восстановлении кислорода. Этот радикал подвергается ферментативной дисмутации супероксиддисмутазой (СОД) с образованием H_2O_2 , которая, в свою очередь, расщепляется каталазой до H_2O и неактивного триплетного кислорода. Супероксидный анион-радикал может подвергаться также и неферментативной дисмутации, однако в этом случае вместо неактивного триплетного кислорода образуется активный—синглетный кислород $^{\circ}\text{O}_2$ [1, 2], обладающий весьма агрессивными свойствами. В связи с этим одной из физиологических функций дисмутаза является ее защитная роль.

Установлено, что не только эндогенная, но и экзогенно введенная СОД оказывает защитное действие при радиационных поражениях [5], поэтому подавление ее активности может привести к накоплению супероксидного анион-радикала, способного инициировать образование липидных перекисей и гидроперекисей [5].

Учитывая вышесказанное, мы задались целью изучить изменения активности СОД в крови, мозге и печени под влиянием некоторых ненасыщенных жирных кислот (НЖК) и продуктов их пероксидации.

Материал и методика

Опыты ставили на белых крысах обоего пола весом 150—200 г. Линолеовую и линоленовую кислоты и продукты их перекисления (перекисное число 3000 мкМ кислорода) вводили в/бр. в количестве 0,1 мл в течение 14 дней. Определение активности СОД производили на 2-, 7- и 13-й день после введения кислот.

Выделение фермента из крови производили следующим образом: кровь после декапитации животных собирали в центрифужную пробир-

ку в количестве 1 мл с одной каплей раствора гепарина и сразу же центрифугировали в течение 10 мин при 10000 об/мин, 2°C. К осадку добавляли 2 мл воды, встряхивали в течение 5 мин, добавляли хлороформ-спиртовую смесь в соотношении 2:1, затем вновь встряхивали в течение 5 мин и центрифугировали 10 мин. К супернатанту добавляли K_2HPO_4 (для расслаивания), оставляли на ночь при 5°C и на следующий день определяли активность СОД, предварительно разбавив супернатант в 5 раз 0,1 М фосфатным буфером, pH 7,4.

Выделение СОД из тканей производили так же, как из крови: навески ткани гомогенизировали в гомогенизаторе Поттер-Эльвейма с 6 мл 0,1 М фосфатным буфером, pH 7,4, в течение 60 сек, после чего центрифугировали 10 мин на центрифуге Janetzki K-24, 10000 об/мин, 2°C. К надосадочной жидкости добавляли хлороформ-спиртовую смесь, встряхивали в течение 5 мин и вновь центрифугировали. Супернатант служил для определения активности СОД.

Инкубационная среда для определения активности фермента содержала Na-пирофосфат-ЭДТА буфера, pH 8,3—1,3 мл; нитротетразолевый синий «Chemopol» 200 мкг/мл—1,0 мл; феназинметосульфат «Fegak» 69 мкг/мл—0,3 мл; 0,0002 М НАДН₂ «Reanal»—2,0 мл и супернатант из печени, крови и мозга по 0,1, 0,2 и 0,4 мл соответственно. Общий объем доводили буферным раствором до 5,0 мл, спектрофотометрировали спустя 10 мин при 535 нм на спектрофотометре «Specol» (ГДР).

Об активности фермента судили по ингибированию генерации супероксидных анионов в присутствии феназинметосульфата, НАДН₂ и нитротетразолевого синего.

За единицу активности СОД принимали такое количество ее раствора, которое подавляло генерацию супероксидного аниона на 50%.

Результаты и обсуждение

Наши исследования показали, что под влиянием НЖК и продуктов их переокисления активность СОД угнетается. Так, уже на 2-й день после затравки крыс перекисидированной линолевой кислотой активность СОД в мозге угнетается на 10,6, в печени—на 6,3%, а в крови остается почти без изменения. С удлинением сроков затравки до 7 дней происходит дальнейшее ее угнетение, причем особенно сильно снижается ее активность в печени (33,2%), затем в мозге (17,4%) и крови (13,7%). Любопытно, что на 14-й день опыта активность фермента в мозге и печени несколько повышается, в то время как в крови она значительно заторможена (48,8%, рис. 1).

При тех же условиях и сроках затравки линоленовая кислота вызывает более значительное угнетение активности СОД. Так, если на 2-й день после введения линолевой кислоты сдвиги в активности фермента сравнительно небольшие, то при введении линоленовой кислоты они более выражены. Как видно из рис. 2, уже на 2-й день после введения линоленовой кислоты активность фермента в печени и мозге понижена на 38,7 и 30,9% соответственно. Хотя удлинение сроков затравки до 7

дней не приводит к дальнейшему значительному угнетению активности фермента, однако она продолжает оставаться значительно подавленной как в печени (40,3%), так и в мозге (30,4%). Дальнейшее удлинение сроков затравки до 14 дней приводит к некоторому повышению активности СОД в мозге и, особенно, в печени, где она остается угнетенной (13,8 и 21% соответственно).

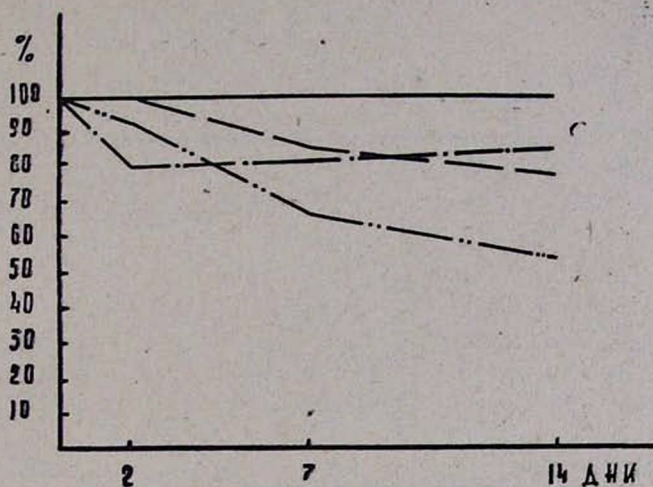


Рис. 1. Изменение активности СОД под действием линолевой кислоты в % по отношению к контролю — контроль, — — — кровь, — · — · — мозг, — · · — печень

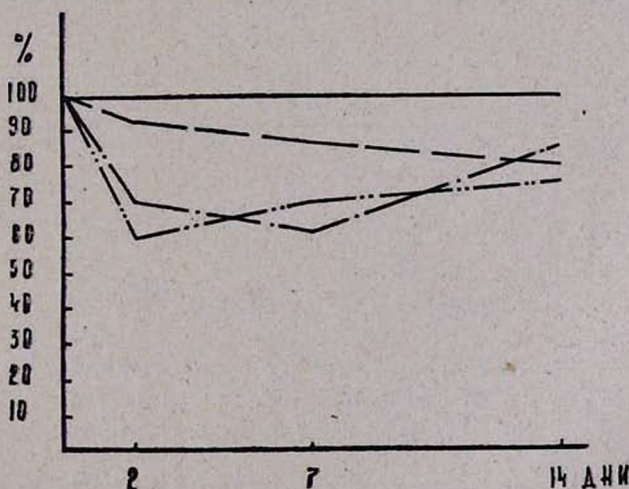


Рис. 2. Изменение активности СОД под действием линоленовой кислоты в % по отношению к контролю — контроль, — — — кровь, — · — · — мозг, — · · — печень

Как видно из рис. 3 и 4, в результате пероксидации линолевой и линоленовой кислот заметно возрастает их ингибирующее действие на

активность СОД. Так, под влиянием перексидированной линолевой кислоты (рис.3) уже на 7-й день затравки активность фермента в мозге и, особенно, печени резко подавлена, между тем как в крови она почти не подвергается изменениям. Интересно отметить, что к 14-му дню затравки активность фермента особенно заметно снижается и в крови, причем к этому сроку активность фермента в печени, мозге и крови угнетена на 65,8, 64,2 и 31,3% соответственно.

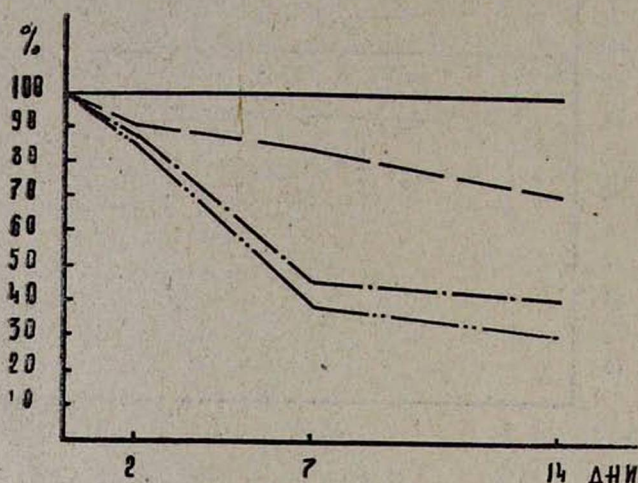


Рис. 3. Изменение активности СОД под действием перекиси линолевой кислоты в % по отношению к контролю — контроль, — кровь, — — — мозг, — · — · — печень

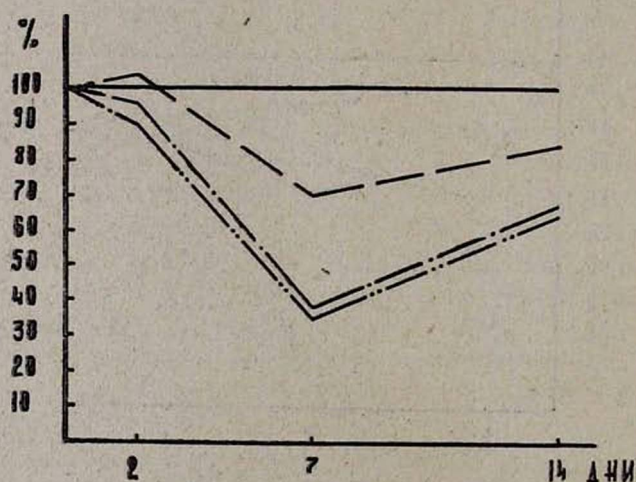


Рис. 4. Изменение активности СОД под действием перекиси линоленовой кислоты — контроль, — — — кровь, — · — · — мозг, — · — · — печень

Несколько иная картина наблюдается при введении перексидированной линоленовой кислоты. Как видно из рис. 4, уже на 7-й день за-

травки активность фермента в печени, мозге и крови ингибирована на 65,8, 64,2, и 31,2% соответственно. Хотя к 14-му дню активность фермента как в печени, так и в мозге заметно повышена, однако она все же продолжает оставаться ниже контрольных цифр на 31,9 в мозге и 35,8% в печени.

Сопоставляя данные, полученные при введении линолевой и линоленовой кислот, можно заметить, что при одинаковых условиях и сроках эксперимента линоленовая кислота угнетает активность СОД значительно сильнее, чем линолевая, причем активность фермента подавляется больше в печени, затем в мозге и крови. Интересно, что эти же кислоты после пероксидации ингибируют СОД намного сильнее. Такое неодинаковое по интенсивности действие на СОД двух НЖК с одинаковым перекисным числом и при равных условиях опыта, видимо, обусловлено некоторыми структурными особенностями НЖК, т.е. количеством двойных связей и возможностью подвергаться цис-транс-изомеризации.

Вышеизложенное дает возможность говорить о наличии определенной корреляции между перекисями НЖК и активностью СОД, которая косвенно подтверждается данными Pederson и Aust [4], установившими угнетение процесса перекисления липидов микросом под действием СОД.

Таким образом, избыточная липидная пероксидация приводит к угнетению активности СОД, способствующей накоплению супероксидного и других радикалов, в том числе HO_2 и синглетного кислорода, которые, будучи весьма агрессивными, видимо, окисляют тиоловые группы или изменяют валентность меди в активном центре фермента и приводят к конформационным изменениям фермента.

Для разрешения этих вопросов нами совместно с Институтом биохимии АН Арм. ССР изучается на очищенном ферменте СОД в опытах *in vitro* влияние некоторых органических перекисей и пероксидированных НЖК на активность фермента.

Кафедра биохимии

Ереванского медицинского института

Поступила 11/VI 1978 г.

Վ. Գ. ՄԻՒՐԱՅԱՆ, Գ. Ե. ԲԱԴԱՏԱՆ

ՊԵՐՕՔՍԻԴԱՑՎԱԾ ԵՎ ՈՉ ՊԵՐՕՔՍԻԴԱՑՎԱԾ ԶԶԱԳԵՑԱԾ
ՀԱՐԱՊԱԹՔՈՒՆԵՐԻ ԱԶԴԵՑՈՒԹՅՈՒՆԸ ՍՈՒՊԵՐՕՔՍԻԴ-
ԴԻՍՄՈՒՏԱԶԱՅԻ ԱԿՏԻՎՈՒԹՅԱՆ ՎՐԱ

Սպիտակ առնետների վրա ուսումնասիրվել է պերօքսիդացված և ոչ պերօքսիդացված լինոլաթթվի և լինոլենաթթվի ազդեցությունը ուղեղի, լյարդի և արյան սուպերօքսիդ-դիսմուտազա ֆերմենտի ակտիվության վրա:

Ցույց է տրված, որ ֆերմենտի ակտիվության արգելակման ինտենսիվությունը կախված է ճարպաթթուների չհագեցվածության և պերօքսիդացման աստիճանից:

THE EFFECT OF PEROXIDATED AND NONPEROXIDATED
UNSATURATED FATTY ACIDS ON SUPEROXIDE DISMUTASE
ACTIVITY

Effect of peroxidated and nonperoxidated linolic and linolenic acids was studied on the superoxide dismutase activity of brain, liver and blood.

Inhibition of enzyme activity was found to depend on the degree of unsaturation and peroxidation of the fatty acids used.

Л И Т Е Р А Т У Р А

1. Khan A. U. Science, 1970, 168, 476.
2. Mayeda E. A., Bard A. J. J. Amer. Chem. Soc. 1974, 96, 4023.
3. Machado E. A., Hamilton F. Experientia, 1973, 29, 951.
4. Pederson T. C., Aust S. D. Biochim. and Biophys. Res. Commun., 1972, 48, 789.
5. Petkan Abram. Int. Conf. Singlet Oxygen and Relat. Species Chem. and Biol. Pinawa, 1977, Abstrs.