

УДК 617—001.17—008.939.155

М. И. АГАДЖАНОВ

ФЕРМЕНТНЫЕ МЕХАНИЗМЫ ЗАЩИТЫ КЛЕТКИ ОТ ИЗБЫТОЧНОЙ ЛИПИДНОЙ ПЕРОКСИДАЦИИ ПОСЛЕ ОЖОГОВОЙ ТРАВМЫ

Показано, что усиление перекисного окисления липидов после ожоговой травмы сопровождается повышением активности глутатионпероксидазы, глюкозо-6-фосфатдегидрогеназы и снижением содержания общих и белковосвязанных тиолов. Введение α -токоферола по 1 мг/кг веса внутривенно сразу после ожога, а затем через 3, 7, 12 дней нормализует уровень изучаемых показателей.

Нашими предыдущими исследованиями было показано [8], что в патогенезе ожоговой травмы определенную роль играют липидные перекиси. Являясь агрессивными соединениями [3], они вызывают в организме глубокие нарушения, выражающиеся в уменьшении содержания фосфолипидов, изменении жирнокислотного состава их в сторону понижения содержания ненасыщенных кислот, уменьшении количества тканевых антиоксидантов, в первую очередь α -токоферола [1]. Все это приводит к резким нарушениям проницаемости клеточных мембран [2]. Помимо перекисного окисления липидов, указанные сдвиги могут быть в значительной степени обусловлены образованием супероксиданиона, активного радикала кислорода, ферментативная дисмутация которого приводит к образованию не менее токсичного синглетного кислорода. В норме это звено регулируется супероксиддисмутазой, осуществляющей ферментативную дисмутацию супероксида. Ожоговая травма приводит к подавлению активности этого фермента.

Важным звеном защиты клетки от токсического действия липидных перекисей является глутатионпероксидазная система. Было показано, что функция глутатионпероксидазы состоит в восстановлении образовавшихся перекисей из ненасыщенных жирных кислот фосфолипидов в мембранах субклеточных органелл. Установлено, что гидроперекиси полиненасыщенных жирных кислот восстанавливаются глутатионпероксидазой до гидроксипроизводных. Исходя из того, что глутатионпероксидазная система подавляет образование малонового диальдегида в препаратах микросом и митохондрий в условиях, способствующих перекисидации липидов мембран, высказывалось мнение, что ингибирование осуществляется за счет превращения гидроперекисей липидов, яв-

ляющихся предшественником малонового диальдегида, в гидроксикислоты.

Однако Mc Cay и др. [12] на основании экспериментального материала пришли к выводу, что защитное действие глутатионпероксидазы не связано с восстановлением гидроперекисей липидов до гидроксипроизводных. Авторы полагают, что основная биологическая функция этой системы состоит в предотвращении инициации перекисного окисления в липидах мембран, а также в ингибировании образования гидроксильного радикала в НАДН-оксидазной системе.

Глутатионпероксидазная реакция приводит к окислению глутатиона ($G-SH$) с последующим восстановлением его глутатионредуктазой. При этом степень восстановленности глутатиона зависит от активности обоих ферментов, а также от концентрации тиолов, известных своими антиоксидантными свойствами [3]. Учитывая, что содержание небелковых тиолов в организме низкое и существенно не влияет на степень восстановленности глутатиона, интерес представляет содержание связанных с белками SH -групп [12].

Важное значение для функционирования этой системы имеет степень восстановленности НАДФ⁺, зависящая от состояния глюкозо-6-фосфатдегидрогеназной ($G-6-ФД$) реакции [13].

Таким образом, представляло интерес после ожоговой травмы изучить в организме, в частности в мозге и печени, активность ферментов глутатионпероксидазы, глутатионредуктазы, $G-6-ФД$, а также содержание тиоловых групп.

Методы исследований

Опыты ставили на белых крысах-самках весом 130—160 г. Ожоги III степени вызывали по описанной выше методике [1]. Части животных вводили внутривенно витамин Е по 1 мг/кг веса сразу после ожога, а затем через 3, 7 и 12 дней. Исследования проводили через 1 час, 1, 3, 7 и 15 дней после травмы.

Активность глутатионпероксидазы и глутатионредуктазы определяли по Pinto, Bartley [13]. Животных декапитировали, мозг и печень быстро извлекали, охлаждали в ледяном 0,154 М растворе KCl . Мозг освобождали от макроскопически видимых сосудов и оболочек. Печень перфузировали ледяным 0,154 М раствором KCl до светло-оливкового цвета. Готовили 10% гомогенат на 0,154 М KCl , куда добавляли тритон X-100 (конечная концентрация 0,1%). Активность глутатионредуктазы (КФ 1. 6. 4. 2) определяли по изменению скорости окисления НАДФН в супернатанте, полученном после центрифугирования первоначального 10% гомогената при 15000 г в течение 15 мин. Реакционная смесь содержала 2,5 мл 50 мМ К-фосфатного буфера, 0,1 мл 25 мМ ЭДТА, 0,2 мл 2,4 мМ НАДФН, 0,1 мл супернатанта. В опытную пробу дополнительно вносили 0,2 мл 16,2 мМ окисленного глутатиона. Измеряли падение оптической плотности смеси на саморегистрирующем

спектрофотометре «Спекорд» (ГДР), волновое число 29400 (340 нм), в течение 1—2 мин. Активность фермента выражали количеством *мкмоль* НАДФН, окисленного за 1 мин на 1 мг белка.

Об активности глутатионпероксидазы (КФ 1. 11. 1. 9) судили по разнице между количеством свободного восстановленного глутатиона в контрольной и опытной пробах. Активность фермента определяли в смеси следующего состава: 3 мл в 2 раза разведенного исходного гомогената, 0,5 мл К-фосфатного буфера (рН 7,4), 0,1 мл 0,25 мМ ЭДТА, 0,1 мл 0,4 М азида натрия, 0,2 мл 50 мМ Г—SH; инкубировали 10 мин при 30°, после чего добавляли 0,1 мл 50 мМ H₂O₂ и через 10 сек реакцию останавливали 1 мл 10% метафосфорной кислоты. Инкубированную смесь центрифугировали и в центрифуге определяли количество свободного глутатиона. Об активности фермента судили по разнице между количеством свободного восстановленного глутатиона в контрольной (без H₂O₂) и опытной пробах. Глутатион определяли по количеству SH-групп по Sedlak, Lindsay (по [4]). Активность фермента выражали количеством *мкмоль* SH-групп, окисленных за 1 мин на 1 мг белка. Белок определяли по Lowry и др. [11].

Количество эндогенных SH-групп определяли по Sedlak, Lindsay по образующемуся окрашиванию с 5,5-дитиобис (2-нитробензойная кислота) (ДТНБ), интенсивность которого определяли при 412 нм. В холодных условиях готовили 2,5% гомогенат ткани на 0,02 М ЭДТА—Na₂. Общие SH-группы (O-SH) определяли в реакционной смеси, содержащей 1,5 мл 0,2 М трис-HCl буфера (рН 8,2), 0,1 мл 0,01 М ДТНБ, 7,9 мл абсолютного метанола, 0,5 мл супернатанта. Небелковые SH-группы (НБ—SH) определяли в смеси, содержащей 4 мл 0,2 М трис-HCl буфера (рН 8,9), 0,1 М ДТНБ, 2 мл супернатанта, полученного после депротенинизации. По разнице между количеством O-SH и НБ—SH определяли число связанных с белками SH-групп (БС—SH). Количество SH-групп выражали в *ммоль/100 г* ткани.

Активность Г-6-ФД (КФ 1.1.1.49) определяли спектрофотометрическим методом по Glock, Mc Lean [10]. Печень перфузировали холодным 0,15 М раствором KCl (рН 7,0). 5% гомогенат на 0,15 М KCl центрифугировали при 20000 g в течение 60 мин. Надосадочную жидкость диализовали при 1±2° в той же среде в течение 24 часов. Активность фермента определяли в реакционной смеси, содержавшей 1,15 мл глицил-глицинового буфера (рН 7,6), 0,5 мл 0,1 М MgCl₂, 0,25 мл 0,05 М глюкозо-6-фосфата, 0,5 мл 0,15 М НАДФ и 0,1 мл диализата. Экстинкцию определяли при 340 нм. За единицу активности Г-6-ФД принимали то его количество, которое редуцирует 0,01 *мкмоль* НАДФ за 1 мин на 1 мг белка.

Результаты и обсуждение

Полученные данные об активности глутатионпероксидазы (табл. 1) в органах интактных крыс совпадают с данными, приводимыми В. З.

Ланкиным и С. М. Гуревич [7]. Что касается глутатионредуктазы (табл. 2), то наши данные об активности фермента в печени соответствуют результатам, приводимым в литературе [4, 9] и несколько превышают их в мозге. Содержание как общих, так и небелковых SH-групп в органах интактных животных также соответствует литературным данным [4, 9].

Таблица 1

Влияние α -токоферола на активность глутатионпероксидазы в мозге и печени крыс после ожоговой травмы в μ моль SH-групп /мг белка/ мин ($M \pm m$)

Орган	Условия опыта	Через 1 час	Через 1 день	Через 3 дня	Через 7 дней	Через 15 дней
Мозг	контроль	$1,54 \pm 0,08$				
	ожог Р	$4,26 \pm 0,69$ <0,001	$3,11 \pm 0,08$ <0,001	$4,71 \pm 0,40$ <0,001	$2,14 \pm 0,06$ <0,001	$1,46 \pm 0,11$ >0,05
Печень	ожог + α -токоферол Р	$3,97 \pm 0,19$ >0,05	$2,72 \pm 0,25$ >0,05	$6,66 \pm 0,23$ <0,001	$1,59 \pm 0,06$ <0,001	$1,41 \pm 0,12$ >0,05
	контроль	$3,38 \pm 0,13$				
Печень	ожог Р	$3,16 \pm 0,27$ >0,05	$5,93 \pm 0,11$ <0,001	$4,66 \pm 0,13$ <0,001	$1,54 \pm 0,13$ <0,001	$2,36 \pm 0,28$ <0,001
	ожог + α -токоферол Р	$3,36 \pm 0,34$ >0,05	$3,03 \pm 0,11$ <0,001	$3,52 \pm 0,06$ <0,001	$1,59 \pm 0,02$ >0,05	$1,54 \pm 0,31$ <0,005

Показано, что ожоговая травма приводит к определенным изменениям в состоянии изучаемых показателей. Как видно из табл. 1, активность глутатионпероксидазы в мозге через 1 час после травмы повышается в 2, 5—3 раза, остается на высоком уровне в течение 1 и 3 дней и нормализуется к 15-му дню. В печени активность фермента повышается не сразу, однако через 1 день она выше исходного уровня приблизительно в 2 раза, в течение 3 дней остается на высоком уровне, а в дальнейшем становится даже ниже нормы.

Значительные изменения происходят после ожоговой травмы с глутатионредуктазой (табл. 2). Как в печени, так и в мозге через 1 час и 1 день после травмы активность фермента повышается, в дальнейшем она снижается и колеблется в пределах нормы.

Определенные изменения после ожоговой травмы происходят и в содержании SH-групп (табл. 3). При этом содержание BC—SH в мозге через 1 час и 1 день понижается, в течение последующих 3 дней нормализуется, а в дальнейшем, наоборот, повышается. Подобные изменения происходят и в печени. Содержание NB—SH как в мозге, так и в печени изменяется незначительно.

Интересные изменения происходят с Г-6-ФД (табл. 4). Во все сроки после ожоговой травмы активность ее повышается, причем максимально через 1 час и через 7 дней (в 2 раза). Аналогичные данные были получены в лаборатории Р. И. Лифшица [5], где было, однако, показано, что стойкое повышение уровня глюкозо-6-фосфат-

дегидрогеназной реакции сопровождается резким снижением величины соотношения НАДФН/НАДФ⁺. Именно это соотношение является фактором, регулирующим интенсивность ферментативных реакций окислительной фазы пентозного цикла.

Таблица 2

Влияние α -токоферола на активность глутатионредуктазы в мозге и печени крыс после ожоговой травмы в мкмоль НАДФН/мг белка/мин ($M \pm m$)

Орган	Условия опыта	Через 1 час	Через 1 день	Через 3 дня	Через 7 дней	Через 15 дней
Мозг	контроль ожог Р	0,031±0,004 0,075±0,008 <0,001	0,088±0,012 <0,001	0,031±0,002 >0,05	0,031±0,003 >0,05	0,034±0,004 >0,05
	ожог+ α -токоферол Р	0,046±0,006 <0,02	0,044±0,004 <0,001	0,053±0,005 <0,002	0,037±0,001 >0,05	0,057±0,011 >0,05
Печень	контроль ожог Р	0,041±0,002 0,162±0,017 <0,001	0,054±0,002 <0,002	0,031±0,002 >0,05	0,043±0,003 >0,05	0,034±0,006 >0,05
	ожог+ α -токоферол Р	0,093±0,006 <0,001	0,032±0,001 <0,001	0,019±0,001 <0,001	0,046±0,006 >0,05	0,04±0,004 >0,05

Таким образом, усиление перекисного окисления липидов после ожоговой травмы [8], особенно выраженное в течение первого периода ожоговой болезни, вызывает соответствующее повышение активности глутатионпероксидазы, которое сопровождается снижением содержания восстановленных тиолов. Увеличение содержания дисульфидов, в том числе окисленного глутатиона, способствует повышению активности глутатионредуктазы [13], вследствие чего возрастает концентрация НАДФ⁺. Последнее служит пусковым моментом для Г-6-ФД реакции.

Взаимная корреляция изучаемых показателей в зависимости от срока ожоговой травмы представлена на рис. 1.

Полученные данные свидетельствуют о том, что активация глутатионпероксидазной системы после ожоговой травмы направлена на защиту клетки от токсического действия липидных перекисей и, главным образом, на поддержание структурной и функциональной целостности клеточных мембран. Введение витамина Е по 1 мг/кг веса вызывает если не полную, то явно выраженную нормализацию показателей (табл. 1—4), в частности понижение активности изучаемых ферментов, увеличение содержания О—SH, в том числе и BC—SH, что происходит на фоне одновременной нормализации уровня перекисного окисления липидов в тканях [1]. Такое влияние α -токоферола на активность глутатионпероксидазы связано, очевидно, со снижением степени окисления глутатиона, что является, возможно, функцией концентрации гидроперекисей [13]. С другой стороны, известно, что глутатионпероксидаза является селеноэнзимом [14]. Возможно, что защитное действие α -токоферола осуществляется не путем

Влияние α -токоферола на содержание общих (O—SH), небелковых (НБ—SH) и белковосвязанных (БС—SH) тиоловых групп в мозге и печени крыс после ожоговой травмы в ммоль/100 г ткани ($M \pm m$)

Орган	Условия опыта	Вид SH-гр.	Через 1 час	Через 1 день	Через 3 дня	Через 7 дней	Через 15 дней
Мозг	контроль	O—SH	1,02±0,019				
		НБ—SH	0,21±0,012				
		БС—SH	0,81				
	ожог	O—SH	0,88±0,035	0,93±0,013	1,06±0,025	1,14±0,011	1,30±0,019
		P	<0,001	<0,002	>0,05	<0,001	<0,001
		НБ—SH	0,18±0,008	0,19±0,039	0,21±0,002	0,24±0,002	0,25±0,007
		P	>0,05	>0,05	>0,05	>0,05	<0,01
		БС—SH	0,70	0,74	0,85	0,90	1,05
	+ α -токоферол	O—SH	0,97±0,015	0,99±0,017	1,03±0,015	1,01±0,025	1,03±0,014
		P	<0,05	<0,01	>0,05	<0,001	<0,001
		НБ—SH	0,21±0,005	0,21±0,001	0,21±0,006	0,22±0,007	0,21±0,009
P		<0,01	<0,05	>0,05	>0,05	<0,001	
БС—SH		0,76	0,78	0,82	0,79	0,82	
Печень	контроль	O—SH	1,53±0,025				
		НБ—SH	0,25±0,06				
		БС—SH	1,28				
	ожог	O—SH	0,96±0,37	1,21±0,011	1,25±0,012	1,69±0,027	1,72±0,053
		P	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001
		НБ—SH	0,16±0,005	0,22±0,005	0,22±0,067	0,23±0,005	0,26±0,091
		P	<0,001	>0,05	>0,05	>0,05	>0,05
		БС—SH	0,80	0,99	1,03	1,46	1,46
	+ α -токоферол	O—SH	1,34±0,035	1,31±0,071	1,45±0,029	1,52±0,034	1,50±0,055
		P	<0,001	>0,05	<0,001	<0,001	<0,01
		НБ—SH	0,23±0,003	0,24±0,005	0,23±0,005	0,24±0,003	0,24±0,054
P		<0,001	>0,05	>0,05	>0,05	>0,05	
БС—SH		1,11	1,07	1,22	1,28	1,26	

его непосредственного воздействия, а через селен путем предохранения его от окисления.

Представленные данные в определенной степени объясняют механизм показанного нами нормализующего действия α -токоферола на

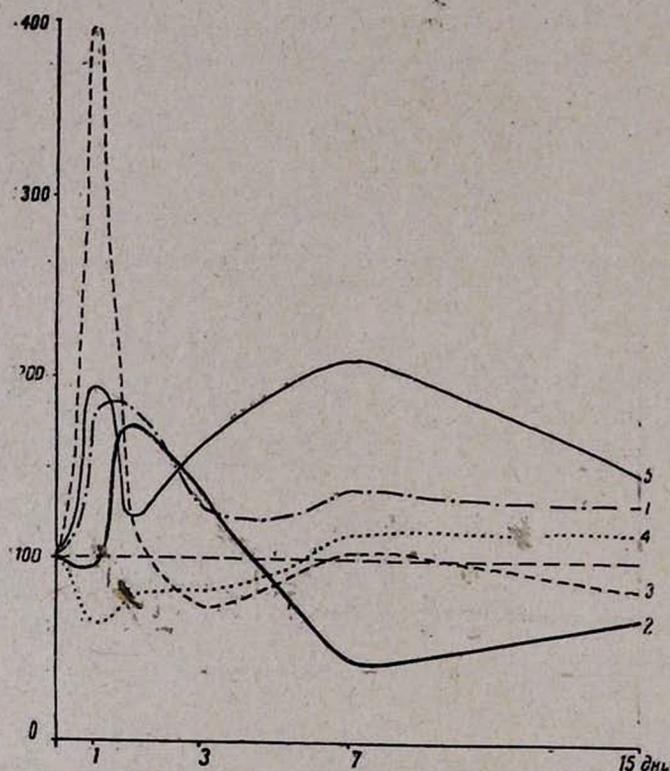


Рис. 1. Соотношение перекисного окисления липидов (1), активности глутатионпероксидазы (2), глутатионредуктазы (3), глюкозо-6-фосфатдегидрогеназы (5), содержания белковосвязанных SH-групп (4) в печени крыс при ожоговой болезни (%).

Таблица 4

Влияние α -токоферола на активность Г-6-ФД в печени крыс после ожоговой травмы в $\mu\text{кмоль} \cdot 10^{-2}$ НАДФН/мг белка/мин ($M \pm m$)

Условия	Через 1 час	Через 1 день	Через 3 дня	Через 7 дней	Через 15 дней
Контроль	$0,66 \pm 0,02$				
Ожог	$1,28 \pm 0,03$	$0,80 \pm 0,02$	$1,07 \pm 0,09$	$1,39 \pm 0,09$	$0,95 \pm 0,01$
P	$<0,001$	$<0,001$	$<0,001$	$<0,001$	$<0,001$
Ожог + α -токоферол	$0,85 \pm 0,02$	$0,65 \pm 0,02$	$0,65 \pm 0,006$	$0,83 \pm 0,01$	$0,88 \pm 0,01$
P	$<0,001$	$<0,001$	$<0,001$	$<0,001$	$<0,001$

уровень липидной пероксидации, что в конечном итоге приводит к упорядочиванию содержания эндогенного α -токоферола, фосфолипидов

состояния мембранной проницаемости. Эти данные еще раз подтверждают выдвинутое нами положение о необходимости применения витамина Е, а также и других антиоксидантов, в комплексной терапии ожоговой травмы.

Кафедра биохимии Ереванского
медицинского института

Поступила 20/IX 1978 г.

Մ. Ի. ԱԳԱԶՅԱՆՈՎ

ԱՅՐՎԱԾՔԱՅԻՆ ՎՆԱՍՎԱԾՔԻՑ ՀԵՏՈ ԲՁՋԻ ԼԻՊԻԴՆԵՐԻ
ՀԱՎԵԼՅԱԼ ՊԵՐՕՔՍԻԴԱՑՈՒՄԻՑ ՊԱՇՏՊԱՆՎԵԼՈՒ
ՖԵՐՄԵՆՏԱՏԻՎ ՄԵԽԱՆԻԶՄՆԵՐԸ

Յույց է տրված, որ այրվածքային վնասվածքից հետո լիպիդների պերօքսիդացման ուժեղացումը ուղեկցվում է գլուտատին-պերօքսիդացիայի, գլուտատին-ռեդուկտայի, գլյուկոզա-6-ֆոսֆատդեհիդրոգենազայի ակտիվության բարձրացմամբ և ընդհանուր ու սպիտակուցների թիրախին խմբերի պարունակության նվազմամբ:

α -տոկոֆերոլի ներորոշանային ներարկումից (1 մգ/կգ քաշին), ինչպես այրվածքից անմիջապես հետո, այնպես էլ 3, 7, 12 օր անց, վերը նշված ցուցանիշները կարգավորվում են:

М. И. АГХАДЖАНОВ

ENZYMATIC MECHANISMS OF CELL PROTECTION FROM EXCESS
LIPID PEROXIDATION INDUCED BY BURNS

Intensification of peroxide oxidation of lipids following burns has been shown to be accompanied by an increase of glutathionperoxidase, glutathionreductase and glucose-6-phosphatdehydrogenase activities and reduction of total and protein-bound thiols.

Intraperitoneal administrations of α -tocopherol 1 mg/kg immediately after burns and following 3, 7 and 12 days normalize the level of the ingredients studied.

Л И Т Е Р А Т У Р А

1. Агаджанов М. И. Ж. экспер. и клинич. мед. АН Арм. ССР, 1977, 5, стр. 68.
2. Агаджанов М. И., Баджиян С. А., Карагезян К. Г., Мхитарян В. Г. Доклады АН СССР, 1979, 244, 6, стр. 1496.
3. Владимиров Ю. А., Арчаков А. И. Перекисное окисление липидов в биологических мембранах. М., 1972.
4. Герасимов А. М., Королева Л. А., Бруссов О. С., Олферьев А. М., Антюенков В. Д., Панченко Л. Ф. Вопр. мед. химии. Л., 1976, стр. 89.

5. Камиллов Ф. Х., Ефименко Г. П., Якушев В. С. и др. В сб.: Метаболические основы острой ожоговой токсемии. Под ред. Р. И. Лифшица. Омск, 1977, стр. 25.
6. Комисаренко В. П., Челнокова И. С., Микоша А. С. Проблемы эндокринологии, 1978, 24, 1, стр. 95.
7. Ланкин В. З., Гуревич С. М. Доклады АН СССР, 1976, 226, 3, стр. 705.
8. Мхитарян В. Г., Агаджанов М. И., Мелик-Агаян Е. А. Ж. exper. и клинич. медицины АН Арм. ССР, 1975, 15, 1, стр. 3.
9. Титов А. В., Голубенцев Д. А. Вopr. мед. химии, 1971, 17, 1, стр. 61.
10. Glock G. F., McLean P. Biochem. J., 1953, 55, 3, 400.
11. Lowry O. H., Rosenbrough N. G., Farr A. L., Randall R. S. J. Biol. Chem., 1951, 193, 256.
12. McCay P. B., Gibson D. D., Fong K. L., Hornbrook K. R. Biochem. Biophys. Acta, 1976, 431, 459.
13. Pinto R. E., Bartley W. Biochem, J., 1969, 112, 109.
14. Rotruck G. T., Pope A. L. et al. Science, 1973, 179, 588.