

УДК 612.397.8.015.3

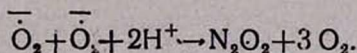
Э. М. МИКАЕЛЯН, М. М. МЕЛКОНЯН, Е. А. МЕЛИК-АГАЕВА,
В. Г. МХИТАРЯН

ВЗАИМООТНОШЕНИЕ ЛИПИДНОЙ ПЕРОКСИДАЦИИ И ФЕРМЕНТНЫХ СИСТЕМ АНТИРАДИКАЛЬНОЙ ЗАЩИТЫ КЛЕТКИ ПРИ ИММОБИЛИЗАЦИОННОМ СТРЕССЕ

Установлено, что при иммобилизационном стрессе наряду с интенсификацией липидной пероксидации происходит значительное повышение активности ферментной системы (глутатионпероксидазы—глутатионредуктазы), детоксицирующей липоперекиси. Активность супероксиддисмутазы в тех же условиях в основном ингибирована, что указывает на усиление липидной пероксидации на стадии образования супероксидного радикала.

Ранее нами была установлена интенсификация процессов перекисного окисления липидов при иммобилизационном стрессе (ИМО) [5] с одновременным ростом в тканях уровня биоантиоксиданта витамина Е [4].

В нормально функционирующей клетке количество липидных перекисей чрезвычайно мало в результате наличия чувствительных механизмов его регуляции. В регуляции обмена липоперекисей важную роль играют ферментные системы антирадикальной защиты клетки — супероксиддисмутаза (СОД), глутатионредуктаза и глутатионпероксидаза. Супероксиддисмутаза ингибирует липидную пероксидацию на стадии активации кислорода, катализируя дисмутацию супероксидных анионов в перекись водорода и триpletный кислород [3]

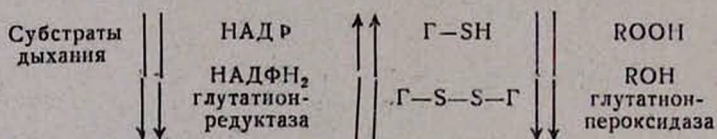


Супероксидный анион возникает в целом ряде биохимических реакций: в процессах гидроксирования ароматических соединений, при окислении оксигемоглобина в метгемоглобин, при окислении тиолов и т. д. Неферментативная дисмутация супероксидного аниона приводит к образованию синглетного кислорода, который инициирует свободнорадикальное окисление ненасыщенных жирных кислот фосфолипидов мембран с образованием гидроперекисей.

Глутатионпероксидаза и глутатионредуктаза регулируют интенсивность процесса липидной пероксидации на стадии утилизации гидро-

перекисей ненасыщенных жирных кислот в соответствующие оксикислоты [2].

Между указанными ферментами имеется тесная функциональная связь. Для работы глутатионпероксидазы в качестве субстрата необходим восстановленный глутатион, который является продуктом глутатионредуктазной реакции. Поэтому частично очищенные ферментные препараты глутатионпероксидазы всегда содержат примеси глутатионредуктазы. Последовательность действия ферментной системы глутатионпероксидазы—глутатионредуктазы можно представить в виде следующей схемы [1].



Исходя из вышесказанного, представляет определенный интерес изучить при иммобилизационном стрессе и в постстрессовый период в динамике активность ферментных систем, ингибирующих пероксидацию липидов и детоксицирующих липоперекиси.

Материал и методика

Опыты проводили на белых крысах-самцах весом 150—200 г. В качестве модели дозированного стресса была использована иммобилизация. Животных иммобилизовали фиксацией головы и конечностей ежедневно в течение 150 мин. Число ИМО—от одной до семи. Для освобождения от эритроцитов, имеющих высокую активность исследуемых ферментов, ткани тщательно перфузировали охлажденным 0,15 М КСl. Все операции проводили на холоду при 4°. Активность СОД определяли по ингибированию генерации супероксидных анионов в модели феназинметасульфат—НАДН—нитротетразолий синий [5]. За единицу активности СОД принимали количество фермента, необходимое для подавления восстановления нитротетразолия на 50% в условиях определения. Расчет единиц активности ферментов производили на мг белка гомогената. Содержание белка в гомогенатах определяли по методу Лоури [7]. Для определения активности глутатионпероксидазы и глутатионредуктазы ткань гомогенизировали в 0,154 М КСl. 10% гомогенат обрабатывали тритоном X-100 с конечной концентрацией 0,1%. Активность глутатионпероксидазы и глутатионредуктазы определяли по методу Pinto and Bartley [8].

Глутатионпероксидазную активность определяли по количеству свободного глутатиона, окисленного в процессе аэробной инкубации. Инкубацию проводили на аппарате Варбурга при температуре 30°. Инкубационная смесь содержала 3 мл 5% гомогената ткани, 0,2 мл 50 ммоль раствора восстановленного глутатиона (Г-SH), 0,1 мл

25 ммоль раствора ЭДТА, 0,1 мл 0,4 М раствора азиды натрия, 0,5 мл 0,25 М К-фосфатного буфера. После 10-минутной инкубации в инкубационную смесь добавляли 0,1 мл 10% метафосфорной кислоты. Смесь центрифугировали, в центрифугате определяли количество восстановленного глутатиона. Об активности фермента судили по разнице между количеством восстановленного глутатиона в контрольной пробе (без

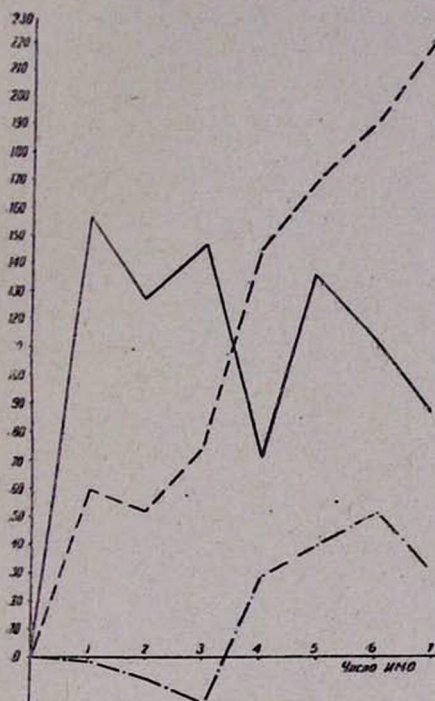


Рис. 1

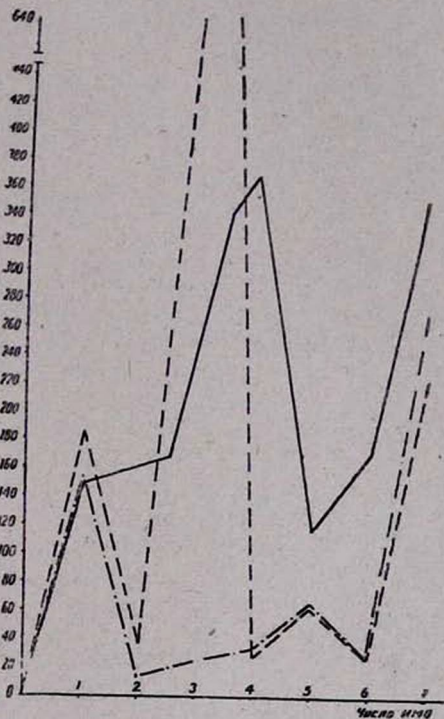


Рис. 2

Рис. 1. Изменение активности глутатионпероксидазы при иммобилизационном стрессе в процентах по отношению к контролю.

Условные обозначения:

— сердце
 --- мозг
 - · - · - печень.

Рис. 2. Изменение активности глутатионредуктазы при иммобилизационном стрессе в процентах по отношению к контролю. Условные обозначения те же.

H_2O_2) и в опытной (с H_2O_2). Содержание глутатиона определяли по Sedlak and Lindsay [9] по цветной реакции тиоловых групп с 5,5-дитио-бис-2-нитробензойной кислотой—препарат фирмы «Sigma» (США) при 412 нм. Экстинкцию измеряли на спектрофотометре «Спектромом-203» (ВНР). Активность фермента выражали количеством μ ммоль восстановленного глутатиона, окисленного за 1 мин на 1 мг белка.

Активность глутатионредуктазы определяли по изменению скорости окисления НАДФН в супернатанте, полученном после центрифугирования первоначального 10% гомогената при 15000 g в течение 15 мин. Реакционная смесь содержала 2,5 мл 50 ммоль К-фосфатного буфера, 0,1 мл супернатанта. В опытную пробу дополнительно вносили 0,2 мл 16,2 ммоль окисленного глутатиона (GS-SG). Падение оптической плотности смеси измеряли на саморегистрирующем спектрофотометре «Спекорд» (ГДР) на волновом числе 29400/340 нм в течение 1—2 мин. Активность фермента выражали количеством ммоль НАДФН, окисленного за 1 мин на 1 мг белка.

Результаты и обсуждение

Установлено, что при ИМО синхронно росту концентрации липидных перекисей в тканях увеличивается активность детоксицирующих их ферментов-глутатионпероксидазы и глутатионредуктазы (рис. 1 и 2).

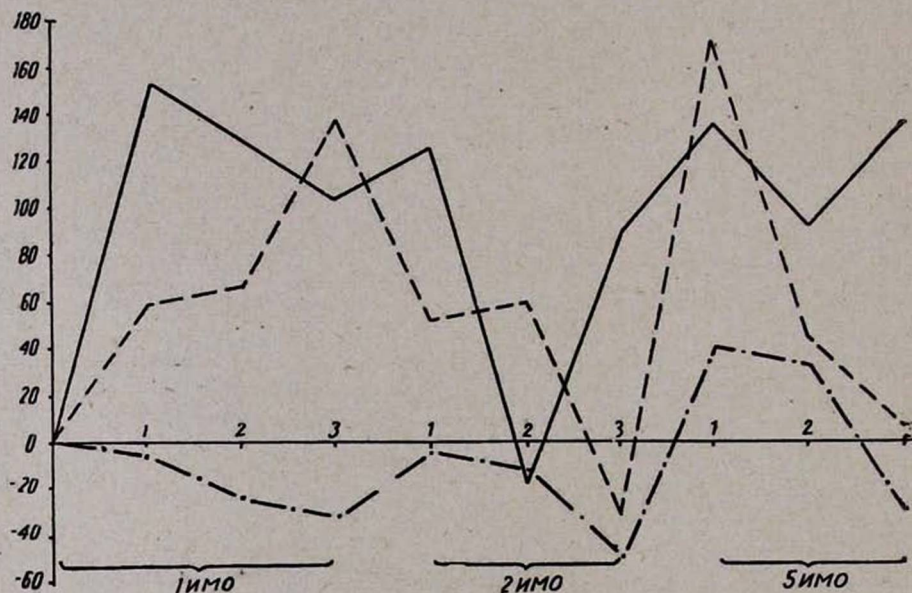


Рис. 3. Активность глутатионпероксидазы в постстрессовый период в процентах по отношению к контролю. Условное обозначение, как на рис. 1.

Аналогичная зависимость была установлена также другими исследователями при злокачественном росте и при гипероксии [2, 10]. В качестве возможного механизма активации ферментной системы предполагается индукция их синтеза вследствие увеличения содержания субстрата липоперекисей [2].

Изучение характера изменения активности ферментов глутатионпероксидазы—глутатионредуктазы при иммобилизационном стрессе показывает, что высказанное предположение правомерно для печени и в некоторой степени для сердца, где активность нарастает постепенно по мере удлинения срока ИМО. Однако в мозге субстратное активирование ферментов происходит, по-видимому, по типу срочной регуляции: активность резко возрастает уже при первой иммобилизации, оставаясь примерно на том же уровне во все последующие сроки (рис. 1 и 2).

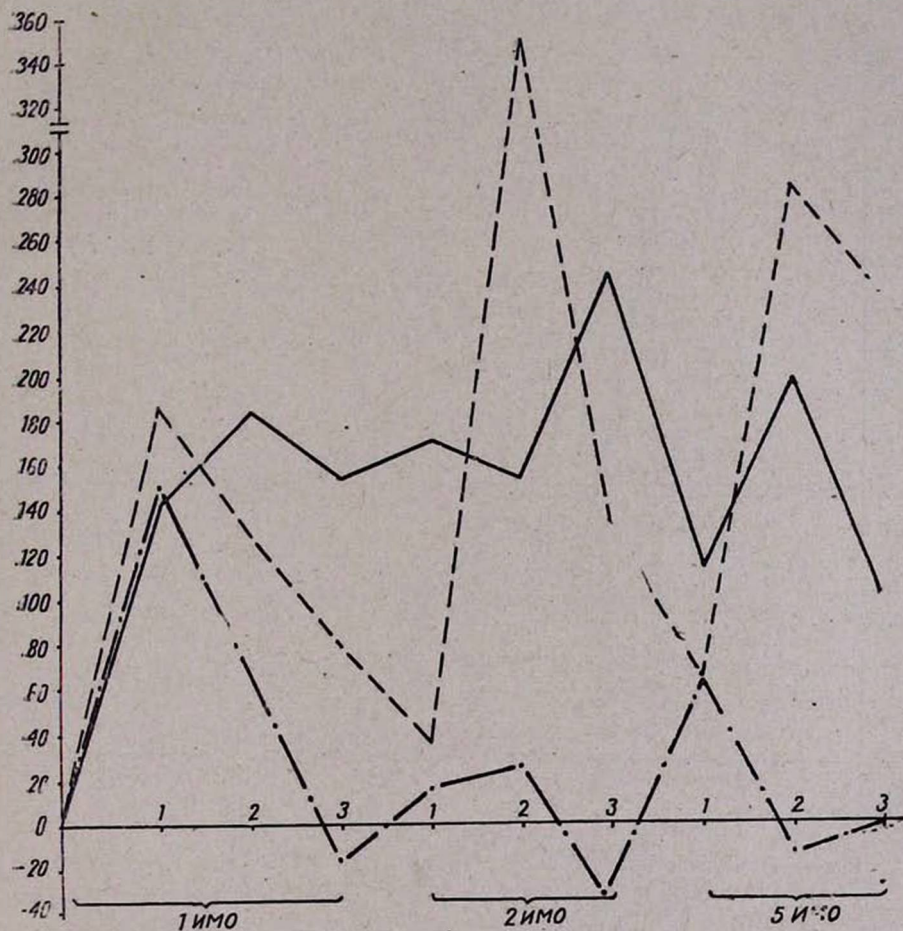


Рис. 4. Изменение активности глутатионредуктазы в постстрессовый период в процентах по отношению к контролю. Условные обозначения, как на рис. 3.

Некоторое различие в интенсивности сдвигов активности глутатионпероксидазы в различных органах (сердце, мозг и печень, рис. 1) объясняется также разным набором изоферментов. Для сердца характерна только селен-зависимая глутатионпероксидаза, а в мозге и печени при-

сутствуют оба изофермента—селен-зависимая и селен-независимая, причем процентное соотношение указанных изоферментов в разных органах неодинаково [6].

Одновременно нами было изучено изменение активности системы глутатионпероксидазы—глутатионредуктазы в постстрессовый период. Животных иммобилизовали один, два и пять раз. Определение активности ферментов производили тут же после иммобилизации, а также спустя 24 и 48 часов. Полученные результаты представлены на рис. 3

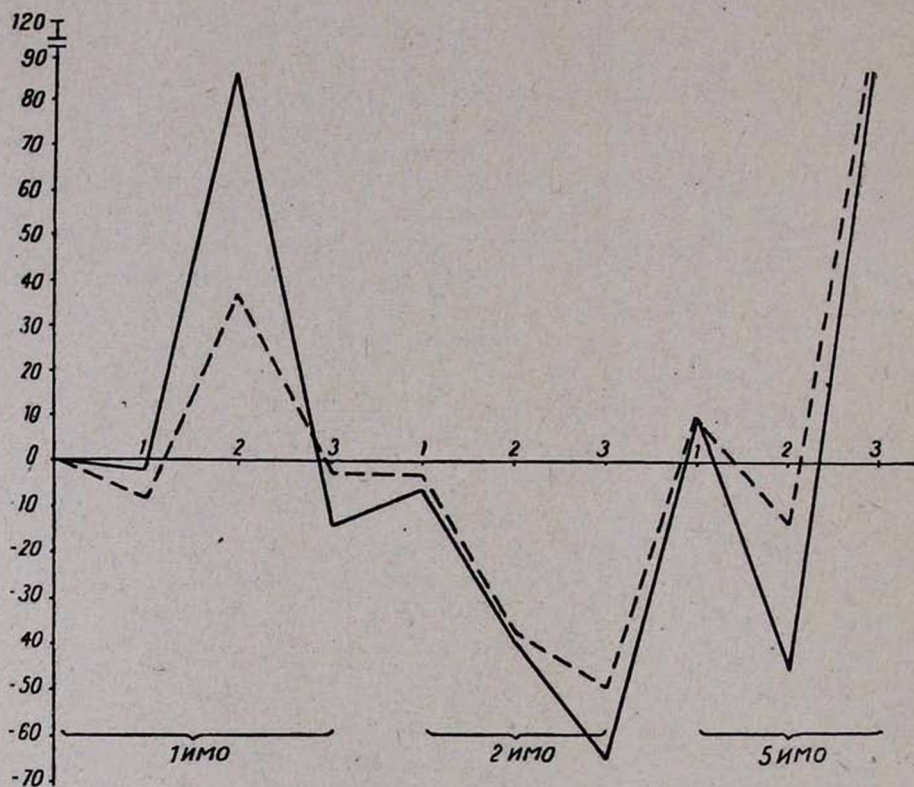


Рис. 5. Изменение активности СОД в постстрессовый период в процентах по отношению к контролю. Условные обозначения, как на рис. 4.

и 4. Установлено, что в постстрессовый период активность глутатионредуктазы и глутатионпероксидазы в мозге и сердце остается значительно выше контроля. Изменения носят фазовый характер, совпадающий в основном с направленностью сдвига количества липоперекисей. В предыдущих исследованиях [5] нами было показано, что при иммобилизационном стрессе наблюдается незначительное подавление активности СОД (примерно на 15%) в сердце и мозге. Исключение составляет 5-

разовая иммобилизация, когда активность фермента несколько превышает контрольный уровень.

В постстрессовый период активность СОД также в основном подавлена, за исключением срока через 24 часа после разовой ИМО и спустя 48 часов после 5-кратной ИМО (рис. 5).

Таким образом, при иммобилизационном стрессе не происходит ингибирования образования липоперекисей на стадии образования супероксидного радикала. Высокий уровень липидных перекисей в тканях при ИМО и в постстрессовый период на фоне высокой активности глутатионпероксидазы и глутатионредуктазы указывает на несбалансированность процессов образования и устранения липоперекисей. Следовательно, липидная пероксидация вносит определенный повреждающий вклад в общую картину патологических явлений при стрессе.

Кафедра биохимии
Ереванского медицинского
института

Поступила 18/XII 1978 г.

Է. Մ. ՄԻԿԱԵԼՅԱՆ, Մ. Մ. ՄԵԼԿՈՆՅԱՆ, Ե. Ա. ՄԵԼԻԿ-ԱՂԱԵՎԱ,
Վ. Գ. ՄԽԻԹԱՐՅԱՆ

ԼԻՊԻԴԱՅԻՆ ՊԵՐՕԶՍԻԴԱՅԻՄԱՆ ԵՎ ԲԶԶԻ ՀԱԿԱՌԱԴԻԿԱԼ
ՊԱՇՏՊԱՆՈՒԹՅԱՆ ՖԵՐՄԵՆՏԱՅԻՆ ՀԱՄԱԿԱՐԳԻ ՓՈԽՆԱՐԱՐԵՐՈՒԹՅՈՒՆԸ
ԻՄՈԲԻԼԻԶԱՏԻՈՆ ՍՏՐԵՍԻ ԺԱՄԱՆԱԿ

Հաստատված է, որ իմոբիլիզացիոն ստրեսի ժամանակ լիպիդային պերօքսիդացման ուժեղացման հետ մեկտեղ տեղի է ունենում ֆերմենտային համակարգի ակտիվության զգալի բարձրացում:

Սուպերօքսիդի սմոտաղայի ակտիվությունը նույն պայմաններում սովորաբար արգելակված է, որը վկայում է սուպերօքսիդային ռադիկալի առաջացման փոքր լիպիդային պերօքսիդացման ուժեղացման մասին:

E. M. MIKAELIAN, M. M. MELKONIAN, E. A. MELIK-AGAEVA,
V. G. MKHITARIAN

INTERRELATION OF LIPID PEROXIDATION AND FERMENTAL SYSTEM OF THE ANTIRADICAL PROTECTION OF THE CELL IN IMMOBILIZATIVE STRESS

It is established, that in immobilizative stress side by side with lipid peroxidation there takes place significant intensification of the activity of fermental system (glutathione peroxidase-glutathione reductase). The activity of superoxiddismutase in the same conditions generally is inhibited, which indicates the increase of lipid peroxidation at the stage of development of superoxide radical.

ЛИТЕРАТУРА

1. Владимиров Ю. А., Оленев В. И., Суслов Т. Б., Потапенко А. Я. Биофизика, 1975, 5, стр. 56.
2. Ланкин В. З., Гуревич С. М. ДАН СССР, 1976, 226, 3, стр. 87.
3. Мерзляк М. Н., Соболев А. С. Биофизика, 1975, 5, стр. 118.
4. Микаелян Э. М., Мелконян М. М., Араратян Э. А., Мхитарян В. Г. Биол. ж. Армении, 1978, XXXI, 5, стр. 543.
5. Мхитарян В. Г., Араратян Э. А., Микаелян Э. М., Мелконян М. М. Ж. exper. и клин. медицины АН АрмССР, 1977, XVII, 5, стр. 13.
6. Laurence Richard A., Beer L., Raymond F. J. Nutr., 1978, 108, 2, 211.
7. Lowry O. H., Rosenbrengh A., Beer K., Raymond F. J. Biol. Chem., 1951, 193, 265.
8. Pinto R. E., Bartley W. Biochem. J., 1969, 112, 109.
9. Sedlak J., Lindsay K. N. Analyt. Biochem., 1968, 25, 192.
10. Tom John., Frank Lee, Roberts Robert J. Pediat. Res., 1978, 12, 2, 115.