

УДК 612.327.8.015.3

В. Г. МХИТАРЯН, Л. В. СЕМЕРДЖЯН

СОВМЕСТНОЕ ВЛИЯНИЕ ВИТАМИНА Е И
ПЕРОКСИДИРОВАННЫХ И НЕПЕРОКСИДИРОВАННЫХ
НЕНАСЫЩЕННЫХ ЖИРНЫХ КИСЛОТ НА СОДЕРЖАНИЕ
ТИОЛОВЫХ ГРУПП В ПЕЧЕНИ КРЫС

Изучено влияние пероксидированных и непероксидированных НЖК на содержание тиоловых групп в печени крыс. Полученные данные являются новым подтверждением взаимосвязи между уровнем перекисного окисления липидов и содержанием тиоловых групп, а также регулирующего действия α -токоферола на этот процесс.

В настоящее время избыточной липидной пероксидации придается важное значение в развитии целого ряда патологических состояний организма.

Установлено, что низкое содержание биоантиоксидантов, а также малая активность ферментных систем защиты клетки могут вызвать деструкцию клеточных мембран и привести к нарушению их нормальной проницаемости. При этом такие биоантиоксиданты, как витамины, фосфолипиды, ферменты — глутатионредуктаза, глутатионпероксидаза, супероксиддисмутаза, а также тиоловые группы имеют регуляторное значение в процессе липидной пероксидации.

Высокая реакционная способность тиолов имеет важное значение и для активности ряда ферментов, гормонов, а также для обеспечения многочисленных физиологических функций организма. Они интересны и тем, что имеют важное значение как антидоты при радиационных поражениях.

В наших исследованиях [1, 7] было показано, что избыточная липидная пероксидация, вызванная ожоговой травмой, а также длительным введением НЖК и продуктов их перекисления [8], приводит к угнетению активности некоторых ключевых ферментов пентозного цикла [9], к снижению количества фосфолипидов в биомембранах [3], витамина Е [4] и т. п. Установлены также заметные изменения в содержании тканевых тиоловых групп при ожоговой травме и нормализация их количества при введении витамина Е [2].

Учитывая важную роль тиоловых групп в регуляции процесса перекисного окисления липидов, а также в обеспечении активности целого ряда ферментов, было небезынтересно изучить изменения в содер-

жании белковых и небелковых SH-групп в печени крыс при избыточной пероксидации липидов, а также показать регулирующее влияние витамина Е на их сдвиги.

Методы исследований

Опыты ставили на белых крысах-самцах массой 150—180 г, содержащихся на обычном рационе. Исследования проводили на семи группах животных. Первая группа—интактные крысы—служила контролем; второй группе ежедневно вводили непероксидированную олеиновую кислоту в количестве 0,1 мл на 150 г веса; третьей и четвертой группам вводили в тех же количествах пероксидированную и непероксидированную линолевую кислоту. Пероксидацию кислот производили путем азрации на водной бане с температурой 60°C. О степени пероксидации судили по перекисному числу, которое, как правило, колебалось в пределах 300—320 мкмоль перекисного кислорода. Пятой группе животных одновременно с олеиновой кислотой внутрибрюшинно вводили α -токоферилацетат в количестве 1 мг на 100 г веса животного в виде тонкой эмульсии, приготовленной на 10% водном растворе твин-80 «Fegak» (ФРГ). Шестой и седьмой группам вводили соответственно с пероксидированной и непероксидированной линолевой кислотой витамин Е в течение 7 и 14 дней.

По окончании сроков эксперимента подопытных животных замораживали в жидком азоте, быстро извлекали печень и растирали в жидком азоте до тонкого порошка. Готовили 2,5% гомогенат на 0,02 М ЭДТА- Na_2 с pH 7,4. Супернатант, полученный при 20000 g, служил исходным материалом для определения тиоловых групп, содержание которых определяли по методу Sedlak и Lindsay [20]. Пробы для определения общего количества SH-групп содержали 0,5 мл супернатанта, 1,5 мл 0,2 М трис-HCl буфера (pH 8,2), 0,1 мл 0,01 М 5,5 дитиобис-(2-нитробензойная кислота) (ДТНБ) фирмы «Sigma» (США) и 7,9 мл абсолютного метанола. Общий объем реакционной смеси составлял 10 мл. Определение небелковых тиоловых групп производили в пробах, содержащих 2 мл депротеинизированного экстракта, 4 мл 0,2 М трис-HCl буфера (pH 8,9) и 0,1 мл 0,01 М ДТНБ. Общий объем реакционной смеси составлял 6,1 мл. Измерение проб производили на спектрофотометре МОМ-203 (ВНР) при длине волны 412 нм. Количество SH-групп выражали в нмолях в пересчете на 1 мг белка, который определяли по методу Lowry [17]. Достоверность результатов исследований рассчитывали по Стьюденту.

Результаты исследований и обсуждение

Как показали наши исследования (табл. 1), у контрольных крыс в печени содержание общих сульфгидрильных групп составляло в среднем $27,2 \pm 0,18$, а небелковых $1,27 \pm 0,04$ нмоль на 1 мг белка, что несколько ниже литературных данных. У подопытных крыс через 7 дней

после введения олеиновой кислоты наблюдается снижение содержания общих SH-групп в основном за счет белковых, в то время как количество небелковых SH-групп снижается всего лишь на 8,7%. С удлинением сроков экспозиции до 14 суток количество их не только достигает исходного уровня, но и происходит некоторое повышение количества небелковых SH-групп, что отчасти не согласуется с данными наших прежних исследований, где было показано, что в эти сроки НЖК инициирует процесс липидной пероксидации [10]. Такое несоответствие между этими данными, видимо, обусловлено пространственной разобщенностью мест инициации перекисного окисления и тиолов, вследствие чего они не вступают в реакцию с перекисями и не угнетают процесс перекисного окисления [11].

Наряду с этим небелковые SH-группы, особенно восстановленный глутатион, способны регулировать скорость свободнорадикального окисления НЖК в зависимости от концентрации гидроперекисей, причем при их малых концентрациях восстановленный глутатион стимулирует пероксидацию, в то время как при больших, наоборот, тормозит [14, 16, 18, 19]. Таким образом, небелковые SH-группы в процессе липидной пероксидации, видимо, выполняют двойную роль: с одной стороны, они выступают в качестве ингибиторов, а с другой, в зависимости от количества гидроперекисей—инициатором процесса пероксидации.

Любопытно, что в опытах *in vitro* пероксидированная линолевая кислота в отличие от неокисленной в малых концентрациях повышает каталитическую активность изолированной сукцинатдегидрогеназы, и наоборот, а в больших—уменьшает в ней содержание SH групп [13].

Опыты с линолевой кислотой показали, что количественные сдвиги во всех типах SH-групп в печени носят несколько иной характер, чем с олеиновой кислотой. Как видно из данных табл. 2, содержание белковых SH-групп значительно снижается спустя 7 и 14 дней после введения линолевой кислоты, в то время как небелковые SH-группы снижаются незначительно. При введении пероксидированной линолевой кислоты наблюдаемые изменения в содержании SH-групп носят более выраженный характер.

Как видно из данных табл. 3, содержание общих SH-групп, в том числе и белковых, снижается на 7-й день на 32,0 и 32,8% соответственно и остается почти в этих пределах и через 14 дней. В отличие от белковых SH-групп небелковые снижаются в эти сроки несколько меньше. Значительное снижение белковых SH-групп под влиянием перекисей, возможно, обусловлено конформационными изменениями белковых молекул, вследствие чего тиоловые группы становятся доступными для окисления.

Сопоставляя данные, полученные под влиянием олеиновой, линолевой и пероксидированной линолевой кислот, можно заметить, что при равных условиях и сроках опытов линолевая кислота вызывает более выраженные сдвиги в содержании тиоловых групп (общих, бел-

Таблица 1

Содержание SH-групп в печени под влиянием непероксидированной олеиновой кислоты и при совместном действии с α -токоферилацетатом,
нмоль/мг белка

Типы SH-групп	Статистич. показатели	Контрольные крысы	Непероксид. олеиновая кислота				Непероксид. олеиновая кислота + α -токоферилацетат			
			через 7 дней	% изменения	через 14 дней	% изменения	через 7 дней	% изменения	через 14 дней	% изменения
Общие	$M \pm m$ n P	27,2 $\pm$ 0,18 10 —	21,9 $\pm$ 0,49 8 <0,001	—19,4	26,4 $\pm$ 0,12 6 <0,5	—2,9	27,2 $\pm$ 0,6 7 <0,2	—	27,7 $\pm$ 0,8 7 >0,5	+1,8
Белковые	$M \pm m$	25,9	20,7	—20,0	24,9	—4,9	25,9	—	26,4	+1,9
Небелковые	$M \pm m$ n P	1,27 $\pm$ 0,04 10 —	1,16 $\pm$ 0,01 6 <0,02	—8,7	1,48 $\pm$ 0,03 8 <0,001	+16,5	1,25 $\pm$ 0,05 10 >0,5	—1,6	1,28 $\pm$ 0,06 6 >0,5	+1,0

Таблица 2

Содержание SH-групп в печени под влиянием непероксидированной линолевой кислоты и при совместном действии с α -токоферилацетатом,
нмоль/мг белка

Типы SH-групп	Статистич. показатели	Контрольные крысы	Непероксидированная линолевая кислота				Непероксидированная линолевая кислота + α -токоферилацетат			
			через 7 дней	% изменения	через 14 дней	% изменения	через 7 дней	% изменения	через 14 дней	% изменения
Общие	$M \pm m$ n P	27,2 $\pm$ 0,18 10 —	20,4 $\pm$ 0,3 7 <0,002	—25,0	20,9 $\pm$ 0,51 6 <0,002	—23,2	26,5 $\pm$ 0,51 7 <0,02	—2,6	25,8 $\pm$ 0,61 7 >0,5	—5,5
Белковые	$M \pm m$	25,9	19,3	—25,4	19,8	—23,4	25,2	—2,7	24,5	—5,4
Небелковые	$M \pm m$ n P	1,27 $\pm$ 0,04 10 —	1,09 $\pm$ 0,048 6 <0,001	—14,2	1,08 $\pm$ 0,05 6 <0,001	—15,0	1,23 $\pm$ 0,06 6 >0,5	—3,2	1,24 $\pm$ 0,05 6 >0,5	—2,4

Таблица 3

Содержание SH-групп в печени под влиянием пероксидированной
линолевой кислоты и при совместном действии с α -токоферилацетатом,
нмоль/мг белка

Типы SH-групп	Статистич. показатели	Контроль- ные крысы	Пероксид. линолевая кислота				Пероксид. линолевая кислота + α -токоферилацетат			
			через 7 дней	% изме- нения	через 14 дней	% изме- нения	через 7 дней	% изме- нения	через 14 дней	% изме- нения
Общие	$M \pm m$ $\frac{n}{p}$	$27,2 \pm 0,18$ $\frac{10}{-}$	$18,5 \pm 0,58$ $\frac{7}{<0,001}$	-32,0	$19,6 \pm 0,70$ $\frac{7}{<0,001}$	-28,0	$23,5 \pm 0,22$ $\frac{8}{<0,02}$	-13,7	$26,4 \pm 0,46$ $\frac{7}{>0,25}$	-3,0
Белковые	$M \pm m$	25,9	17,4	-32,8	18,6	-28,1	22,3	-13,9	25,2	-2,7
Небелковые	$M \pm m$ $\frac{n}{p}$	$1,27 \pm 0,04$ $\frac{10}{-}$	$1,03 \pm 0,07$ $\frac{7}{<0,002}$	-18,3	$0,98 \pm 0,03$ $\frac{6}{<0,001}$	-22,6	$1,13 \pm 0,03$ $\frac{7}{<0,02}$	-11,7	$1,18 \pm 0,07$ $\frac{6}{>0,5}$	-7,1

ковых и небелковых), чем олеиновая кислота, причем при пероксидации этот эффект значительно усиливается. Такое неодинаковое по интенсивности действие различных НЖК на содержание SH-групп в печени, видимо, обусловлено некоторыми их структурными особенностями, количеством двойных связей и возможностью подвергаться цистранс-изомеризации.

Анализ полученных данных говорит о наличии определенной обратной корреляции между уровнем гидроперекисей НЖК и содержанием тиолов, что подтверждается как литературными данными, так и данными наших прежних исследований, показавшими наличие определенного соответствия между низким содержанием тиоловых групп и высоким содержанием липидных перекисей при ожоговой травме [2].

На основании вышеизложенного можно заключить, что длительное введение НЖК и продуктов их пероксидации вызывает значительные количественные сдвиги во всех типах тиолов, что связано с усилением их перекисного и свободнорадикального окисления. Не исключается, что легкая окисляемость SH-групп в определенной степени обусловлена нарушением нативной организации мембранных структур клетки [6]. В этом аспекте представляют определенный интерес данные Diplock, Liscu [15], которые установили стабилизирующее влияние α -токоферола на структурную организацию биомембран.

Известно, что при длительном введении НЖК и продуктов их окисления снижается содержание витамина Е [4, 5], сдвиги которого сказываются на уровне тиолов. Учитывая вышеизложенное, было изучено также совместное влияние НЖК и α -токоферилацетата на содержание тиоловых групп в печени крыс.

Как показали результаты этих опытов, при совместном введении НЖК с α -токоферилацетатом содержание тиоловых групп в печени снижается незначительно. Как видно из данных табл. 1, содержание белковых и небелковых SH-групп в печени у крыс остается на 7-й день опыта в пределах исходного уровня, и даже имеется тенденция к их повышению на 14-й день.

Опыты с линолевой кислотой, особенно с пероксидированной, показали, что, несмотря на введение витамина Е, содержание SH-групп хотя и снижается, однако это снижение незначительно. Так, из данных табл. 3 видно, что количество белковых и небелковых SH-групп на 7-й день опыта ниже исходного уровня на 13,9 и 11,7%, а на 14-й день — лишь на 2,7 и 7,1% соответственно.

Полученные данные являются новым подтверждением взаимосвязи между уровнем перекисного окисления липидов и содержанием тиоловых групп и регулирующего действия α -токоферола на этот процесс.

ՊԵՐՕԳՄԻՏԱՅՎԱՆ ԶԶԱԳԵՑԱՆ ՃԱՐՊԱԹՔՈՒՆԵՐԻ ԵՎ ՎԻՏԱՄԻՆ E-Ի
 ՀԱՄԱՏՆԵՂ ԱԶԻԵՑՈՒԹՅՈՒՆԸ ԱՌՆԵՏՆԵՐԻ ԼՅԱՐԴԻ ԹԻՈԼԱՅԻՆ ԽՄԲԵՐԻ
 ՊԱՐՈՒՆԱԿՈՒԹՅԱՆ ՎՐԱ

Ուսումնասիրվել է պերօքսիդացված և չպերօքսիդացված չհագեցած ճարպաթթուների ազդեցությունը առնետների լյարդի թիոլային խմբերի պարունակության վրա:

Ցույց է տրված, որ ճարպաթթուների ներորոշայնային ներարկումները 7—14 օրվա ընթացքում առաջացնում են SH խմբերի տարբեր քանակական տեղաշարժեր:

Օլեինաթթվի 7 օրվա ներարկումից հետո սպիտակուցային և ոչսպիտակուցային SH-խմբերի քանակը նվազում է և հասնում սկզբնական ստուգիչ մակարդակին 14 օրվա ներարկումից հետո: Փորձի նույն պայմաններում լինոլաթթվի ազդեցության տակ SH-խմբերի քանակը իջած է փորձի բոլոր ժամկետներում:

Ճարպաթթուների և վիտամին E-ի համատեղ ազդեցության պայմաններում թիոլային խմբերի քանակը լյարդում մնում է փորձի բոլոր ժամկետներում ստուգիչ թվերի սահմանում:

V. G. MKHITARIAN, L. V. SEMERDJIAN

THE JOINT INFLUENCE OF PEROXIDATED UNSATURATED FATTY ACIDS AND VITAMIN E ON THE CONTENT OF THE RAT LIVER

The influence of peroxidated and non-peroxidated fatty acids on the content of the rat liver thiol groups was studied.

The different quantitative changes in the SH-groups content were observed after fatty acids intraabdominal injections during 7—14 days.

After 7 days, oleic acid injections the protein-bound and non-protein SH-groups reduce but reach the control level on the 14th day.

The linolic acid reduces the SH-groups content at all periods of experiment.

Under the joint influence of fatty acids and vitamin E the amount of SH groups remains within the control level in all periods.

ЛИТЕРАТУРА

1. Агаджанов М. И., Мелик-Агаян Е. А., Межлумян Л. М., Мхитарян В. Г. 2-й Всесоюзный симпозиум: Структура, биосинтез и превращения липидов в организме животных и человека. М., 1975, стр. 121.
2. Агаджанов М. И., Семерджян Л. В., Мхитарян В. Г. Биол. ж. Армении, 1979, 32, 5, стр. 393.
3. Агаджанов М. И., Овакимян С. С., Мхитарян В. Г., Карагезян К. Г. Укр. биохим. журн., 1979, 51, 1, стр. 23.

4. Агаджанов М. И., Мелик-Агаян Е. А., Мхитарян В. Г. Биол. ж. Армении, 1974, XXVII, 12, стр. 28.
5. Владимиров Ю. А., Оленов В. И., Суслова Т. Б., Потапенко А. Я. В кн.: Итоги науки и техники (серия биофизика). М., 1975, т. 5, стр. 56.
6. Глушенко В. С., Данилов В. С., Козлов Ю. П. Радиобиология, 1974, XIV, 4, стр. 591.
7. Мхитарян В. Г., Агаджанов М. И., Мелик-Агаян Е. А. Ж. exper. и клин. мед. АН Арм. ССР, 1975, XV, 1, стр. 3.
8. Мхитарян В. Г., Агаджанов М. И., Мелик-Агаян Е. А. Материалы III Всесоюзного биохимич. съезда, т. 1. Рига, 1974, стр. 242.
9. Мхитарян В. Г., Семерджян Л. В. Материалы 50 научной сессии ЕрМИ, посвященной 50-летию образования СССР. Ереван, 1972, стр. 326.
10. Мхитарян В. Г., Агаджанов М. И., Мелик-Агаян Е. А. Биол. ж. Армении, 1974, 27, 6, стр. 3.
11. Панченко Л. Ф., Герасимов А. М., Наздрачева Л. И., Карягина Г. А. Вopr. мед. химии, 1974, XX, 3, стр. 321.
12. Ракицкий Р. Ф. Основы вариационной статистики для биологов. Минск, 1961.
13. Туровецкий В. Б., Сепетов Н. Ф., Данилов В. С. Биофизика, 1979, XXIV, 1, стр. 72.
14. Christophersen B. O. Biochem. Biophys. Acta, 1968, 164, 35.
15. Diplock A. T., Lucy J. A. FEBS letters, 1973, 29, 205.
16. Leibowitz M. E., Johnson M. C. J. Lipid Res., 1971, 12, 66.
17. Lowry O. H. et al. J. Biol. Chem., 1951, 193, 265.
18. Milts G. C., Randall H. P. J. Biol. Chem., 1958, 232, 589.
19. Savilge W. E., Mareltaren J. A. In: The Chemistry of Organic Sulfur Compounds. Pergamon Press, 1966, 2, 367.
20. Sedlak J., Lindsay R. Analyt. Biochem., 1968, 25, 192.