

Э. М. МИКАЕЛЯН, С. Л. МКРТЧЯН, Е. А. МЕЛИК-АГАЕВА,
В. Г. МХИТАРЯН

ПЕРЕКИСНОЕ ОКИСЛЕНИЕ ЛИПИДОВ И АНТИОКСИДАНТЫ ПРИ ИММОБИЛИЗАЦИОННОМ СТРЕССЕ

Установлено, что в физиологических условиях в эритроцитарной мембране, микросомах мозга, наружной мембране митохондрий печени преобладает ферментативный путь перекисления. На внутренней мембране митохондрий печени и мозга активнее представлен аскорбатзависимый путь перекисного окисления липидов (ПОЛ). Микросомы печени и наружная мембрана митохондрий мозга характеризуются примерно равной интенсивностью ферментативного и неферментативного ПОЛ. Сравнительно низкий исходный уровень ПОЛ представлен в сердце, а высокий—в мозге. Установлена обратная зависимость между содержанием витамина Е и активностью супероксиддисмутазы в тканях. Имобилизационный стресс значительно повышает интенсивность ПОЛ в микросомах и митохондриях печени, мозга, в эритроцитарной мембране. Предварительное введение витамина Е в дозе 0,1 мг на 100 г массы значительно регулирует ПОЛ.

Перекисное окисление липидов (ПОЛ) является физиологическим процессом, непрерывно протекающим во всех биомембранах, его интенсивность отражается на жирнокислотном составе их фосфолипидов, на вязкости липидной фазы. Выявленная исследованиями Е. Б. Бурлаковой [2] тесная взаимосвязь между скоростью окислительных превращений липидов, структурой и функцией биомембраны [7] легла в основу гипотезы контроля клеточного метаболизма мембранными липидами. Диапазон влияния ПОЛ на направленность метаболизма в клетке довольно широк: изменение белок-липидных, липид-липидных взаимодействий в мембране и вытекающие из этого изменения скорости проникновения субстратов, кофакторов, регуляторов; влияние на активность ферментов, встроенных в мембрану, а также липидзависимых и перекисезависимых энзимов; рецепция мембраной гормонов с последующей реализацией их регуляторного влияния на обмен.

Ранее нами было установлено усиление интенсивности ПОЛ в гомогенатах тканей при имобилизационном стрессе (ИМО) [5]. Выяснение вопросов—как это реализуется на субклеточном уровне и какое влияние на интенсивность ПОЛ оказывает предварительное введение α -токоферолацетата—представляет несомненный интерес.

Материал и методика

Опыты проводили на белых крысах-самцах массой 100—150 г. Животные были разделены на 3 группы: I—интактные крысы, II—животные, имобилизированные фиксацией головы и конечностей ежедневно в течение 150 мин (число имобилизаций от 1 до 7), III—ИМО проводился на фоне введения α -токоферолацетата в дозе 0,1 мг на 100 г массы через каждые 48 часов. Токоферолацетат в организме быстро гидролизует до свободного α -токоферола. Схема инъекций α -токоферолацетата основывалась на результатах, полученных Е. Б. Бурлаковой, свидетельствующих о продолжительности повышения уровня α -токоферола в тканях в течение 48 часов после предварительного введения его уксуснокислого эфира [3].

Ткани тщательно перфузировали охлажденным 0,15 М КСl. Все операции проводили на холоде. Ткани гомогенизировали в стеклянном гомогенизаторе с тефлоновым пестиком в среде выделения, содержащей 0,25 М сахарозы, 0,004 М трис-НСl и 0,001 М ЭДТА, рН 7,2. Митохондриальную (наружная и внутренняя мембраны) и микросомную фракции получали методом дифференциального центрифугирования [12]. Активность перекисного окисления липидов определяли по накоплению малонового диальдегида за 30 мин инкубации [1]. При исследовании неферментативного аскорбатзависимого перекисления инкубационная среда содержала 40 мМ трис-НСl (рН 7,4), 0,8 мМ аскорбата, $12 \cdot 10^{-6}$ М соли Мора; в случае ферментативного НАДФНзависимого перекисления— $2 \cdot 10^{-4}$ М пироглюкофата натрия, $12 \cdot 10^{-6}$ М соли Мора, 1 мМ НАДФН. В обоих случаях микросомы, митохондрии, мембраны эритроцитов добавлялись из расчета 1,5—2 мг белка на 1 мл инкубационной среды. Содержание липидных перекисей выражали в *нмоль* малонового диальдегида на 1 мг белка. Для расчета использовали коэффициент молярной экстинкции $1,56 \cdot 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ см}^{-1}$ [9].

Активность супероксиддисмутазы (СОД) определяли по ингибированию генерации супероксидных анионов в модели феназинметасульфат-НАДФН-нитротетразолий синий. За единицу активности СОД принимали такое количество ее раствора, которое при добавлении к модельной системе, генерирующей супероксидный анион, подавляет ее активность на 50% [11]. Пересчет единиц активности производили на мг белка гомогената. Для определения 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, описанному нами ранее [6]. Активность глутатионпероксидазы выражали количеством *нмоль* восстановленного глутатиона, окисленного за 1 мин на 1 мг белка. Активность глутатионредуктазы выражали количеством *нмоль* НАДФН, окисленного за 1 мин на 1 мг белка.

Содержание витамина Е в тканях определяли флуориметрически по методу Duggan с максимумом возбуждения при 295 нм и максимумом флуоресценции при 340 нм [8]. Содержание белка определяли по методу Lowry [10].

Результаты и обсуждение

Исходный уровень липидных перекисей в тканях невысок благодаря сбалансированности процессов их образования и элиминации. Как показали наши исследования, содержание перекисей липидов в тканях у интактных крыс колеблется в пределах 0,67—4,58, при этом нижний предел характерен для тканей сердца, верхний—мозга (таблица).

Как видно из таблицы, эритроцитарная мембрана, микросомы мозга, а также наружная мембрана митохондрий печени характеризуются преобладанием активности ферментативного НАДФНзависимого перекисления. На внутренней мембране митохондрий печени и мозга активнее представлен аскорбатзависимый путь перекисного окисления липидов. В микросомах печени и на наружной мембране митохондрий

Таблица

Содержание липидных перекисей, витамина Е, активность СОД, глутатионредуктазы и глутатионпероксидазы в тканях интактных крыс

Ткани	Аскорбатзависимое ПОЛ	НАДФНзависимое ПОЛ	Витамин Е, мкг/мг белка	СОД, ед на мг белка	Глутатионредуктаза, мкмоль НАДФН за 1 мин на мг белка	Глутатионпероксидаза, мкмоль восстановл. глутатиона, окисленного за 1 мин на мг белка
	в нмоль малонового диальдегида на мг белка					
Гомогенат сердца	$0,968 \pm 0,053$ n=9	$0,67 \pm 0,043$ n=9	$0,972 \pm 0,027$ n=9	$18,99 \pm 0,319$ n=12	$0,0286 \pm 0,001$ n=9	$0,149 \pm 0,01$ n=9
Гомогенат печени	$2,43 \pm 0,165$ n=9	$1,85 \pm 0,207$ n=9	$0,738 \pm 0,035$ n=9	$29,35 \pm 0,301$ n=12	$0,033 \pm 0,003$	$0,25 \pm 0,038$ n=9
Микросомы печени	$1,72 \pm 0,104$ n=16	$1,83 \pm 0,117$ n=16	$1,38 \pm 0,017$ n=16			
Митохондрии печени, наружная мембрана	$3,62 \pm 0,094$ n=16	$4,2 \pm 0,099$ n=16	$3,336 \pm 0,056$ n=16			
Митохондрии печени, внутренняя мембрана	$3,8 \pm 0,104$ n=16	$2,45 \pm 0,146$ n=16	$4,04 \pm 0,128$ n=16			
Гомогенат мозга	$4,17 \pm 0,104$ n=9	$4,39 \pm 0,116$ n=9	$1,54 \pm 0,083$ n=9	$11,52 \pm 0,343$ n=12	$0,023 \pm 0,001$ n=9	$0,21 \pm 0,009$ n=9
Микросомы мозга	$2,87 \pm 0,117$ n=16	$4,58 \pm 0,091$ n=16	$2,4 \pm 0,088$ n=16			
Митохондрии мозга, наружная мембрана	$2,84 \pm 0,08$ n=16	$2,65 \pm 0,085$ n=16	$10,975 \pm 0,065$ n=16			
Митохондрии мозга, внутренняя мембрана	$4,53 \pm 0,074$ n=16	$3,214 \pm 0,04$ n=16	$7,86 \pm 0,067$ n=16			
Эритроцитарная мембрана	$1,98 \pm 0,106$ n=12	$2,376 \pm 0,198$ n=12	$2,565 \pm 0,18$ n=9			

мозга интенсивность ферментативного и неферментативного ПОЛ примерно одинакова.

Нами установлено, что соотношение ферментативного и неферментативного ПОЛ в гомогенатах печени и мозга совпадает с таковым, определенным как алгебраическая сумма в микросомах во внутренней и наружной мембране митохондрий этих тканей. Поэтому изучение направленности изменений ПОЛ при различных экстремальных воздействиях можно ограничить определением аскорбат- и НАДФНзависимого ПОЛ только в гомогенатах тканей.

Интересен факт обратной корреляционной зависимости содержания витамина Е в тканях и активности фермента антиокислительной защиты СОД. Сравнительно низкому уровню витамина Е в печени соответствует наибольшая активность СОД (таблица). Для мозга характерно обратное соотношение указанных показателей. В сердце, по сравнению с мозгом, содержание витамина Е в 1,58 раза меньше, а активность СОД в 1,65 раза выше. Эта закономерность становится объяснимой с учетом точек приложения воздействия витамина Е и СОД на интенсивность перекисного окисления липидов. СОД проявляет антирадикальную защиту на стадии зарождения цепи, устраняя супероксидный анион и предотвращая возникновение синглетного кислорода, а токоферол тормозит свободнорадикальное окисление за счет увеличения плотности упаковки фосфолипидов мембран и уменьшения их доступности к переокислению, а также антирадикальный механизм через связывание перекисных радикалов на стадии обрыва цепей и путем тушения синглетного кислорода.

Сопоставление исходного уровня липидных перекисей в исследуемых тканях с содержанием витамина Е и активностью ферментов антирадикальной защиты выявляет интересную закономерность. Степень вклада каждого компонента в регуляцию интенсивности ПОЛ проявляет определенную органоспецифичность. В сердце и мозге установлена обратная корреляция между интенсивностью ПОЛ и активностью СОД. В печени, по сравнению с сердцем, несмотря на значительно высокую активность всех трех ферментов антирадикальной защиты, ПОЛ протекает с большей интенсивностью. Это, по-видимому, зависит от различного содержания токоферола и особенностей метаболизма в целом.

При иммобилизационном стрессе значительно увеличивается исходный уровень перекисей в эритроцитарной мембране, митохондриях и микросомах. Направленность изменений ферментативного и неферментативного ПОЛ в микросомах печени, мозга и эритроцитарной мембране в основном однотипна, носит волнообразный характер с двумя пиками, приходящимися на 1—3 и 5—6-ую фиксации (рис. 1 а, б, в). К 7-й иммобилизации интенсивность перекисного окисления липидов подходит к контрольному уровню. В микросомах печени больше активируется НАДФНзависимый путь переокисления; в эритроцитарной мембране и микросомах мозга соотношение сдвигов двух путей ПОЛ меняется в зависимости от срока иммобилизации (рис. 1, а, б, в).

Предварительное введение α -токоферолацетата на фоне ИМО резко снижает уровень липидных перекисей в тканях (ниже исходного).

Сравнительно большую чувствительность к воздействию токоферола проявляет НАДФНзависимый путь перекисления (рис. 1, а, б, в). Особенно резкие сдвиги в интенсивности ПОЛ при ИМО наблюдаются в мембранах митохондрий мозга и печени. Ферментативный и неферментативный путь ПОЛ изменяется симбатно, на высоте пиков сдвига уровень липидных перекисей увеличивается по сравнению с контролем в пределах от 5 до 18 раз (рис. 1 г, 2, 3). Витамин Е существенно снижает интенсивность ПОЛ в митохондриях, не подводя, однако, содержание перекисей липидов к контролю.

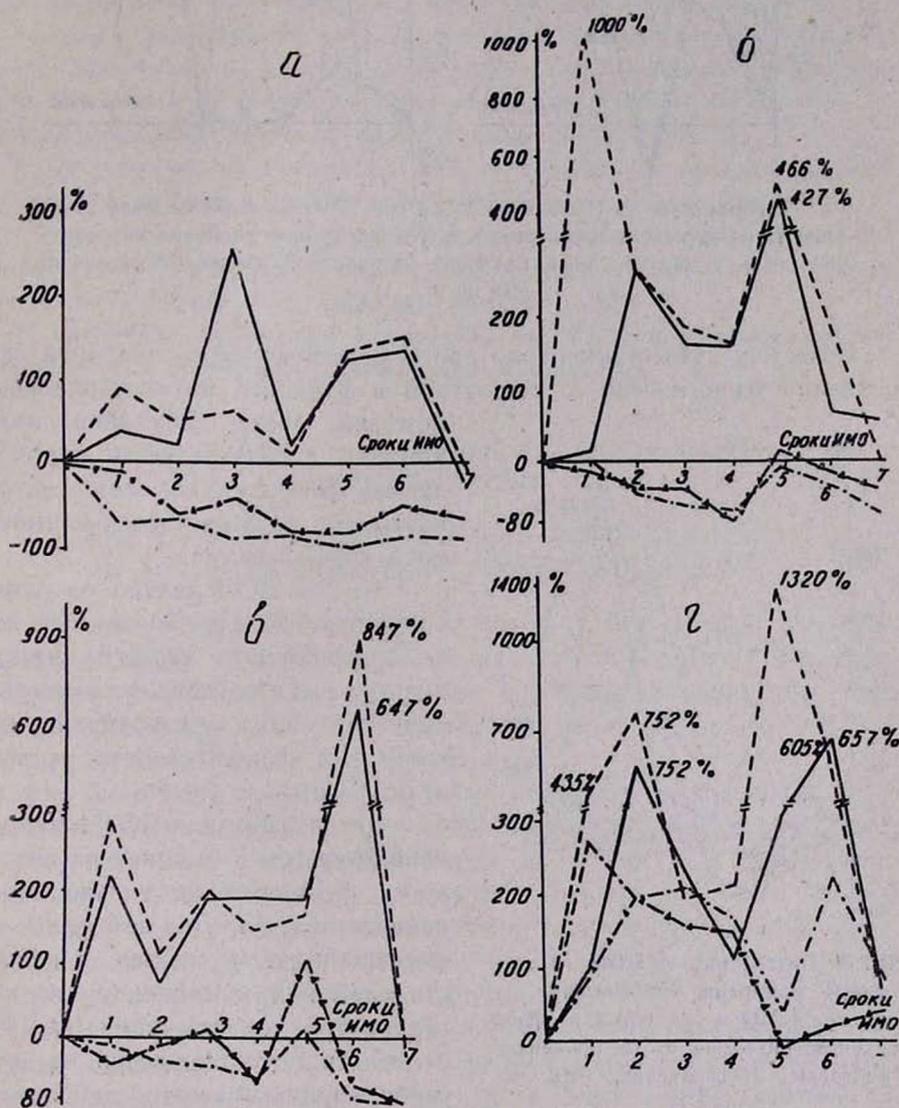


Рис. 1. Интенсивность ПОЛ при ИМО и при ИМО на фоне введения витамина Е (в процентах к контролю). а В эритроцитарных мембранах. б. В микросомах печени. в. В микросомах мозга. г. На наружной мембране митохондрий мозга. Условные обозначения: — аскорбатзависимое ПОЛ при ИМО. — — — — НАДФНзависимое ПОЛ при ИМО. ▲—▲—▲— аскорбатзависимое ПОЛ при ИМО и при ИМО на фоне витамина Е. — — — — НАДФНзависимое ПОЛ при ИМО и при ИМО на фоне витамина Е.

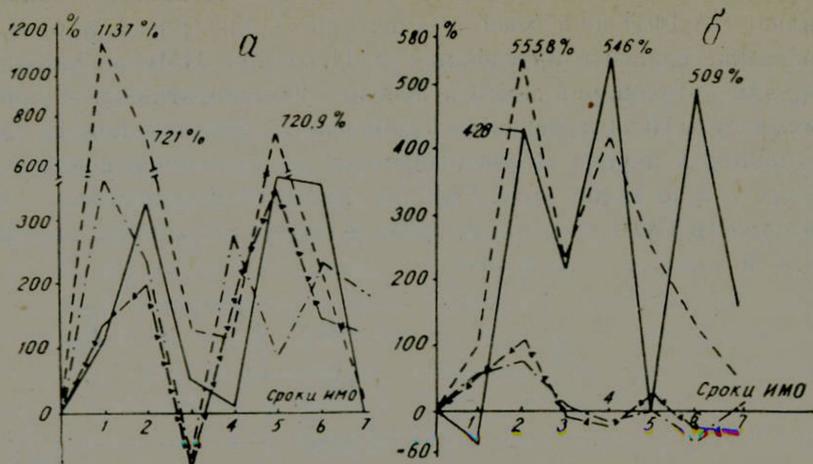


Рис. 2. Интенсивность ПОЛ при ИМО и при ИМО на фоне введения витамина Е (в процентах к контролю). а. На внутренней мембране митохондрий мозга. б. На наружной мембране митохондрий печени (обозначения, как на рис. 1).

Известно, что стационарно протекающий процесс липидной перекисидации тесно связан со структурой и функцией митохондриальных мембран. Фаза набухания митохондрий характеризуется перекисидацией фосфолипидов мембран, сокращение их достигается элиминацией перекисей (4).

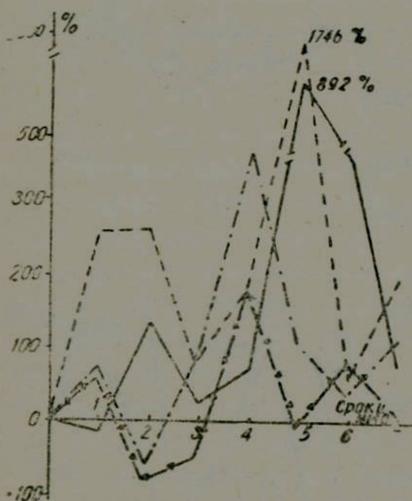


Рис. 3. Интенсивность ПОЛ на внутренней мембране митохондрий печени при ИМО и при ИМО на фоне введения витамина Е (в процентах к контролю, обозначения, как на рис. 1).

Выход ПОЛ далеко за рамки стационарного состояния при иммобилизационном стрессе, несомненно, вносит дисбаланс в энергетический обмен митохондрий и косвенно — в направленность метаболизма клетки в целом.

Интенсификация ПОЛ в микросомах оказывает влияние на активность ферментов не только через изменения структуры мембраны, ее фосфолипидного состава и вязкости липидной компоненты, но и в результате переключения НАДФН с цепи гидроксирования на путь свободнорадикального окисления. Регуляция уровня перекисей липидов при ИМО в результате введения α -токоферолацетата дает основание для использования его как с терапевтической, так и профилактической целью при стрессе.

ԼԻՊԻԴՆԵՐԻ ԳԵՐՕՔՍԻԴԱՑՈՒՄԸ ԵՎ ՀԱԿԱՕՔՍԻԴԱՆՏՆԵՐԸ
ԻՄՈԲԻԼԻԶԱՑԻՈՆ ՍՏՐԵՍԻ ԺԱՄԱՆԱԿ

Առնետների մոտ ֆիզիոլոգիական պայմաններում էրիթրոցիտների թաղանթում, ուղեղի միկրոսոմներում, լյարդի միտոքոնդրիումների արտաքին թաղանթում գերակշռում է գերօքսիդացման ֆերմենտային ուղին:

Լյարդի և ուղեղի միտոքոնդրիումների ներքին թաղանթում է գտնվում լիպիդային գերօքսիդացման ասկորբատ կախում ունեցող ուղին: Լիպիդների գերօքսիդացման ֆերմենտային և ոչ ֆերմենտային պրոցեսի ինտենսիվությունը լյարդի միկրոսոմներում և ուղեղի միտոքոնդրիումների արտաքին թաղանթում գրեթե միատեսակ է: Լիպիդային գերօքսիդացման սկզբնական մակարդակը համեմատաբար ցածր է սրտամկանում և բարձր է ուղեղում:

Յուրջ է տրված, որ հյուսվածքներում գոյություն ունի հակառակ կախում E վիտամինի քանակի և սուպերօքսիդիսմուտազայի ակտիվության միջև:

Իմոբիլիզացիոն ստրեսի պայմանում լիպիդային գերօքսիդացման ինտենսիվությունը չափազանց բարձր է ուղեղի միկրոսոմներում և միտոքոնդրիումներում, ինչպես նաև էրիթրոցիտների թաղանթում:

E վիտամինի նախնական ներարկումը 0,1 մգ/100գ բաշին զգալիորեն կարգավորում է լիպիդային գերօքսիդացման պրոցեսը:

E. M. MIKAELIAN, S. L. MKRTCHIAN, E. A. MELIK-AGAEVA,
V. G. MKHITARIAN

THE LIPID PEROXIDATION AND ANTIOXIDANTS
IN THE IMMOBILISATION STRESS CONDITIONS

The main enzymatic character of the lipid peroxidation has been established in the erythrocyte membrane brain microsomes and outer membranes of liver mitochondria in the physiological conditions. The ascorbate dependent way of the lipid peroxidation was more active in the inner membrane of the liver mitochondria.

The liver microsomes and the outer membrane of the brain mitochondria were characterised by the equal intensity of the enzymatic and non-enzymatic lipid peroxidation. The level of the lipid peroxidation in the heart was a little lower, and in the brain—higher. The contrary dependence was established between the vitamin E content and superoxidismutase activity in the tissues. The immobilisation stress increased the level of lipid peroxidation significantly in the liver and brain microsomes and mitochondria and in the erythrocyte membranes. The previous administration of vitamin E in the dose of 0,1 mg on 100 g of animal mass has the significant regulatory effect on the lipid peroxidation level.

Л И Т Е Р А Т У Р А

1. Арчаков А. И., Девиченский В. М., Карузина И. И. и др. Биохимия, 1968, 33, стр. 479.
2. Бурлакова Е. Б., Архипова Г. В., Пальмина П. П., Молочкина Е. М. В сб.: Надежность клеток и тканей. Киев, 1980, стр. 34.

3. Бурлакова Е. Б., Кухтина Е. Н., Храпова Н. Г., Аристрахова С. А. Биохимия, 1982, 4, 5, стр. 822.
4. Воскресенский О. Н., Жутаев И. А., Бобырев В. Н., Безуглый Ю. В. Вопр. мед. химии, 1982, XXVII, 1, стр. 14.
5. Мхитарян В. Г., Апаратян Э. А., Микаелян Э. М., Мелконян М. М. Ж. exper. и клин. мед. АН Арм. ССР, 1977, XVII, 5, стр. 13.
6. Микаелян Э. М., Мелконян М. М., Мелик-Агаева Е. А., Мхитарян В. Г. Ж. exper. и клин. мед. АН Арм. ССР, 1979, XIX, 5, стр. 11.
7. Burlacova E. B. et al. Biophys and Biochem. Inform. in Recog. Plenum Press. New York a. London, 1979.
8. Daggan D. E. Arch. Biochem. Biophys., 1959, 84, 116.
9. Hochstein P., Ernster L. Biochem. Biophys. Res. Commun., 1963, 12, 388.
10. Lowry O. H., Rosebrough N. J., Farrar A. L., Randall R. J. J. Biol. Chem., 1951, 193, 265.
11. Morimitsu Nishimi N., Appaji Rao, Jmento Jagi Biochem. Biophys. Res. Commun., 1972, 46, 3, 849.
12. Schnaitman C., Erwin V. G. a. Greenwalt J. W. J. Cell. Biol., 1967, 32, 719.

УДК 616.36+616.24-002]: 547.915

П. А. КАЗАРЯН

ЛИПИДНАЯ ПЕРОКСИДАЦИЯ И УРОВЕНЬ ФОСФОЛИПИДОВ В ПЕЧЕНИ ПРИ ХРОНИЧЕСКОМ ВОСПАЛИТЕЛЬНОМ БРОНХОЛЕГОЧНОМ ПРОЦЕССЕ

Установлены особенности изменения отдельных фракций фосфолипидов и липидных перекисей в печеночной ткани кроликов при хроническом воспалительном бронхолегочном процессе. Показан параллелизм между снижением уровня фосфатидилипозитов, фосфатидилхолина, фосфатидных кислот и активированием процессов перекисления липидов. Обсуждается вопрос о возможной патогенетической роли свободнорадикальных реакций и метаболических нарушений отдельных фракций фосфолипидов в развитии расстройств печеночной деятельности при изученной патологии.

Как известно, хронические неспецифические заболевания легких сопровождаются изменением функций большинства органов и систем. Однако механизмы указанных осложнений остаются невыясненными.

Ранее нами было показано значительное подавление начальных этапов биосинтеза глицеролипидов в печени кроликов при хроническом воспалительном бронхолегочном процессе [1]. В связи с этим представляло интерес провести изучение количественных сдвигов общих и индивидуальных фосфолипидов (ФЛ)—важнейших мембранных компонентов, участвующих в структурной и функциональной организации клеточных образований. Учитывая, что в процесс липидной перекиссации вовлекаются в основном тканевые ФЛ, мы считали интересным проследить также за закономерностями в нарушениях свободнорадикальных реакций в печени при хроническом воспалительном бронхолегочном процессе.

Материал и методы

Опыты проводили на 26 кроликах-самцах массой 2—3 кг. Хронический воспалительный бронхолегочный процесс вызывали методом Н. Н. Аничкова и М. А. Захарьевской в модификации Г. А. Русанова и соавт.