

8. Манухин Б. Н., Пустовойтова З. Е. В кн.: Новые методы исследования гормонов и других биологически активных веществ. М., 1969, стр. 95.
9. Матлина Э. Ш. В кн.: Новые методы исследования гормонов и других биологически активных веществ. М., 1969, стр. 65.
10. Мирзоян С. А., Назаретян Р. А., Авакян О. М., Калдрикян М. А. Димекумарон—противоязвенный препарат. Ереван, 1982.
11. Мягкова Л. П. Тер. архив, 1978, 10, стр. 39.
12. Радбиль О. С. Фармакологические основы лечения болезней органов пищеварения. М., 1976.
13. Рысс С. М. В сб.: Кортико-висцеральные взаимоотношения в физиологии, биохимии и медицине. Л., 1971, стр. 148.
14. Юденфренд С. Флуоресцентный анализ в биологии и медицине. М., 1965.
15. Bertler A. et al. Acta Physiol. Scand., 1958, 44, 3—4, 273.
16. Carlsson A., Waldeck B. Acta Physiol. Scand., 1958, 44, 3—4, 293.
17. Grossman M. I. et al. Ann. Intern. Med., 1976, 84, 1, 57.
18. Harada M. et al. J. Pharm. Dyn., 1981, 4, 5, 309.
19. Londong W. J. Hepato-gastroenterol., 1982, 29, 1, 40.

УДК 577.15/17

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

ВЗАИМОСВЯЗЬ АНТИОКСИДАНТОВ И ПЕРЕКИСНОГО ОКИСЛЕНИЯ ЛИПИДОВ

Установлено, что антиоксиданты подавляют интенсивность ферментативного и неферментативного перекисного окисления липидов, регулируют активность супероксиддисмутазы, глутатионредуктазы и глутатионпероксидазы. Полученные результаты дают основание использовать указанные дозы антиоксидантов в профилактике стресса.

Процесс перекисного окисления липидов (ПОЛ) играет существенную роль в регуляции метаболизма клетки. Ферментативное НАДФН-зависимое переокисление является обязательным этапом на пути синтеза таких биологически активных метаболитов, как стероидные гормоны и простагландины. Ферментативное и неферментативное ПОЛ стационарно протекает во всех биомембранах. Интенсивность ПОЛ имеет двустороннюю связь с структурой мембраны: с одной стороны, скорость окислительных свободно-радикальных процессов зависит от упаковки, доступности липидов мембраны и их ненасыщенности, с другой—ПОЛ изменяет состав фосфолипидов мембраны, липид-липидные, липид-белковые взаимодействия, следовательно, ее ригидность, структуру.

Е. Б. Бурлаковой выдвинута гипотеза регуляции ПОЛ по принципу отрицательной обратной связи системой природных антиоксидантов [3].

Ранее нами было установлено усиление ПОЛ в тканях при иммобилизационном стрессе и шуме [5]. С целью профилактики и устранения нарушений метаболизма, вызванных интенсификацией ПОЛ, была намечена антиоксидантная терапия α -токоферолом и нонолом. В регуляции интенсивности свободнорадикального окисления существенное

значение имеют доза и природа антиоксиданта. Целью данного исследования является определение интенсивности ПОЛ, содержания витамина Е, активности ферментов антирадикальной защиты клетки на фоне введения α -токоферола и ионола.

Материал и методика

Опыты проводили на белых крысах-самцах массой 100—150 г. Животные были разделены на 4 группы: I группа—интактные крысы; животным II группы внутрибрюшинно однократно вводили α -токоферол-ацетат в дозе 1 мг/кг массы (крыс забивали через 2,5, 24, 48 часов после инъекции); животным III группы вводили внутрибрюшинно однократно α -токоферолацетат в дозе 50 мг/кг массы (крыс забивали через 2,5 часа после инъекции); крысам IV группы внутрибрюшинно в течение четырех дней ежедневно вводили ионол в дозе 120 мг/кг массы (животных забивали через 2,5, 24, 48 часов после последней инъекции).

Ткани тщательно перфузировали охлажденным 0,15 М KCl. Все операции проводили на холоду. Эритроцитарные мембраны выделяли по методу Limber [8]. Активность систем ПОЛ определяли по накоплению малонового диальдегида за 30 минут инкубации [1].

При исследовании аскорбатзависимого перекисления инкубационная среда содержала 40 мМ трис-HCl (pH 7,4), 0,8 мМ аскорбата, $12 \cdot 10^{-6}$ М соли Мора; в случае НАДФН-зависимого ПОЛ— $2 \cdot 10^{-4}$ М пироглутата натрия, $12 \cdot 10^{-6}$ М соли Мора, 1 мМ НАДФН. Содержание липидных перекисей выражали в ммоль малонового диальдегида на мг белка. Для расчета использовали коэффициент молярной экстинкции— $1,56 \cdot 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ см}^{-1}$ [7].

Активность супероксиддисмутазы (СОД) определяли по ингибированию генерации супероксидных анионов в модели: феназинметосульфат-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% [10]. Пересчет единиц активности производили на мг белка гомогената. Для определения активности глутатионпероксидазы и глутатионредуктазы ткань гомогенизировали в 0,154 М KCl, 10% гомогенат обрабатывали тритоном X-100 с конечной концентрацией 0,1%. Активность глутатионпероксидазы и глутатионредуктазы определяли по методу, описанному нами ранее [4] и выражали соответственно: количеством ммоль восстановленного глутатиона, окисленного за 1 мин на 1 мг белка, и количеством ммоль НАДФН, окисленного за 1 мин на 1 мг белка. Содержание белка определяли по методу Lowry [9]. Содержание витамина Е в тканях определяли флуорометрически по методу Duggan с максимумом возбуждения при 295 нм и максимумом флуоресценции при 340 нм [6].

Результаты и обсуждение

Как видно из рис. 1а, при введении α -токоферолацетата в дозе 1 мг/кг массы уровень α -токоферола в плазме крови через 2,5 часа по-

сле инъекции возрастает, через 24 часа продолжает оставаться высоким и через 48 часов возвращается к исходному значению. В печени и мозге через 2,5 часа содержание α -токоферола увеличивается, а через 48 часов резко падает (на 58 и 67% соответственно). При введении животным α -токоферолацетата в дозе 50 мг/кг содержание витамина Е в плазме не изменяется и повышается в печени, мозге и эритроцитарной мембране.

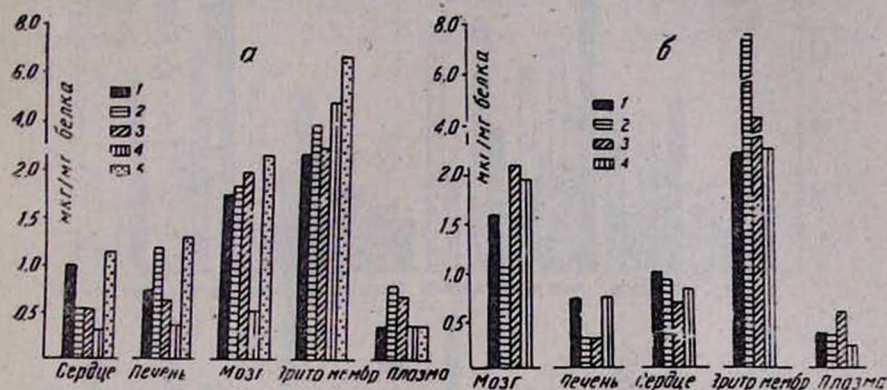


Рис. 1. а. Уровень α -токоферола в тканях крыс в мкг/мг белка при введении α -токоферолацетата в дозе 1 и 50 мг/кг. 1. Контроль. 2. Через 2,5 часа после инъекции (1 мг/кг). 3. Через 24 часа после инъекции (1 мг/кг). 4. Через 48 часов после инъекции (1 мг/кг). 5. Через 2,5 часа после инъекции (50 мг/кг). б. Уровень α -токоферола в тканях крыс в мкг/мг белка при введении инола в дозе 120 мг/кг. 1. Контроль. 2. Через 2,5 часа после инъекции. 3. Через 24 часа после инъекции. 4. Через 48 часов после инъекции.

Ткани сердца реагируют на введение α -токоферолацетата анти-батно указанным тканям—содержание витамина Е в них через 2,5 и 24 часа снижается в 1,8 раза, а через 48 часов—в 3,4 раза. При введении более высокой дозы α -токоферолацетата (50 мг/кг) уровень витамина Е в сердце повышается в 1,17 раза (рис. 1 а). Однако α -токоферол-ацетат в дозе 1 мг/кг снижает интенсивность как ферментативного, так и неферментативного ПОЛ в сердце, а в дозе 50 мг/кг, наоборот, значительно активизирует его (рис. 2 а). Поэтому для антиоксидантной терапии стресса мы считаем целесообразным применение дозы 1 мг/кг.

При применении синтетического антиоксиданта—инола количество витамина Е в тканях сердца также снижается; но с меньшей интенсивностью (рис. 1 б). В отдельных тканях (мозг, печень, плазма) содержание α -токоферола возрастает после предварительного снижения (рис. 1 б). В эритроцитарной мембране как при введении α -токоферолацетата, так и инола уровень витамина Е значительно превышает контрольный во все сроки эксперимента (рис. 1 а, б). Таким образом, витамин Е в большей степени аккумулируется в эритроцитах. ПОЛ в тканях при введении α -токоферолацетата в дозе 1 мг/кг в основном ингибируется (рис. 2 а). Исключение составляет аскорбатзависимое ПОЛ для эритроцитарной мембраны и НАДФН-зависимое для печени спустя 2,5 часа после инъекции.

Однако α -токоферолацетат в дозе 50 мг/кг значительно активизирует как ферментативный, так и неферментативный путь ПОЛ в эритроцитарной мембране и сердце (рис. 2 а).

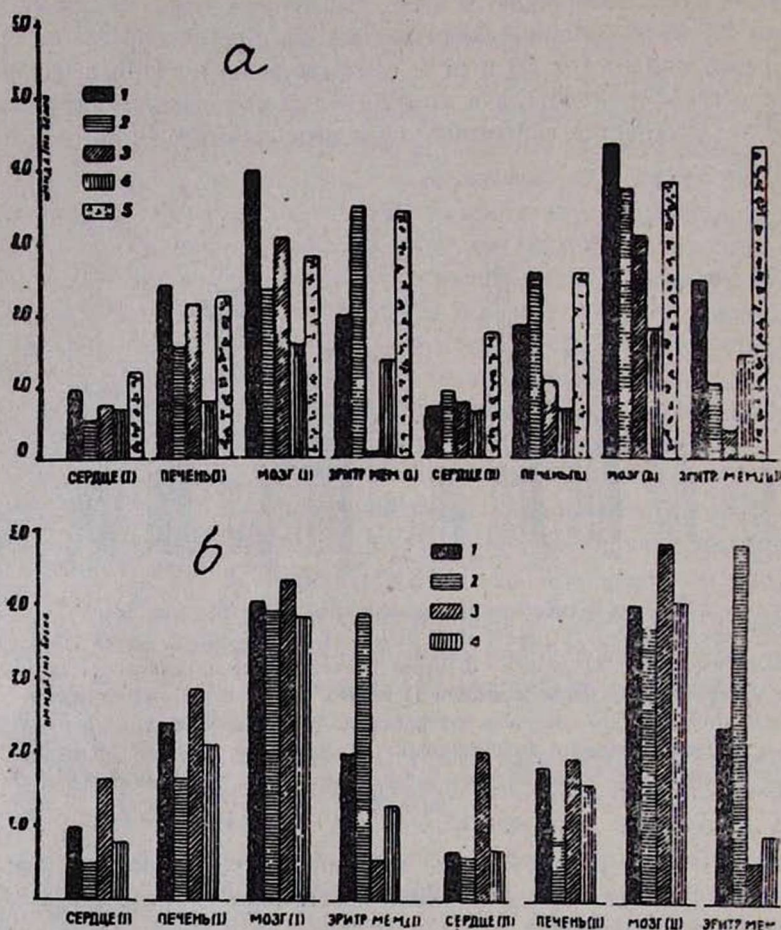


Рис. 2. а. Уровень неферментативного (I) и ферментативного (II) ПОЛ в нмоль малонового диальдегида на мг белка в тканях крыс при введении α -токоферолацетата в дозе 1 и 50 мг/кг. 1. Контроль. 2. Через 2,5 часа после инъекции (1 мг/кг). 3. Через 24 часа после инъекции (1 мг/кг). 4. Через 48 часов после инъекции (1 мг/кг). 5. Через 2,5 часа после инъекции (50 мг/кг). б. Уровень неферментативного (I) и ферментативного (II) ПОЛ в нмоль малонового диальдегида на мг белка в тканях крыс при введении ионола в дозе 120 мг/кг. 1. Контроль. 2. Через 2,5 часа. 3. Через 24 часа. 4. Через 48 часов.

Регулирующее воздействие синтетического антиоксиданта ионола на интенсивность процесса перекисления липидов проявляется в меньшей мере по сравнению с α -токоферолом. Ионол в основном понижает уровень липоперекисей в тканях, но, как правило, в один из сроков эксперимента наблюдается интенсификация ПОЛ (рис. 2б).

В работах Е. Б. Бурлаковой [2] показано, что токоферол и ионол, введенные интактным животным, повышают антиокислительную ак-

тивность липидов тканей. Механизмы действия в каждом отдельном случае неоднотипны, что объясняется более низкой антирадикальной активностью синтетического антиоксиданта.

Интересны взаимоотношения активности СОД и уровня α -токоферола в тканях. В сердце, печени и мозге интактных животных обнаружена обратная зависимость между количеством витамина Е и активностью СОД (рис. 1 а, 3). Эта зависимость выражается в возможности непосредственной регуляции (срочной или длительной) витамином Е активности СОД или регуляции, опосредованной через изменение концентрации липоперекисей. Учитывая, что при введении как естественного, так и синтетического антиоксиданта активность СОД в тканях в основном ингибирована (рис. 3), более вероятной представляется ее регуляция исходным уровнем липидных перекисей.

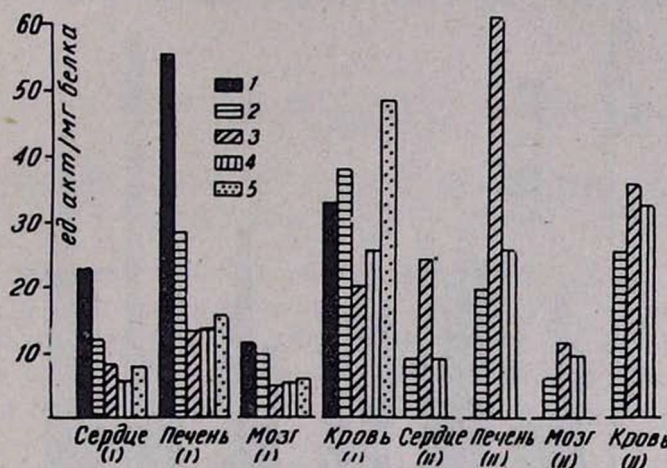


Рис. 3. Активность СОД в тканях белых крыс при введении α -токоферол-ацетата (I) в дозе 1 и 50 мг/кг или нонола (II)—120 мг/кг. 1. Контроль. 2. Через 2,5 часа после инъекции α -токоферолаацетата в дозе 1 мг/кг или нонола в дозе 120 мг/кг. 3. Через 24 часа после инъекции α -токоферолаацетата в дозе 1 мг/кг или нонола в дозе 120 мг/кг. 4. Через 48 часов после инъекции α -токоферолаацетата в дозе 1 мг/кг или нонола в дозе 120 мг/кг. 5. Через 2,5 часа после инъекции α -токоферолаацетата в дозе 50 мг/кг.

Активность ферментной системы глутатионпероксидазы и глутатионредуктазы, устраняющей перекиси, изменяется волнообразно (рис. 4 а, б). В зависимости от срока эксперимента повышение активности ферментов сменяется ингибированием.

Итак, обнаруженная нами возможность регуляции ПОЛ у интактных животных изученными антиоксидантами в указанных дозах дает основание для применения их в условиях стресса.

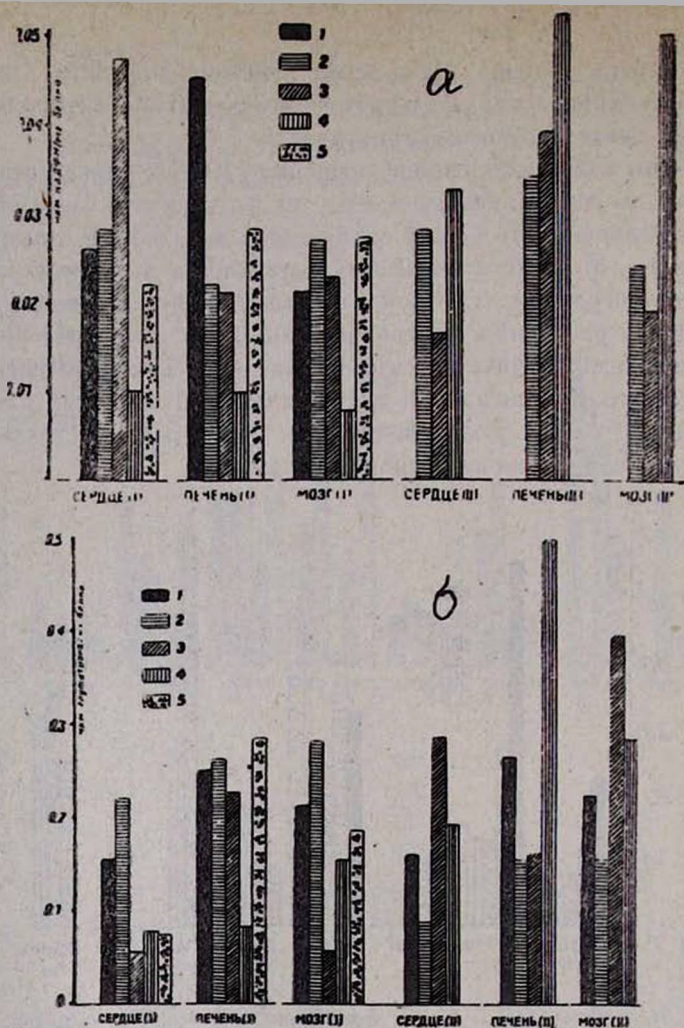


Рис. 4. а. Активность глутатионредуктазы в тканях белых крыс при введении α -токоферолацетата (I) в дозе 1 и 50 мг/кг или инола (II) в дозе 120 мг/кг в мкм НАДФН/мг белка. 1. Контроль. 2. Через 2,5 часа после инъекции α -токоферолацетата в дозе 1 мг/кг или инола в дозе 120 мг/кг. 3. Через 24 часа после инъекции α -токоферолацетата в дозе 1 мг/кг или инола в дозе 120 мг/кг. 4. Через 48 часов после инъекции α -токоферолацетата в дозе 1 мг/кг или инола в дозе 120 мг/кг. 5. Через 2,5 часа после инъекции α -токоферолацетата в дозе 50 мг/кг. б. Активность глутатионпероксидазы в тканях белых крыс при введении α -токоферолацетата (I) в дозе 1 и 50 мг/кг или инола (II) в дозе 120 мг/кг в мкм глутатиона на мг белка. 1. Контроль. 2. Через 2,5 часа после инъекции α -токоферолацетата в дозе 1 мг/кг или инола в дозе 120 мг/кг. 3. Через 24 часа после инъекции α -токоферолацетата в дозе 1 мг/кг или инола в дозе 120 мг/кг. 4. Через 48 часов после инъекции α -токоферолацетата в дозе 1 мг/кг или инола в дозе 120 мг/кг. 5. Через 2,5 часа после инъекции α -токоферолацетата в дозе 50 мг/кг.

Ցույց է տրված, որ α -տոկոլոֆերիլացետատի 1 մգ/կգ և իոնոլի 120 մգ/կգ քանակների ներմուծումից 2,5 և 24 ժամ հետո բարձրանում է ինտակտ առնետների հյուսվածքներում E վիտամինի քանակը, որը 48 ժամ հետո իջնում է նախնական մակարդակի կամ անգամ նրանից ցածր: Բացառություն է կազմում սիրտը, որտեղ փորձի բոլոր ժամկետներում նրա քանակը նախնականից ցածր է:

Հակաօքսիդանտները ճնշում են լիպիդների ֆերմենտային և ոչ ֆերմենտային դերոքսիդացման պրոցեսը, կարգավորում սուպերօքսիդդիսմուտազայի, գլուտատիոնդեհուկտազայի և գլուտատիոնպերօքսիդազայի ակտիվությունը:

Ստացված արդյունքները թույլ են տալիս առաջարկել հակաօքսիդանտների նշված քանակների օգտագործումը ստրեսային պայմաններում:

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

THE INTERRELATION BETWEEN ANTIOXIDANTS AND LIPID PEROXIDATION PROCESSES

It is determined that α -tocopherolacetate in 1 mg/kg dose and ionole in 120 mg/kg dose increase the vitamin E content in the intact rats tissues in 2,5 and 24 hours after administration; after 48 hours its level comes up to the control one or lower. The exception is the heart where the vitamin E content is lower than the control one during the experiment.

The antioxidants inhibit the enzymatic and non-enzymatic lipid peroxidation processes intensity, regulate the superoxiddismutase, glutathione reductase and glutathione peroxidase activities.

The data obtained allow to use the mentioned doses of the antioxidants in the prophylaxis of stresses.

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., Алесенко А. В., Молочкина Е. М. В сб.: Биоантиоксиданты в лучевом поражении и злокачественном росте. М., 1975, стр. 54.
3. Бурлакова Е. Б., Кухгина Е. Н., Храпова Н. Г., Аристрахова С. А. Биохимия, 1982, 47, 5, стр. 822.
4. Микаелян Э. М., Мелконян М. М., Мелик-Агаева Е. А., Мхитарян В. Г. Ж. эксперим. и клин. мед. АН Арм. ССР, 1979, XIX, 5, стр. 11.
5. Мхитарян В. Г., Араратян Э. А., Микаелян Э. М., Мелконян М. М. Ж. эксперим. и клин. мед. АН Арм. ССР, 1977, XVII, 5, стр. 13.
6. Duggan D. E. Arch. Biochem. Biophys., 1959, 84, 116.
7. Hochstein P., Ernster L. Biochem. and Biophys. Res. Commun., 1963, 12, 388.

8. Limber G. K., Davis R. F., Bakerman S. Blood, 1970, 36, 111.
9. Lowry O. H., Rosebrugh N. I., Faur A. L., Randall R. I. J. Biol. Chem., 1951, 193, 265.
10. Morimitsu Nishikimi, N. Appaji Rao, Kuntio Jagi Biochem. Biophys. Res. Commun., 1972, 46, 3, 849.

УДК 615.332.038.074:612.11/12

А. А. НАВАСАРДЯН

О СВЯЗЫВАНИИ ГЕНТАМИЦИНА С БЕЛКОВЫМИ ФРАКЦИЯМИ СЫВОРОТКИ КРОВИ

В экспериментальных условиях изучен характер связывания гентамицина с сывороточными белковыми фракциями как в интактном, так и в иммунном организме. Установлено, что препарат в организме связывается как с альбуминами, так и глобулинами, однако степень связывания его с глобулиновыми фракциями значительно выше и находится в строгой зависимости от фаз развития иммунитета.

Широкое внедрение в практику антибиотиков обогатило арсенал антибактериальных средств борьбы с инфекцией, однако наряду с огромным положительным действием антибиотиков в настоящее время обнаружены факты их негативного действия на различные физиологические отправления организма, в частности на иммунитет.

Выяснению механизма нарушения иммуногенеза посвящено множество работ [3, 6, 7, 12, 13, 17 и др.], однако некоторые вопросы фармакокинетики антибиотиков в организме, касающиеся выяснения закономерностей распределения и связывания их с различными биосубстратами, сроков сохранения на фоне иммунологических перестроек, изучены недостаточно и в настоящее время решение этих вопросов сохраняет свою актуальность.

По имеющимся литературным данным [1, 4, 5, 8—10, 14—16, 19, 21, 23], значительная часть введенного в организм антибиотика в органах и тканях образует с клеточными субстанциями комплексные связи различного характера, при этом особое значение придается связыванию антибиотиков с белками сыворотки крови.

Белкам крови принадлежит огромная роль в осуществлении многообразных физиологических отправлений организма. Особо следует отметить их роль в доставке различных питательных и лекарственных веществ к клеткам органов и тканей, где они комплексуются с различными клеточными субстанциями.

По мнению ряда авторов [2, 11, 12, 18, 20, 22 и др.], пенициллин и полусинтетические препараты связываются только с альбуминами, антибиотики тетрациклинового ряда—со всеми сывороточными белковыми фракциями, мономицин—главным образом с альбуминами, а стрептомицин—с альбуминами и гамма-глобулинами. Однако вопрос связывания антибиотиков с белками сыворотки крови в настоящее время нельзя считать полностью решенным.