

THE EFFECT OF ACUTE ALCOHOL INTOXICATION ON REFLEX REACTIONS OF THE SPINAL CORD

On the background of acute alcohol intoxication various reflex reactions have been studied. It has been revealed that the administration of alcohol induces in cats the lengthening of latent periods as compared with the control group as well as diminishes the amplitude of monosynaptic response.

Thus, it is concluded that alcohol highly effects the reflex function of the spinal cord.

ЛИТЕРАТУРА

1. Сегал Б. М. Алкоголизм. 1967.
2. Сытинский И. А. Природа, 1974, 12, стр. 43.
3. Сытинский И. А. Успехи физиологических наук, 1975, 6, стр. 49.
4. Brown O. M., Post M. E., Mallov S. J. of Studies on Alcohol., 1977, 38, 3, 603
5. Carmichael F. J., Israei Y. The J. of Pharmacology and Experimental Therapeutic, 1975, 193, 3, 824.
6. Chrosielewski E., Pfeiffer J. J. of Forensic Medicine. 1966, 13, 4, 144.
7. Gallego A. J. Cellular and Comparative Physiology, 1948, 31, 97.
8. Israel Y., Kalant H. J. Biochem. Pharmac., 1965, 14, 1803.
9. Kalant H., Israel V., Mahon M. A. Canadian J. of Physiology and Pharmacology, 1967, 45, 172.
10. Kalant H., Mons W., Mahon M. A. Canadian J. of Physiology and Pharmacology, 1966, 44, 1, 1.
11. Knutsson E. Acta Physiologica Scandinavica, 1961, 52, 242.
12. Knox W. H., Perrin R. G., Sen P. K. J. of Neurochemistry, 1972, 19, 2881.

УДК 612.12:612.015.32+612.821

Э. М. МИКАЕЛЯН, А. Л. ШАЛДЖЯН, В. Г. МХИТАРЯН

ПЕРЕКИСНОЕ ОКИСЛЕНИЕ ЛИПИДОВ В ЭРИТРОЦИТАРНЫХ МЕМБРАНАХ И КРОВИ ПРИ СТРЕССЕ

Установлено, что при иммобилизационном стрессе понижается исходный уровень перекисного окисления липидов (ПОЛ) в плазме крови и активируется индуцируемый аскорбат- и НАДФН-зависимый путь ПОЛ в эритроцитарных мембранах. Интенсификация ПОЛ повышает затраты витамина Е, что приводит к снижению его концентрации в крови и эритроцитарных мембранах. В тех же условиях эксперимента в крови существенно ингибируется супероксиддисмутаза (СОД) и появляется ферментемия—повышается в плазме крови активность глюкозо-6-фосфатдегидрогеназы и суммарной пероксидазной активности. Отмечается активирование Na^+ , K^+ -АТФ-азы и снижение активности Mg^{2+} -АТФ-азы эритроцитарных мембран.

В настоящее время внимание широкого круга исследователей привлекает проблема регуляторной роли перекисного окисления липидов в реализации структуры и функции биомембран. Мембрана—многоком-

понентная система, в которой структурная организация и функции тесно взаимосвязаны. Структурная организация биомембран зависит от физико-химических свойств и состава ее основных компонентов—липидов и белков, а также от липидбелковых взаимодействий. Уровень биоантиоксидантов, состав липидов биомембран и скорость их окислительных реакций взаимосвязаны [9]. Окисленные мембранные липиды легче атакуются фосфолипазами, что способствует их удалению из мембран и изменению качественного и количественного состава фосфолипидов.

Регуляция клеточного метаболизма липидами мембран частично осуществляется посредством мембраносвязанных ферментов. На сегодня известен целый ряд липидзависимых и перекисезависимых ферментов, для которых отдельные липиды или продукты их окисления выступают в качестве аллостерических эффекторов [2]. С другой стороны, известно, что мембранные липиды играют существенную роль в регуляции ионной проницаемости биомембран. Наряду с белками липиды в результате фазовых превращений принимают участие в формировании сквозных ионных каналов в мембранах [1].

В настоящей работе нами было изучено перекисное окисление липидов в эритроцитарных мембранах и плазме крови при иммобилизационном стрессе, а также взаимосвязь интенсивности этого процесса с уровнем антиоксиданта α -токоферола, активностью липидзависимого фермента нон-транспортной АТФ-азы, глюкозо-6-фосфатдегидрогеназы и суммарной пероксидазной активностью плазмы крови (СПА).

Материал и методика

Опыты ставили на 80 беспородных белых крысах-самцах массой 120—150 г. Животные были разделены на две экспериментальные группы: I—контрольная—интактные животные, II—опытная—животные с иммобилизационным стрессом (ИМО).

Крыс иммобилизовали ежедневно в течение 150 минут фиксации головы и конечностей. Число иммобилизаций от одной до семи.

Эритроциты освобождали от плазмы и клеток белой крови центрифугированием. Мембраны эритроцитов выделяли по методу Limber [15].

Содержание витамина Е в эритроцитарных мембранах и плазме крови определяли флуорометрически по методу Duggan с максимумом возбуждения при 295 нм и максимумом флуоресценции при 340 нм [10]. Белок определяли по методу Lowry [16]. Количество витамина Е выражали в мкг на мг белка.

Ферментативное—НАДФН-зависимое и неферментативное—аскорбат-зависимое индуцированное перекисное окисление липидов (ПОЛ) определяли по уровню одного из его конечных продуктов малонового диальдегида по цветной реакции с тиобарбитуровой кислотой. Объем инкубационной среды—1,2 мл, время инкубации—30 минут при температуре 37°C.

Инкубационная среда для аскорбат-зависимого ПОЛ включала 0,3 мл 40 мМ трис-НСI (рН 7,4), 0,3 мл 0,8 мМ аскорбата, 0,3 мл $12 \cdot 10^{-6}$ М соли Мора; для ферментативного ПОЛ—0,3 мл $2 \cdot 10^{-4}$ М пирифосфата натрия, 0,3 мл $12 \cdot 10^{-6}$ М соли Мора, 0,3 мл 1 мМ НАДФН. В обоих случаях добавлялось 0,3 мл взвеси эритроцитарных мембран, содержащих в среднем 1—1,5 мг белка.

Исходный уровень ПОЛ в плазме крови определяли добавлением к 0,5 мл 2,5 мл 20% раствора трихлоруксусной кислоты и 1 мл 0,67% раствора тиобарбитуровой кислоты с последующим кипячением на водяной бане в течение 30 минут.

После охлаждения к исследуемой пробе добавляли 4 мл бутанола, затем встряхивали и центрифугировали. ТБК-окрашенные продукты определяли в бутанольном слое [13]. Содержание липидных перекисей выражали в *нмоль* малонового диальдегида на *мг* белка. Для расчета использовали коэффициент молярной экстинкции $1,56 \cdot 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ см}^{-1}$.

Активность супероксиддисмутазы в крови (СОД) определяли по ингибированию генерации супероксидных анион-радикалов в модели ферразинметосульфат-НАДН-нитротетразолий синий. За единицу активности СОД принимали такое количество ее раствора, которое при добавлении к модельной системе, генерирующей супероксидный анион-радикал, подавляет его генерацию на 50%. Пересчет единиц активности производили на *мг* белка [4].

Активность глюкозо-6-фосфатдегидрогеназы в плазме крови определяли спектрофотометрически по увеличению интенсивности поглощения при 340 *нм* за первые 5 минут инкубации при комнатной температуре. Инкубационная среда содержала 0,2 мл плазмы крови, 0,2 мл 1 М MgSO_4 , 1 мл 0,3 М трис-НСI (рН 7,8), 0,2 мл 2 М НАДФ, 0,4 мл 0,02 М глюкозо-6-фосфата. Активность фермента выражали в *мкМ* НАДФН на 1 *мг* белка в минуту [3].

Суммарной пероксидазной активностью (СПА) обладает комплекс гемоглобина с α -гликопротеидом плазмы крови—гаптоглобином. Этот комплекс образуется в результате внутрисосудистого гемолиза эритроцитов или повышения проницаемости эритроцитарных мембран и выхода гемоглобина в плазму. Комплекс гемоглобина с гаптоглобином как крупнодисперсный не фильтруется в почках и тем самым предохраняет их от токсического воздействия гемоглобина. Этот комплекс захватывается и разрушается ретикулоэндотелиальными клетками, железо вновь используется для синтеза гемоглобина. Повышение суммарной пероксидазной активности в плазме крови косвенно указывает на изменение проницаемости эритроцитарных мембран. В основе метода определения пероксидазной активности лежит способность гемопротеидов в присутствии пероксида катализировать окисление бензидина с образованием окрашенных продуктов.

Проба для определения СПА содержала 0,02 мл плазмы крови, 2 мл ацетатного буфера (рН 4,6), 1 мл 1% раствора бензидинхлорида, приготовленного на ацетатном буфере (рН 4,6), 1 мл 0,3% раствора перекиси водорода. Величину оптической плотности определяли при

600 нМ, активность выражали в единицах оптической плотности на 1 мл плазмы крови [5].

Инкубационная среда для определения суммарной АТФ-азы эритроцитарных мембран содержала 30 мМ трис-НСl-буфера (рН 7,4), 4,5 мМ $MgCl_2$, 3 мМ АТФ-трис, 100 мМ NaCl, 20 мМ KCl.

Инкубационная среда для определения Mg^{2+} -АТФ-азы имела тот же состав и 0,1 мМ оуабайна.

Активность Na^+ , K^+ -АТФ-азы определяли по разнице между суммарной АТФ-азной активностью и активностью Mg^{2+} -АТФ-азы [6]. Реакцию начинали, внося в инкубационную среду ферментный препарат в количестве 2,5—3 мг белка эритроцитарных мембран. Содержание фосфора определяли по Fiske, Subbarow [11]. Активность фермента выражали в мкмоль фосфора на мг белка.

Результаты и обсуждение

Нами установлено, что при иммобилизационном стрессе в эритроцитарных мембранах значительно активируется аскорбат- и НАДФН-зависимый путь индуцируемого перекисного окисления липидов (рис. 1).

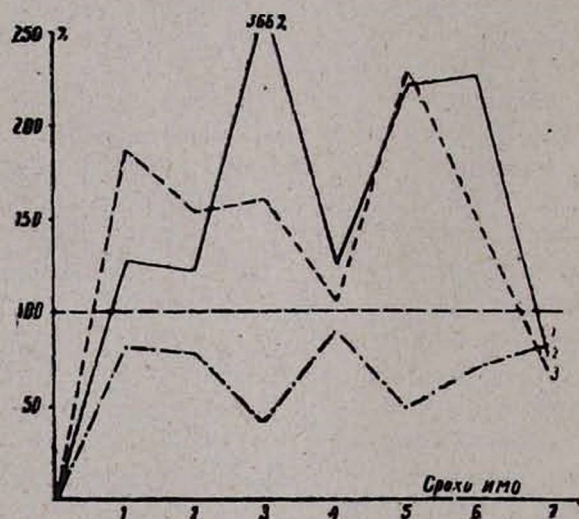


Рис. 1. Перекисное окисление липидов в эритроцитарных мембранах и плазме крови при иммобилизационном стрессе (в процентах по отношению к контролю). Условные обозначения: 1—фоновое ПОЛ в плазме крови, 2—аскорбат-зависимое индуцируемое ПОЛ в эритроцитарных мембранах, 3—НАДФН-зависимое индуцируемое ПОЛ в плазме крови.

Сдвиги носят стандартный характер с пиками на 1-, 3-, 5- и 6-й дни иммобилизации. К 7-й фиксации ПОЛ, наоборот, подавляется, спускаясь несколько ниже контроля. В тех же условиях эксперимента исходный (фоновый) уровень ПОЛ в плазме крови спускается ниже контрольного (рис. 1). Изменения носят фазовый характер с наибольшей выраженностью после 3- и 5-кратной иммобилизации. Сопоставление

по срокам иммобилизации сдвигов ПОЛ в эритроцитарной мембране и плазме крови выявляет их выраженную разнонаправленность (рис. 1). Максимумы уровня липоперекисей в эритроцитарных мембранах в основном совпадают с минимумами в плазме крови.

Аналогичная разнонаправленность в сдвигах исходного и индуцированного ионами Fe^{2+} ПОЛ в эритроцитарных мембранах установлена другими авторами у десимпатизированных животных [7].

Изменения в липидном обмене затрагивают также антиоксидантную систему. Содержание витамина Е как в плазме, так и в эритроцитарной мембране становится ниже контрольного уровня во все сроки иммобилизационного стресса (рис. 2 и 3).

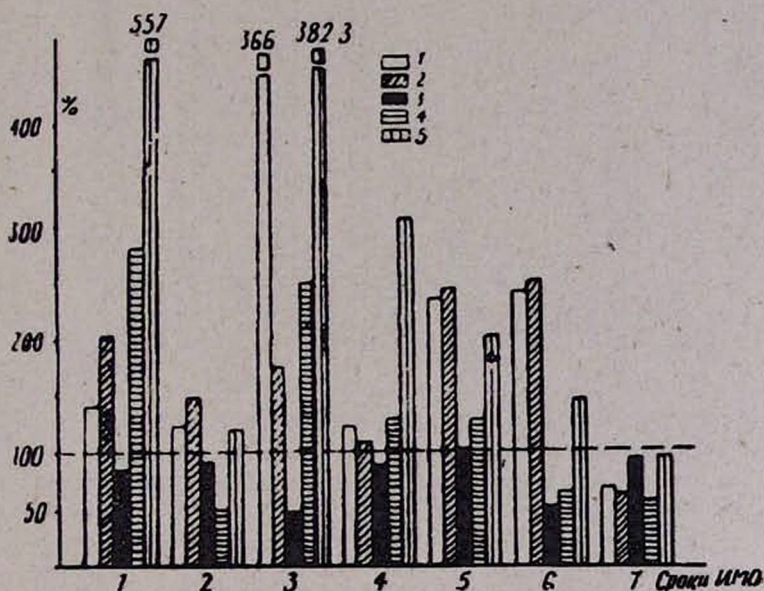


Рис. 2. Перекисное окисление липидов, содержание витамина Е, активность нон-транспортной АТФ-азы в эритроцитарных мембранах при иммобилизационном стрессе (в процентах по отношению к контролю). Условные обозначения: 1—аскорбат-зависимое индуцируемое ПОЛ, 2—НАДФН-зависимое индуцируемое ПОЛ, 3—витамин Е, 4—суммарная АТФ-аза, 5—Na, K-АТФ-аза.

Супероксиддисмутаза крови—фермент, предотвращающий неферментативную дисмутацию супероксидного аниона-радикала и тем самым устраняющий агрессивные формы кислорода, при иммобилизационном стрессе существенно ингибируется в пределах от 20 до 50% (рис. 3). Увеличение содержания активных форм кислорода-гидроксидного радикала и синглетного кислорода, естественно, приводит к интенсификации перекисного окисления липидов в эритроцитарных мембранах. Активирование ПОЛ и уменьшение запасов витамина Е становятся причиной структурно-функциональных изменений эритроцитарных мембран. Боковая углеводородная цепь α -токоферола принимает активное участие в плотности упаковки липидной фазы биомембраны, поэтому сдвиги в уровне биоантиоксиданта вызывают в ней структурные

и вытекающие из них функциональные переходы. Интенсификация ПОЛ изменяет фосфолипидный состав мембран, липид-липидные и белок-липидные соотношения. Нами был изучен мембраносвязанный липидзависимый фермент—ион-транспортная АТФ-аза эритроцитарных мембран.

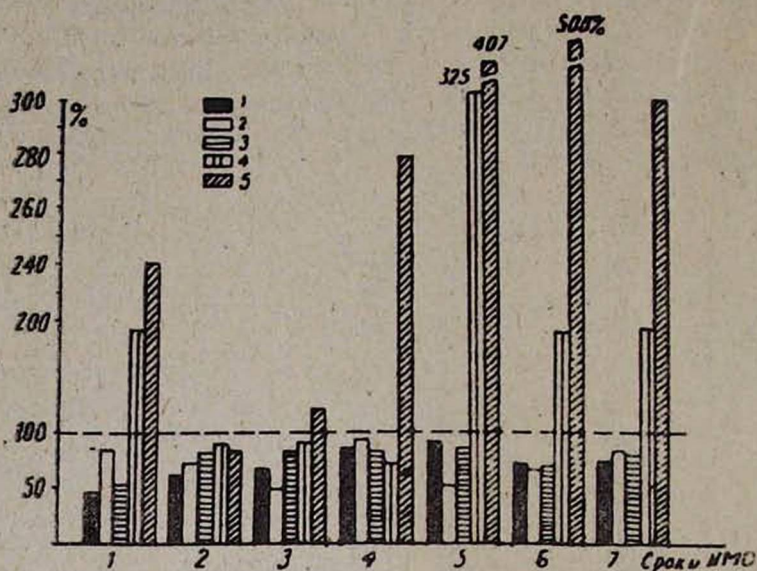


Рис. 3. Фоновое ПОЛ, содержание витамина Е, активность СОД, глюкозо-6-фосфатдегидрогеназы, суммарной пероксидазной активности в крови при иммобилизационном стрессе (в процентах по отношению к контролю). Условные обозначения: 1—витамин Е, 2—ПОЛ, 3—активность СОД, 4—СПА, 5—глюкозо-6-фосфатдегидрогеназа.

Суммарная ион-транспортная АТФ-аза эритроцитарных мембран включает в себя два компонента: Na^+ , K^+ -АТФ-азу, ингибируемую оубаином, и Mg^{2+} , Ca^{2+} -АТФ-азу, нечувствительную к нему.

Функционирование ион-транспортных систем контролируется липидным окружением, так как ферментативной активностью обладает лишь липид-белковый комплекс.

Na^+ , K^+ -АТФ-аза, осуществляющая Na -зависимое фосфорилирование и K -зависимое дефосфорилирование, требует для своей активности присутствия фосфатидилсерина. Mg^{2+} -зависимая— Ca^{2+} стимулируемая АТФ-азная система конформационно связана с фосфатидилхолиновым окружением [14].

Механизм действия липидов на ион-транспортные АТФ-азы пока до конца не изучен. Полная делипидация препарата приводит к утере ферментативной способности транспорта ионов. Предполагают, что полная делипидация нарушает четвертичную структуру фермента.

Фосфолипиды, триглицериды и холестерин в различном соотношении приводят к разной степени олигомеризации протомеров АТФ-аз в мембране [8].

Другая точка зрения предполагает, что фосфолипиды регулируют место связывания K^+ и АДФ в АТФ-азе [12].

Как показали наши исследования, интенсификация ПОЛ и соответствующие сдвиги метаболизма липидной фазы эритроцитарных мембран при иммобилизационном стрессе существенно влияют на активность ион-транспортных АТФ-аз. Во все сроки иммобилизационного стресса, кроме 7-кратного, значительно активируется Na^+ , K^+ -АТФ-аза. Эффект особенно выражен после 1, 3 и 4-разовой иммобилизации, когда активность фермента превосходит контрольный уровень в 3—5,5 раза (рис. 2). Mg^{2+} -зависимая АТФ-аза в основном ингибирована, за исключением 3 и 5-разовой фиксации. Сдвиги в активности суммарной АТФ-азы зависят от суммирования разнонаправленных изменений отдельных ион-транспортных систем (рис. 2).

Можно предположить, что активирование ПОЛ при стрессе изменяет фосфолипидное окружение фермента в мембране и, как следствие, его активность. Изменения активности ион-транспортных АТФ-аз порождают сдвиги в концентрационном градиенте Na^+ , K^+ , Ca^{2+} между внеклеточной средой и эритроцитом и зависимыми процессами. Указанные сдвиги понижают устойчивость эритроцитарных мембран, повышают их проницаемость, что проявляется в ферментемии. В плазме крови при иммобилизационном стрессе значительно повышается активность глюкозо-6-фосфатдегидрогеназы и СПА (рис. 3). Этот факт свидетельствует о значительных структурных изменениях в эритроцитарных мембранах, обусловленных интенсификацией перекисного окисления липидов при стрессе.

Кафедра биохимии Ереванского медицинского института

Поступила 8/VII 1983 г.

Է. Մ. ՄԻՔԱՅԷԼՅԱՆ, Ա. Լ. ՇԱԶՅԱՆ, Վ. Գ. ՄԻԻՔԱՐՅԱՆ

ԷՐԻԹՐՈՑԻՏՆԵՐԻ ԹԱՂԱՆԹՆԵՐՈՒՄ ԵՎ ԱՐՅԱՆ ՄԵԶ ԼԻՊԻԴՆԵՐԻ
ԳԵՐՈՔՍԻԴԱՅՈՒՄԸ ՍՏՐԵՍԻ ՊԱՅՄԱՆՈՒՄ

Ցույց է տրված, որ իմոբիլիզացիոն ստրեսի պայմանում արյան պլազմայում իջնում է լիպիդային գերօքսիդացման ելակետային մակարդակը, էրիթրոցիտների թաղանթներում բարձրանում է ասկորբատ և NADPH-կախում ունեցող լիպիդային գերօքսիդացման ինտենսիվությունը և մեծանում վիտամին E-ի ծախսը, որի հետևանքով նրա քանակը նվազում է արյան մեջ և էրիթրոցիտների թաղանթում: Նույն պայմաններում զգալիորեն արգելակվում է արյան սուպերօքսիդդիամուտազի ակտիվությունը, բարձրանում արյան պլազմայում գլյուկոզա-6 ֆոսֆատդեհիդրոգենազ և պերօքսիդի ակտիվությունը: Էրիթրոցիտների թաղանթներում Na^+ , K^+ -ATP-ազի ակտիվությունը բարձրանում է, իսկ Mg^{2+} -ATP-ազինը՝ իջնում:

THE LIPID PEROXIDATION IN THE ERYTHROCYTE MEMBRANES AND BLOOD AT THE STRESS

It was established, that at the immobilization stress conditions the lipid peroxidation initial level was decreased while the intensity of both ascorbate and NADPH-dependent lipid peroxidation processes was increased. The level of vitamin E in the blood and erythrocyte membranes was decreased because of its great using.

In the same conditions the superoxiddismutase activity was markedly inhibited when the blood plasma glucose-6-phosphate dehydrogenase and peroxidase activities were increased.

Na^+ , K^+ -ATP-ase activity was increased in the erythrocyte membranes, and Mg^{2+} -ATP-ase activity was decreased.

Л И Т Е Р А Т У Р А

1. Антонов В. Ф. Липиды и ионная проницаемость. М., 1982.
2. Бурлакова Е. Б., Джалайлова Т. и др. Биоантиокислители в регуляции метаболизма в норме и патологии. М., 1982.
3. Захарян Ю. Л. Лаб. дело, 1976, 6, стр. 327.
4. Мхитарян В. Г., Бадалян Г. Е. Ж. exper. и клин. мед. АН Арм. ССР, 1978, XVIII, 6, стр. 7.
5. Покровский А. А. Биохимические методы исследования в клинике. М., 1969, стр. 349.
6. Цильмер М. К., Тарве У. С. Укр. биохим. ж., 1975, 47, 4, стр. 458.
7. Чернышева Г. В., Собиева З. И. и др. Бюлл. exper. биол. и мед., 1982, 1, стр. 36.
8. Швец В. И., Щеглова М. В. и др. В кн.: Липиды биологических мембран. Тезисы докладов Всесоюз. симпозиума. Ташкент, 1980, стр. 145.
9. Burlacova E. B. et al. Biophys. and Biochem. Inform. Trans. in Recog. Plenum Press New-York and London, 1979.
10. Duggan D. E. Arch. Biochem. Biophys., 1959, 84, 116.
11. Fiske C. H., Subbarow J. Biol. Chem., 1925, 66, 375.
12. Jensen S., Ottolenghi P. Biochem. J., 1976, 159, 185.
13. Joshioka, Kawada K., Shimada T., Mori M. Amer. J. Obstet. and Gynecol., 1979, 3, 372.
14. Langer G. A. J. molec. Coll. Cardiol., 1980, 12, 231.
15. Limber G. K., Davis R. F., Bakerman Blood, 1970, 36, 111.
16. Lowry O. H., Rosenbrengh A., Beer K., Raymond F. J. Biol. Chem., 1951, 193, 265.

УДК 615.277.3

В. Н. ЗИЛЬФЯН, В. А. КУМКУМАДЖЯН, Б. С. ФИЧИДЖЯН,
А. К. НЕРСЕСЯН

ВЛИЯНИЕ ТУЛЯРЕМИЙНОЙ ЖИВОЙ
ВАКЦИНЫ НА ИНДУКЦИЮ ОПУХОЛЕЙ

Впервые изучено влияние туляреминой живой вакцины на индукцию опухолей у белых крыс при применении 7,12-диметилбенз(а) антрацена и 3,4-бенз(а) пирена.