

ԳԼՈՒԹԱՄԻՆԱԹԻՎԻ ԱԶԳԵՑՈՒԹՅՈՒՆԸ ԻՄՈՂՆՈՒՈՂԻԱԿԱՆ  
ՏԵՂԱՇԱՐԺԻ ՎՐԱ

Ուսումնասիրվել է գլուտամինաթթվի 50, 100, 200 մգ/կգ դեղաչափերի ազդեցությունը մկենբրի փայծաղի հակամարմինների և «վարդակազոյացման» բջիջների վրա դինամիկայում: Պարզվել է, որ գլուտամինաթթվի տարբեր դեղաչափերը իմունիտետի նշված ցուցանիշների վրա թողել են կարգավորող ազդեցություն:

V. A. SHEKOCYAN, V. S. TOVMASSIAN, K. G. PETROSSIAN, K. Kh. KALASHYAN  
EFFECT OF GLUTAMINE ACID ON IMMUNOLOGIC PROCESSES

The effect of glutamine acid in 50, 100, 200mg/kg on the antibody formation and „rosette“ formation cells in dynamics has been studied. Their modulating effect on the immunologic indices is shown, depending on the dose.

Л И Т Е Р А Т У Р А

1. Морозов К. И. Бюлл. exper. биол. и мед., 1980, 3; с. 7.
2. Сипливая Л. Е., Прокопенко Л. Г. В кн.: Нейрогуморальная регуляция иммунного гомеостаза. Л., 1986, с. 119.
3. Франгулян Л. А., Шекоян В. А., Товмасын В. С. Биол. ж. Армении, 1987, 40, 2, с. 158.
4. Шекоян В. А., Франгулян Л. А. и др. Ж. exper. и клин. мед. АН АрмССР, 1985, 6, с. 556.
5. Ierne N. K., Nordin A. A. Science, 1963, 140, 405.
6. Zaalberg O. B. Nature, 1964, 202, 1231.

УДК 616.155.1 : 612.85

М. М. МЕЛҚОНЯՆ, А. Б. АФРИҚЯՆ, В. Г. МХИТАРЯՆ

АКТИВНОСТЬ ГЛУТАТИОНПЕРОКСИДАЗЫ И  
ГЛУТАТИОНРЕДУКТАЗЫ ЭРИТРОЦИТОВ БЕЛЫХ  
КРЫС В УСЛОВИЯХ АКУСТИЧЕСКОГО СТРЕССА

Показаны выраженные изменения активности глутатионпероксидазы и глутатионредуктазы эритроцитов белых крыс-самцов в условиях акустического стресса. Интенсивность и направленность сдвигов зависят от продолжительности действия шума и статуса  $\alpha$ -токоферола в эритроцитах.

Нашими ранними исследованиями показана роль процессов перекисного окисления липидов (ПОЛ) в механизмах нарушения функций биологических систем при действии шума на организм [1, 3]. Интенсивность этого процесса в животных тканях находится под контролем антиоксидантных систем, из которых наиболее важной является глутатионовая антиперекисная система [2]. В условиях акустического стресса был показан рост уровня липидных перекисей в плазме и эритроцитах, коррелирующий со сниженным уровнем эндогенного жирорастворимого антиоксиданта  $\alpha$ -токоферола ( $\alpha$ -Т) и изменением активности суперок-

сиддисмутазы эритроцитов. Не исключено, что наблюдаемые изменения обусловлены в определенной мере и состоянием глутатионовой ферментативной системы, играющей важную роль в детоксикации активных форм кислорода.

В настоящей работе представлены результаты исследования активности глутатионпероксидазы и глутатионредуктазы эритроцитов белых крыс-самцов в условиях воздействия шума и на фоне профилактического введения  $\alpha$ -токоферолацетата ( $\alpha$ -ТА).

### Материал и методы

Эксперименты выполнены на белых крысах-самцах массой 150—220 г, содержащихся в обычных условиях вивариума. Животные были подразделены на 6 групп: крысы 1-й группы служили контролем, крысы 2—6-й групп подвергали действию шума (91 дБА) с максимальной энергией в области средних и высоких частот. Кроме того, в каждой опытной группе была выделена подгруппа крыс, получавших внутривенно  $\alpha$ -ТА в течение всего эксперимента в дозе 1 мг на 1 кг массы. Сроки действия шума составили 1,8 часов, 7, 28, 56 дней ежедневно по 8 часов.

Активность глутатионпероксидазы и глутатионредуктазы определялась методом Pinto, Bartley [8] с некоторыми модификациями. Глутатионпероксидазную реакцию проводили в инкубационной среде объемом 1 мл, содержащей: 0,2 мл эритроцитарной взвеси, разведенной в 20 раз фосфатным буфером (рН 7,4); 0,2 мл 5 мМ ЭДТА; 0,3 мл 0,01 М GSH; 0,2 мл фосфатного буфера и 0,1 мл гидроперекиси третичного бутила, разведенного в 10 раз. По истечении 30 сек реакцию останавливали, добавляя 1,0 мл 10% ТХУ. В контрольную пробу вместо гидроперекиси третбутила добавляли 0,1 мл дистиллированной воды. Как контрольную, так и опытную пробы центрифугировали в течение 10 мин при 2000 об/мин.

Из надосадочной жидкости брали 1,0 мл супернатанта, переносили в другую пробирку, добавляли 2 мл 0,2 М трис-ЭДТА буфера (рН 8,9); 0,05 мл 0,01 М 5'5' дитиобис (2-нитробензойной кислоты) Sigma (США) и спустя 10 мин колориметрировали на спектрофотометре при  $\lambda$ —412 нм. Активность фермента рассчитывали по разнице в содержании свободных SH групп в контрольной и опытной пробах, определяемых по методу Sedlack et al. [9]. Коэффициент молярной экстинкции—13100. Активность глутатионпероксидазы выражали в  $\mu$ моль восстановленного глутатиона в мин на мл эритроцитарной массы. Активность глутатионредуктазы эритроцитов определяли в гемолизатах, полученных при двукратном разведении буфером эритроцитов, отмытых 0,15 М NaCl. Гемолизат разводили десятикратно 0,2 М фосфатным буфером (рН 7,4). Реакцию проводили при комнатной температуре в среде объемом 2,43 мл, содержащей гемолизат с конечным разведением в 1000—2000 раз. Инкубационная среда содержала 1,8 мл 0,05 М фосфатного буфера с ЭДТА— $10^{-3}$ М (рН 7,4); 0,5 мл окисленного глутатиона  $10^{-3}$  М; НАДФН  $16 \cdot 10^{-3}$ М и 0,03 мл гемолизата.

Изменение экстинкции проводили в течение 1—2 мин при  $\lambda=340$  нм на спектрофотометре СФ-46 «ЛОМО». Активность глутатионредуктазы определяли по убыли НАДФН и выражали в мкмоль НАДФН в мин на 1 мл эритроцитарной массы.

### Результаты и обсуждение

В таблице приведены данные активности глутатионпероксидазы и глутатионредуктазы эритроцитов белых крыс, находившихся под воздействием шума различной продолжительности и при введении  $\alpha$ -Т. Как видно из приведенных данных, активность глутатионпероксидазы после значительного подъема ( $p < 0,01$ ) в остром периоде эксперимента (2 и 3-я группы) к 7-му дню воздействия резко снижается, однако последующее систематическое действие шума приводит к стойкому повышению ее активности. В то же время активность глутатионредуктазы, поставляю-

Активность глутатионпероксидазы и глутатионредуктазы эритроцитов белых крыс в условиях воздействия шума и при введении  $\alpha$ -ТА

Условия эксперимента	Глутатионпероксидаза (мкмоль/GSH/мин/мл эритроцит. массы)						
	г р у п п ы						
	1	2	3	4	5	6	
Шум		78±8 (6)	72,8±1,5* (6)	35,6±4,4* (8)	76,9±3,2* (7)	71,7±2,3* (6)	
Шум+ $\alpha$ -ТА	53±5 n=16	73,8±3,9* (6)	75,5±1,5* (6)	32,6±3,0* (7)	71,6±3,1* (6)	26,0±7,4** (6)	
		глутатионредуктаза (мкмоль НАДФН/мин/мл эритроцит. массы)					
Шум		22,7±3,9 (6)	13,1±4,0 (6)	6,2±1,6* (8)	24,0±6,8 (6)	8,4±1,4 (7)	
Шум+ $\alpha$ -ТА	17,9±3,7 n=8	13,3±2,0 (6)	21,2±6,0 (6)	2,5±0,3** (7)	16,6±2,44 (6)	7,1±1,3* (6)	

Примечание. \*—достоверность по отношению к контрольной группе, \*\*—по отношению к соответствующей опытной группе; в скобках приведено число подопытных животных.

щей восстановленный глутатион, в частности для глутатионпероксидазной реакции, после недостоверного повышения (2 и 5-я группы) значительно подавляется во все остальные сроки эксперимента, причем отмечается выраженная зависимость от сроков действия шума. Примечательно, что подавление активности глутатионредуктазы, как и глутатионпероксидазы, у животных 4-й группы наблюдается на фоне снижения содержания  $\alpha$ -Т в мембранах эритроцитов, что свидетельствует о значительном снижении адаптационных возможностей антиоксидантной системы эритроцитов. Однако несмотря на компенсаторное активирование ферментов, уровень фоновых липидных перекисей плазмы и активность аскорбат-зависимого ПОЛ (АЗП) мембран эритроцитов возрастает [3] в 5-й группе. Продолжающееся усиление липидной пероксидации в крови с удлинением сроков эксперимента происходит на фоне резкого снижения уровня  $\alpha$ -Т, к которому присоединяется подавление ак-

тивности глутатионредуктазы и рост активности глутатионпероксидазы. По-видимому, эти два фермента, функционирующие в паре, проявляют различную чувствительность к воздействию шума на организм, хотя разнонаправленность сдвигов и отсутствие состояния устойчивого равновесия в системе свидетельствуют о развитии процессов, направленных на выравнивание общего антиоксидантного статуса организма. Возможно, как это показано для очищенной печеночной глутатионпероксидазы [6], свободные сульфгидрильные группы, имеющиеся в молекуле фермента, при окислении не оказывают существенного влияния на его активность, то есть окисление глутатионпероксидазы не сопровождается ее ингибированием [11]. При этом глутатион служит одновременно и субстратом, и основным восстановителем фермента, равно как  $H_2O_2$  — субстратом и окислителем. Тем не менее, в условиях акустического стресса, характеризующегося значительным активированием процессов ПОЛ, наблюдается активирование фермента, что, по-видимому, может быть объяснено ростом субстратов, в частности липидных перекисей и  $H_2O_2$ . Возможно, определенные изменения могут быть связаны и с изменением статуса Se.

Значительное снижение активности глутатионредуктазы (на 70%), наиболее выраженное в более поздние сроки эксперимента и коррелирующее с более чем 18-кратным ростом АЗП мембран эритроцитов у животных 6-й группы, на наш взгляд, связано с окислением SH-групп, входящих в состав активного центра фермента и чрезвычайно чувствительных к действию  $OH\cdot$  радикалов. По данным литературы [4], содержание крыс на диете с низким уровнем витамина E приводит к значительному снижению как уровня GSH, так и активности глутатионредуктазы в эритроцитах. Такое воздействие должно было привести к дефициту GSH и торможению пероксидазной реакции. Однако, как показали результаты расчетов, снижение активности глутатионредуктазы до 25% от исходной не отражается на степени восстановления глутатиона [7]. Кроме того, глутатион в клетках также синтезируется из аминокислот, поэтому, по всей видимости, столь выраженные изменения в активности глутатионредуктазы не отразились на интенсивности глутатионпероксидазной реакции. Тем не менее, даже выраженное активирование глутатионпероксидазы не сумело нормализовать интенсивность протекающих реакций перекисления, в результате чего ПОЛ продолжает оставаться высоким на фоне сниженного содержания эндогенного  $\alpha$ -Т в эритроцитах и плазме крови. Введение  $\alpha$ -ТА с целью предотвращения наблюдаемых сдвигов показало, что активность глутатионпероксидазы эритроцитов стрессированных животных не зависит от уровня  $\alpha$ -Т и практически не отличается от показателей в соответствующие сроки исследования экспериментальных групп, не получающих антиоксиданта, за исключением 8-недельного воздействия, когда отмечается подавление активности фермента на фоне снижения активности ПОЛ. Взаимосвязь между уровнем витамина E и активностью глутатионпероксидазы является предметом изучения многих исследователей [4, 5, 10]. По мнению большинства авторов, отсутствует прямое влияние  $\alpha$ -Т на активность глутатионпероксидазы, хотя отмечается синергизм этих двух

важных звеньев антиоксидантной цепи. Следует отметить, что в условиях введения  $\alpha$ -ТА наблюдается регуляция процессов ПОЛ [3], сокращается разрыв с контрольным уровнем в содержании  $\alpha$ -Т. При этом отмечается выраженная зависимость активности глутатионпероксидазы и глутатионредуктазы от уровня  $\alpha$ -Т. Так, в условиях нашего эксперимента снижение активности ферментов отмечается на фоне высокого уровня  $\alpha$ -Т и резкого подавления ферментативного ПОЛ, и наоборот. Анализ и сопоставление результатов настоящего исследования с ранее опубликованными нами данными свидетельствует о том, что данные об активности ферментов вне связи с состоянием процессов ПОЛ и уровня  $\alpha$ -Т не могут быть однозначно интерпретированы в силу функционирования многообразных механизмов взаимодействия и регуляции компонентов антиоксидантной системы.

Кафедра биологической химии

Ереванского медицинского института

Поступила 28/XII 1987 г.

Մ. Մ. ՄԵԼՔՈՆՅԱՆ, Ա. Բ. ԱՔՐԻԿՅԱՆ, Վ. Գ. ՄԽԻՏՐՅԱՆ

ԳԼՅՈՒՏԱԹԻՈՆՊԵՐՕՔՍԻԴԱԶԻ ԵՎ ԳԼՈՒՏԱԹԻՈՆԵԴՐՈՒԿՏԱԶԻ  
ԱԿՏԻՎՈՒԹՅՈՒՆԵՐ ՍՊԻՏԱԿ ԱՌՆԵՏՆԵՐԻ ԷՐԻԹՐՈՑԻՏՆԵՐՈՒՄ  
ԱԿՈՒՍՏԻԿ ՍՏՐԵՍԻ ՊԱՅՄԱՆՆԵՐՈՒՄ

Ազմուկի ազդեցության պայմաններում  $\alpha$ -տոկոֆերոլացետատի պրոֆիլակտիկ ներարկման ֆոնի վրա ցույց է տրված սպիտակ առնետների էրիթրոցիտների հակաօքսիդանտային ստատուսի նշանակալից ուժեղացում,

M. M. MELKONIAN, A. B. AFRIKIAN, V. G. MKHITARIAN

## THE GLUTATHIONPEROXIDASE AND GLUTATHIONEREDUCTASE ACTIVITIES IN ALBINO RATS' ERYTHROCYTES AT THE ACUSTIC STRESS CONDITIONS

The significant increase in antioxidant state in the albino rats' erythrocytes was revealed at the acustic stress conditions after prophylactic injection of  $\alpha$ -tocopherolacetate.

### Л И Т Е Р А Т У Р А

1. Мелконян М. М., Мхитарян В. Г., Мелик-Агаева Е. А., Рухкян А. Х. Биол. ж. Армении, 1983, 36, 7, с. 582.
2. Мелконян М. М., Аракелян А. Г., Мхитарян В. Г. Биол. ж. Армении, 1983, 136, 10, с. 818.
3. Мелконян М. М., Мхитарян В. Г. Бюлл. exper. биол. и мед., 1985, 1, 9, с. 257.
4. Chow K. Ch. Internat. J. Vit. Nutr. Res., 1979, 49, 182.
5. Dean W. F. Poultry Sci., 1981, 60, 2655.
6. Nakamura W., Hosoda S., Hajashi K. Biochem. Biophys. Acta, 1974, 358, 251.
7. Paniker N. V., Srivastava S. K., Bentler E. Biochem. Biophys. Acta, 1970, 215, 456.
8. Pinto R. E., Bartley W. Biochem. J., 1969, 112, 109.
9. Sedlack J., Lindsay R. H. Analyt. Biochem., 1968, 25, 192.
10. Thompson J. N., Scott M. L. J. Nutr., 1970, 100, 797.
11. Zakowski I. I., Tappel A. L. Biochem. Biophys. Acta, 1978, 526, 65.