

Л. В. Семерджян, М. И. Агаджанов

ФУНКЦИОНАЛЬНОЕ СОСТОЯНИЕ ФЕРМЕНТОВ ОКИСЛИТЕЛЬНОЙ ВЕТВИ ПЕНТОЗОФОСФАТНОГО ПУТИ В УСЛОВИЯХ ИЗБЫТОЧНОЙ ЛИПИДНОЙ ПЕРОКСИДАЦИИ И ИХ АНТИОКСИДАНТНАЯ РЕГУЛЯЦИИ

Стрессовая реакция, вызванная физическими, химическими, социальными и другими этиологическими факторами, развивается на фоне избыточной липидной пероксидации (ИЛП). Эти разнообразные по своему клиническому проявлению состояния характеризуются глубокими и разносторонними нарушениями метаболических процессов. В клеточном метаболизме определенную роль играет пентозофосфатный путь (ПФП) в аспекте генерации биологически важных компонентов, обеспечивающих нормальный метаболизм. Несмотря на значительное количество исследований, посвященных изучению отдельных сторон метаболизма при различных экстремальных состояниях, многие стороны его остаются недостаточно изученными, в частности, малоизученным является ПФП при различных функциональных состояниях. Нарушения его могут привести к целому ряду метаболических срывов. Цель данного исследования—изучить функциональное состояние ПФП в условиях ИЛП, вызванной введением ненасыщенных жирных кислот (НЖК) и продуктов их окисления, а также выявить возможность их коррекции с помощью антиоксиданта α -токоферола (α -ТФ). Предстояло определить активность ферментов окислительной ветви ПФП: глюкозо-6-фосфатдегидрогеназы (Г-6-ФДГ), 6-фосфоглюконатдегидрогеназы (6-ФГДГ), динамику ПОЛ в ферментативной НАДФН-зависимой (НЗП) и неферментативной аскорбат-зависимой (АЗП) системах.

Материал и методы

Эксперименты проводили на белых крысах-самцах массой 150—200 г. Модель ИЛП создавали введением ненасыщенных жирных кислот и их пероксидированных форм. Из НЖК использовали пероксидированную и непероксидированную олеиновую и линолевую кислоты (ПОК, ОК, ПЛК, ЛК). Содержание перекисного кислорода для пероксидированных кислот составляло 280—300 мкмоль/г кислоты, для непероксидированных кислот равнялось нулю. НЖК вводили животным ежедневно внутрибрюшинно по 0,1 мл/100 г массы в течение 1, 7 и 14 дней. Другой группе животных параллельно с НЖК вводили антиоксидант α -ТФ в количестве 1 мг/100 г массы. В качестве контроля служили интактные крысы, которым вводили физиологический раствор. Активность ферментов окислительной ветви ПФП Г-6-ФДГ и 6-ФГДГ в цитоплазме печени определяли по Glock, McLean [12] и выражали в мкмоль НАДФН на 1 мг белка в минуту. Белок в пробах определяли по Lowry [14]. Активность Г-6-ФДГ в плазме крови определяли по методу Nogescker и Koppberg [13] и выражали в мкмоль НАДФН на 1 мл плазмы. Определение активности индуцированного ПОЛ в цитоплазме в системах АЗП и НЗП проводили колориметрически по реакции малонового диальдегида (МДА) с тиобарбитуровой кислотой [5]. Содержание липидных перекисей выражали в нмоль МДА на 1 мг белка. Результаты экспериментов обработаны методом вариационной статистики по системе Фишера-Стьюдента.

Результаты и обсуждение

Результаты исследований показали разнонаправленные изменения в активности ферментов окислительной ветви ПФП под влиянием НЖК с преимущественным их ингибированием. Интенсивность и направленность сдвигов в активности ферментов ПФП зависят от вида НЖК, степени пероксидированности и сроков их введения. Надо отметить, что общая направленность сдвигов Г-6-ФДГ и 6-ФГДГ во

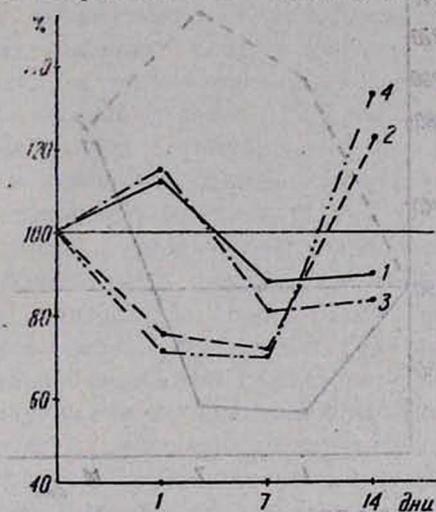


Рис. 1. Активность Г-6-ФДГ (1), 6-ФГДГ (2) при введении ОК, активность Г-6-ФДГ (3), 6-ФГДГ (4) при введении ПОК в цитоплазме печени (в % по отношению к контролю).

все сроки исследования примерно одинакова. При введении ОК отмечены незначительные изменения в активности 6-ФГДГ, между тем как пероксидированная форма приводит к значительному подавлению

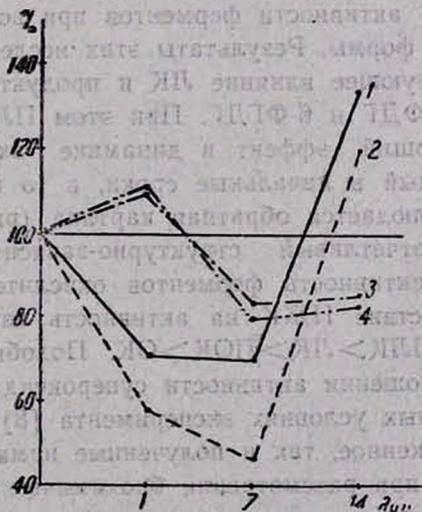


Рис. 2. Активность Г-6-ФДГ (1), 6-ФГДГ (2) при введении ПЛК, активность Г-6-ФДГ (3), 6-ФГДГ (4) при введении ЛК в цитоплазме печени крыс (в % по отношению к контролю).

активности ферментов. Аналогичные результаты получены для 6-ФГДГ, с той лишь разницей, что степень угнетения фермента более выражена (рис. 1). Здесь также отмечается высокая степень подавления активности 6-ФГДГ к концу эксперимента, что, по всей вероятности, может служить адекватным показателем истощения фермента.

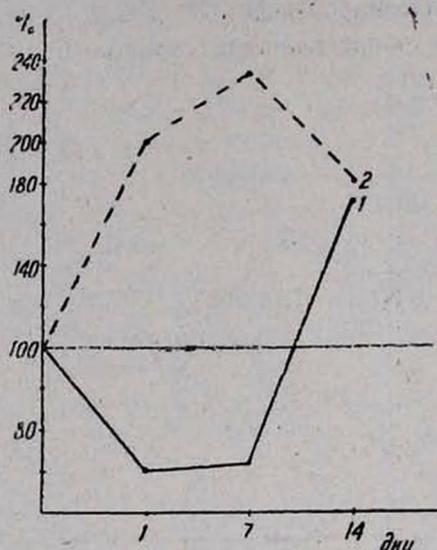


Рис. 3. Активность Г-6-ФДГ в плазме крови (1) и в цитоплазме печени (2) при введении ПЛК (в % по отношению к контролю).

Полученные данные свидетельствуют о том, что ферменты окислительной ветви ПФП менее чувствительны к воздействию ОК. Подавление активности ферментов усиливается при предварительной пероксидации ОК. С целью выяснения зависимости угнетения активности ферментов от структуры НЖК нами проведена серия исследований по изучению активности ферментов при воздействии ЛК и её пероксидированной формы. Результаты этих исследований также указывают на ингибирующее влияние ЛК и продуктов её пероксидации на активность Г-6-ФДГ и 6-ФГДГ. При этом ПЛК оказывает более сильный ингибирующий эффект в динамике активности фермента, особенно выраженный в начальные сроки, в то время как в последующие сроки наблюдается обратная картина (рис. 2). Таким образом, мы видим отчетливый структурно-зависимый ингибирующий эффект НЖК на активность ферментов окислительной ветви ПФП. Ингибирующее действие НЖК на активность изучаемых ферментов убывает в ряду: ПЛК > ЛК > ПОК > ОК. Подобные закономерности наблюдаются в отношении активности супероксиддисмутазы в тканях печени в аналогичных условиях эксперимента [8].

Как вышесказанное, так и полученные нами данные свидетельствуют о том, что при рассмотрении биохимических механизмов действия НЖК на активность окислительных ферментов в ПФП следует руководствоваться, по-видимому, двумя подходами: с одной стороны, изучить НАДФН-зависимое ферментативное и аскорбатзависимое не-

ферментативное ПОЛ в печени, а с другой—состояние активности Г-6-ФДГ в плазме крови с целью установления количественной зависимости изменения активности регуляторов ПФП от уровня липидной перекисидации. Полученные данные свидетельствуют о том, что одновременно с ингибированием активности Г-6-ФДГ в цитоплазме печени обнаруживается её повышение и в плазме крови при введении ПЛК. Однако, как видно из рис. 4, несмотря на то, что в поздние сроки активность Г-6-ФДГ в печени повышается, при этом все еще продолжается ферментация. Вероятными причинами гиперферментемии в данных условиях следует считать выход ферментов из поврежденных клеток не только печени, но и органов и тканей, реагирующих на соматический стресс [6]. Кроме того, выход ферментов из пораженных тканей стимулируется по принципу «обратной связи», их синтез и активность фермента могут возрасти непосредственно в самой поврежденной ткани [7].

Полученные данные представляют определенный интерес для клинической энзимодиагностики с целью выявления степени повреждения биомембран гепатоцитов. Выявленный эффект гиперферментемии в плазме крови может лежать в основе снижения активности ферментов окислительной ветви ПФП в цитоплазме печени, что является одной из причин нарушения функционального состояния ПФП и косвенно свидетельствует о нарушении репаративных процессов в тканях печени. Этот факт свидетельствует о значительных структурно-функциональных превращениях биологических мембран, что, на наш взгляд, является следствием изменения интенсивности ПОЛ. Установлено, что в основе механизма действия НЖК лежат их перекиси [1]. Известно также, что ПОЛ оказывает ингибирующее действие на ряд ферментов, для проявления активности которых необходимы SH-группы. Естественно было предположить, что ПЛК, неспецифически повышающая уровень липидных перекисей, может оказывать повреждающее действие на клеточные мембраны и нарушения функции Г-6-ФДГ путем изменения их конформации. Следовательно, снижение активности ферментов в ПФП следует связывать не только с нарушением целостности биологических мембран, вследствие чего имеет место выход фермента в периферический кровоток, но и с конформационными изменениями апофермента путем окисления SH-групп ферментов липидными перекисями.

С целью вскрытия тонких механизмов влияния НЖК на активность ферментов окислительной ветви ПФП представлялось целесообразным изучить ПОЛ в системах АЗП и НЗП в цитоплазме печени. Изучение систем ПОЛ при воздействии ПЛК в динамике свидетельствует о том, что интенсивность АЗП при этом возрастает приблизительно в 2 раза, в то время как активность НЗП значительно снижается (рис. 4). Примечательно, что в поздние сроки симбатно усилению НЗП обнаруживается увеличение активности окислительной ветви ПФП, в частности Г-6-ФДГ и частично 6-ФГДГ. В литературе имеются данные относительно активирования ферментов окислительной ветви ПФП под влиянием простагландинов [9]. Установлено

также, что ферменты, участвующие в синтезе простагландинов, являются НАДФН-зависимыми, активность их регулируется соотношением НАДФН/НАДФ, уровень которого контролируется ферментами окислительной ветви ПФП. Представляет интерес исследование Л. Г. Паносьяна с соавт. [10], свидетельствующее об активации биосинтеза простагландинов, к которым присоединяется резкое повышение фер-

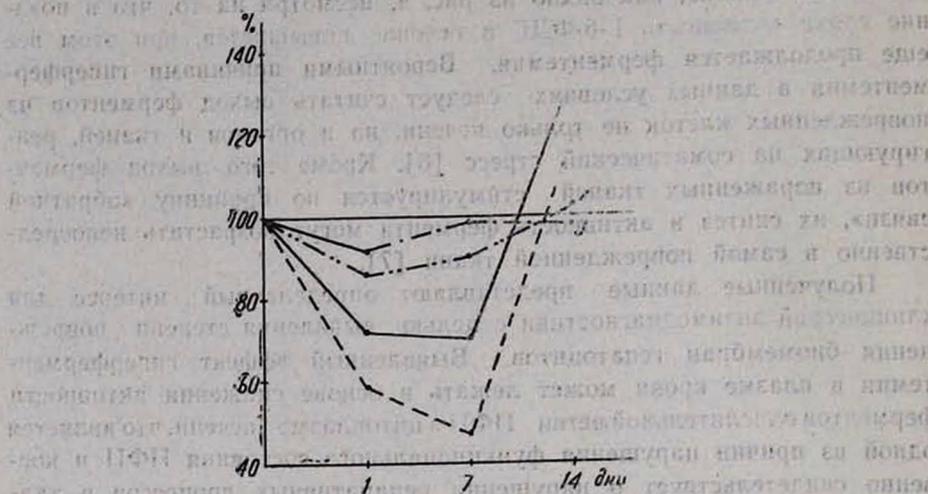


Рис. 4. Активность АЗП (1), НЗП (2) в цитоплазме печени при введении ПЛК, активность АЗП (3) и НЗП (4) при введении ПЛК + α -ТФ (в % по отношению к контролю).

ментативного НАДФН-зависимого ПОЛ, имеющего место при действии ионизирующего излучения. Вскрытая нами симбатность активирования реакций перекисления липидов и активности ферментов в окислительной ветви ПФП и выявленная аналогия дают основание для предположения возможности подключения компенсаторных механизмов в клетки печени, направленных на синтез простагландинов. Следовательно, можно допустить, что интенсификация реакции ПОЛ является необходимым компонентом пускового механизма метаболических перестроек. Значительное повышение в тканях печени содержания МДА в АЗП системе свидетельствует о нарушении сбалансированности в процессах генерации и элиминации липидных перекисей. Активация в экстремальных условиях защитных антиоксидантных ферментов является компонентом неспецифической ответной реакции клетки, направленной на восстановление нарушенного динамического равновесия ПОЛ. Увеличение активности окислительных ферментов ПФП является одним из составляющих адаптивных метаболических перестроек в экстремальных условиях. Не исключено также, что столь значительное повышение активности Г-6-ФДГ и 6-ФГДГ в печени при избыточной липидной перекисидации свидетельствует о возрастающей роли ПФП, направленной, вероятно, на увеличение продукции НАДФН для восстановления гидроперекисей через систему глутатионредуктазы, глутатионпероксидазы. Снижение активности указанных ферментов обусловлено комплексом метабо-

лических и гормональных перестроек в ходе воздействия стрессора, переключения скорости свободнорадикального окисления липидов на более низкий стационарный уровень, в результате чего имеет место существенное подавление НЗП.

Таким образом, избыточное ПОЛ вызывает заметные сдвиги в объемной мощности ПФП, что характеризуется глубокими разносторонними метаболическими срывами. Изменение интенсивности ПОЛ и функциональное нарушение ПФП имеют важное значение в патогенезе различных стрессовых ситуаций. Чрезмерно усиленная активация реакций ПОЛ приводит к увеличению расхода антиоксидантов с последующим возникновением в тканях дефицита их основного представителя α -ТФ [1, 2, 8], изменению липид-липидных, липид-белковых соотношений [3], которые в сочетании с вторичными продуктами перекисления липидов оказывают цитотоксический эффект на мембранные структуры, окисляя SH-группы структурных белков и ферментов [4]. Это приводит к необратимым сдвигам в общей картине биофизико-химического статуса клеточной мембраны [3, 11], вызывая неминуемые изменения в активности мембраносвязанных, липид-зависимых ферментов.

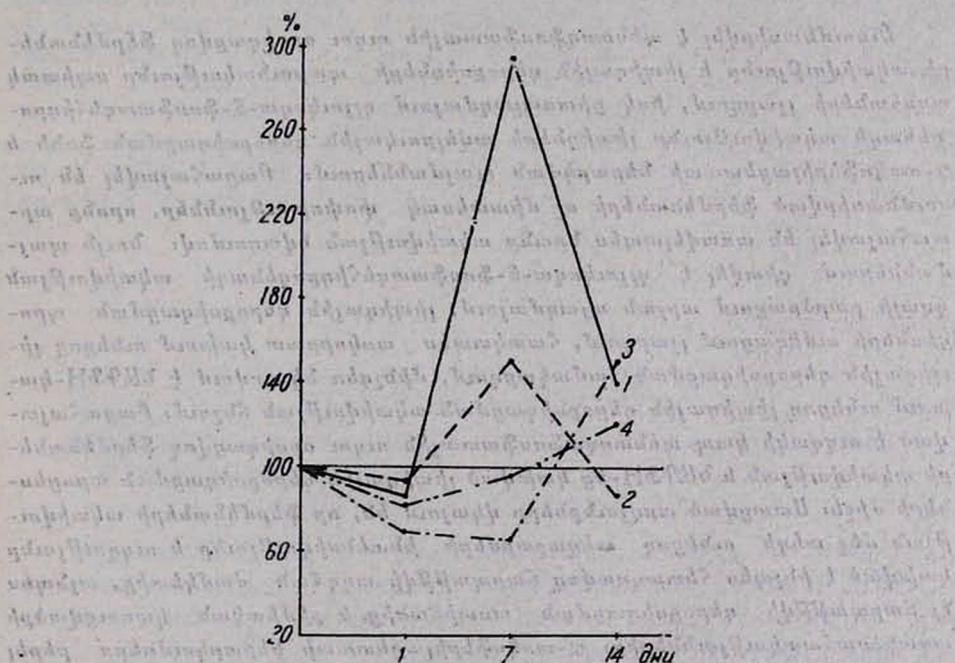


Рис. 5. Активность Г-6-ФДГ (1), 6-ФДГ (2) в цитоплазме печени при введении ПЛК и активность Г-6-ФДГ (3), 6-ФДГ (4) при введении ПЛК + α -ТФ (в % по отношению к контролю).

Итак, интенсификация процессов ПОЛ с накоплением в тканях токсических продуктов, дефицит α -ТФ, функциональное нарушение ПФП обосновывают актуальность коррекции метаболических сдвигов при описанных патологиях с помощью α -ТФ. Установлено, что назначение животным α -ТФ во все сроки способствует значительному

сохранению нормального функционального состояния ферментов ПФП, позволяет регулировать их активность, поддерживает функциональную целостность ПФП (рис. 5). При этом заметно подавляется активность систем ПОЛ, причем с наибольшей выраженностью НЗП система. Очевидно, что α -ТФ выполняет роль тонкого регулятора, способствующего нормализации изучаемых параметров. Воздействие α -ТФ можно рассматривать как один из подходов к повышению неспецифической резистентности организма в условиях избыточной липидной пероксидации. Результаты проведенных исследований обосновывают целесообразность и эффективность использования α -ТФ для биохимической коррекции активности ферментов ПФП и лимитирования интенсивности и течения реакции ПОЛ в клетке при экстремальных состояниях.

Кафедра биохимии
Ереванского медицинского института

Поступила 21/XII 1989 г.

Լ. Վ. Մեմերյան, Մ. Ի. Աղաջանով

ՊԵՆՏՈՑՖՈՍՖԱՏԱՑԻՆ ՈՒՂՈՒ ՕՔՍԻԴԱՑՎՈՂ ՃՑՈՒՂԻ ՉԵՐՄԵՆՏՆԵՐԻ ՖՈՒՆԿՑԻՈՆԱԿ ՎԻՃԱԿԸ ԼԻՊԻԴՆԵՐԻ ԳԵՐՕՔՍԻԴԱՑՄԱՆ ՊԱՅՄԱՆՆԵՐՈՒՄ ԵՎ ՀԱՎԱՕՔՍԻԴԱՏԱՑԻՆ ԿԱՐԳԱՎՈՐՈՒՄԸ

Ուսումնասիրվել է պենտոզֆոսֆատային ուղու օքսիդացվող ֆերմենտների ակտիվությունը և լիպիդային գերօքսիդների պարունակությունը սպիտակ առնետների լյարդում, իսկ ցիտոպլազմայում գլյուկոզա-6-ֆոսֆատդեհիդրոգեննազի ակտիվությունը լիպիդների ավելցուկային գերօքսիդացման ֆոնի և α -տոկոֆերիլացետատի ներարկման պայմաններում: Բացահայտվել են ուսումնասիրված ֆերմենտների ոչ միատեսակ փոփոխություններ, որոնք արտահայտվել են առավելապես նրանց ակտիվության նվազումով: Նույն պայմաններում դիտվել է գլյուկոզա-6-ֆոսֆատդեհիդրոգեննազի ակտիվության ղգալի բարձրացում արյան պլազմայում, լիպիդային գերօքսիդացման պրոցեսների ուժեղացում լյարդում, հատկապես ասկորբատ կախում ունեցող լիպիդային գերօքսիդացման համակարգում, մինչդեռ նկատվում է նԱԴՖԻ-կախում ունեցող լիպիդային գերօքսիդացման ակտիվության ճնշում: Բացահայտված է ուղղակի կապ պենտոզֆոսֆատային ուղու օքսիդացվող ֆերմենտների ակտիվության և նԱԴՖԻ-ից կախված լիպիդային գերօքսիդացման պրոցեսների միջև: Ստացված արդյունքները վկայում են, որ ֆերմենտների ակտիվության մեջ տեղի ունեցող տեղաշարժերի ինտենսիվությունը և ուղղությունը կախված է ինչպես հետազոտվող ճարպաթթվի ազդման ժամկետից, այնպես էլ ճարպաթթվի գերօքսիդացման աստիճանից և քիմիական կառուցվածքի առանձնահատկություններից: α -տոկոֆերիլացետատի ներարկումները բերել են վերոհիշյալ ցուցանիշների կանոնավորման:

L. V. Memerjan, M. I. Aghajanov

The Functional State of Enzymes of Oxidative Branch of Pentose-phosphate Pattern in Conditions of Abundant Lipids Peroxidation and Antioxidants Regulation

It was studied the activity of enzymes of oxidative branch of pentose-phosphate pattern, the lipids peroxidation in condition of abundant li-

pids peroxidation induced by unsaturated fatty acids and also during the injection of α -tocopherolacetate in the liver cytoplasm and activity of glucose-5-phosphatedhydrogenase in the blood plasma of albino rats. Nonunidirectional changes in the activity of studied enzymes were found out in the liver cytoplasm with their primary inhibition and appearance of enzymemia. A definite correlation was established between the activity of enzymes of oxidative branch of pentosephosphate pattern and the level of lipids peroxidation an NADPH-dependent systems. The injection of α -tocopherilacetate under certain conditions brought to the correction of studied parameters.

Л И Т Е Р А Т У Р А

1. Агаджанов М. И., Мелик-Агаева Е. А., Мхитарян В. Г. Биол. ж. Армении, 1974, 27, 2, с. 28.
2. Агаджанов М. И. Автореферат докт. дис. Ереван, 1979.
3. Бурлакова Е. Б., Кухтина Е. Н., Храпова Н. Г., Аристахова С. А. Биохимия, 1982, 47, 5, с. 882.
4. Бурлакова Е. Б., Джалябова М. М., Гвахария В. О. и др. В кн.: Влияние липидов мембран на активность ферментов. Черноголовка, 1978.
5. Владимиров Ю. А., Арчаков А. И. Перекисное окисление липидов в биологических мембранах. М., 1972.
6. Вельтищев Э. А., Юрева А. С., Воздвиженская Е. С. Вopr. мед. химии, 1987, 2, с. 7.
7. Коровкин Б. Ф. В кн.: Всесоюзный симпозиум по медицинской энзимологии. (тез.). Астрахань, 1987, с. 73.
8. Микаелян Э. М. Автореферат докт. дис. Ереван, 1989.
9. Мхитарян В. Г., Бадалян Ф. Е. Ж. exper. и клин. мед. АН АрмССР, 1978, 12, 6, с. 7.
10. Паносян Л. Г., Варганян Г. С., Петросян А. К., Джинянян К. О., Габриелян Э. С. Ж. exper. и клин. мед. АН АрмССР, 1989, 29, с. 64.
11. Элерте Д. Л., Майоре А. Е., Горштейн Э. С., Ремберг Л. А. В кн.: Биол. мембраны и пагол клетки. Рига, 1976, с. 62.
12. Glucé A. F., McLeran P. Во hémical J., 1963, 55, 3, 401.
13. Harsberger B. L., Kornberg A. J. Biol. Chem., 1961, 182, 805.
14. Lowry O. N., Rosenbrough N. S., Farr A. L., Randall R. T. J. Biol. Chem., 1951, 193, 256.

УДК 616.36—001—003.93

А. С. Джавадян, Т. Д. Карапетян, С. С. Гамбаров, И. Р. Саакян,
В. С. Петросян, А. Л. Багдасарян

ЭНЕРГЕТИЧЕСКИЕ РЕАКЦИИ МИТОХОНДРИЙ ПРИ КОМПЛЕКСНОЙ СТИМУЛЯЦИИ РЕГЕНЕРАЦИОННЫХ ПРОЦЕССОВ ДИФFUЗНО ПОРАЖЕННОЙ ПЕЧЕНИ КРЫС

В последние годы в лечении диффузных заболеваний печени намечается тенденция к разработке принципиально нового подхода, а именно, возможность стабилизации положительных сдвигов в пораженной печени за счет стимуляции регенерации неповрежденной печеночной ткани. Экспериментально доказано, что частичные гепатэктомии стимулируют регенерацию как нормальной, так и пораженной диффузным процессом печени, позволяя добиться значительного обратного развития разросшейся соединительной ткани [10, 11]. Вместе с тем хорошо известна роль лимфоидной ткани в процессах регенерации [2, 9, 14]. Однако в недостаточной степени изучена роль регуляторных механизмов иммунной системы в процессах регенерации печеночной ткани. В частности, большой интерес представляет влияние