

Система антиоксидантной защиты при поздней гипокинезии

В.П. Акопян, А.А. Манукян

ЕрГМУ им. М. Гераци, кафедра фармакологии

375025 Ереван, ул. Корюна, 2

Ключевые слова: травматическое повреждение спинного мозга, гипокинезия, липидная пероксидация, система антиоксидантной защиты

К настоящему времени накоплен обширный фактический материал о взаимосвязи функциональной активности антиоксидантной системы (АОС) с интенсивностью свободнорадикального окисления (СРО) в физиологических условиях и при различной патологии. Однако во многих исследованиях очень часто ограничиваются определением одного или двух показателей, что вряд ли можно признать информативным. Кроме того, имеется очень мало работ, посвященных изучению состояния АОС при гипокинезии, которая являясь многокомпонентным патогенетическим фактором, способствует возникновению многочисленных заболеваний. Гипокинезия, являясь классическим примером хронического стресса, приводит к интенсификации перекисного окисления липидов (ПОЛ) [18], содействуя накоплению продуктов липидной деградации – гидроперекисей липидов [9, 16], малонового диальдегида (МДА) и шиффовых оснований (ШО). Накопление последних в одних случаях приводит к повышению проницаемости мембран [22, 29] с их последующим разрывом и выходом ряда ферментов в межклеточную жидкость [24, 25], в других – отмечается накопление катионов Na/K в митохондриях, что приводит к их набуханию и потере цитохрома С, подавлению активности гликолиза и разобщению окислительного фосфорилирования [14].

Целью настоящей работы является исследование состояния АОС у больных с травматическим повреждением спинного мозга, находящихся в состоянии гипокинезии длительностью, превышающей 60 суток (поздняя гипокинезия).

Материал и методы

Исследования проводились на 27 больных Реабилитационного центра Красного креста и нейрохирургического отделения Центрального клинического военного госпиталя с травматическим повреждением

спинного мозга. Кровь из локтевой вены забирали по истечении срока гипокинезии, превышающего 60 дней. Контрольную группу составляли 37 добровольцев мужского пола в возрасте 20–25 лет.

Активность индуцированного ПОЛ – аксорбатзависимого ПОЛ (АЗП) и NADPH-зависимого ПОЛ (НЗП) в мембранах эритроцитов определяли по методу Ю.А. Владимирова и А.И. Арчакова [3] на цветной реакции малонового диальдегида (МДА) с тиобарбитуровой кислотой. Содержание продуктов ПОЛ – ацилгидроперекисей (АГП), диеновых конъюгатов (ДК), МДА, ШО определяли в эритроцитарных мембранах и плазме крови по известным методикам [5, 6, 30, 1] соответственно. Из компонентов АОС в эритроцитарных мембранах и плазме крови определяли содержание α -токоферола по методу Duggan D.D. [17] на флуоресцентном спектрофотометре Hitachi при максимуме возбуждения 295 нм и максимуме флуоресценции 330 нм. Активность антиоксидантных ферментов супероксиддисмутазы (СОД) и глутатионредуктазы (ГР) определяли методами Nishikimi M. [21] и Pinto R., Bartley W. [23]. Количество средних молекул (СМ) определяли спектрофотометрически на длине волны 254 нм против контроля [4]. Определение активности гистидазы и урокиназазы проводили спектрофотометрически на длине волны 280 и 267 нм соответственно. Активность ферментов выражали в мкМ урокиназиновой кислоты на литр плазмы в 1 мин [13]. Суммарную пероксидазную активность (СПА) определяли по методу А.А. Покровского [12]. Для пересчета единиц активности ферментов, содержания α -токоферола, липидных перекисей в опытных образцах определяли содержание белка по методу Lowry [20]. Выделение мембран эритроцитов проводилось по методу Libmer G. R. [19].

Результаты и обсуждение

Данные наших исследований о повышении в плазме и мембранах эритроцитов АГП и ДК, а также МДА и ШО свидетельствуют об усилении прооксидантной активности и уменьшении активности АОС (таблица). Повышение содержания продуктов ПОЛ в результате активации СРО является реакцией живой системы на различные стрессовые воздействия, в том числе и гиподинамию. Во всех живых системах существуют объективные предпосылки для развития неферментативных реакций СРО, поскольку в их структуре (прежде всего в биомембранах) имеются легкоокисляемые органические соединения, аккумулирующие в своих молекулах запас потенциальной (химической) энергии. Среди органических молекул наиболее уязвимы для реакции перекисного окисления полиеновые молекулы жирных кислот (линолевой, линоленовой и особенно арахидоновой), входящие в состав фосфолипидов биологических мембран и липопротеинов крови. Поскольку окисление жирных кислот носит цепной характер, то при первичной радикальной атаке основным продуктом будет гидроперекиси липидов, в молекулах которых может выявиться система сопряженных двойных связей, обнаружение которых является чувствительным тестом на повышение содержания гидроперекисей [26]. Дальнейшее превращение образовавшихся продуктов требует второй радикальной атаки и приводит к образованию МДА [27], взаимодействие которого со свободными аминокетильными группами белков приводит к образованию ШО, являющихся конечными продуктами ПОЛ [9].

Резкое повышение активности СОД и снижение активности ГР свидетельствует об интенсивности протекания СРО (таблица). Можно предположить, что в реакция усиления ПОЛ решающую роль должен играть супероксиданионный радикал, приводя к резкому усилению АЗП, при сравнительно незначительной активации НЗП. Однако NADPH-зависимая система, которая особенно чувствительна к повреждающему действию АГП [28], повышает свою активность на 52.2%, хотя отмечается увеличение содержания АГП как в плазме, так и в мембране эритроцитов.

В этих условиях можно говорить об истощении систем антиоксидантной защиты организма, при котором отмечается переключение свободнорадикального окисления липидов на ферментативный путь. Такое заключение основано на сравнении изменений АЗП и НЗП в ранние и поздние сроки гипокинезии. Так, в условиях 15-суточной гипокинезии отмечается понижение активности НЗП на 44.6% [1] и повышение активности АЗП на 33.3% при одинаковой тенденции изменений активности ГР, СОД и уровня α -токоферола. В отличие от ранних сроков в поздние сроки гипокинезии активность НЗП резко повышает-

Таблица

Некоторые показатели ПОЛ и АОС у больных, находящихся в состоянии 60-суточной гипокинезии

Показатели	Контроль	60-суточная гипокинезия
СМ, ед	0,14±0,006	0,185±0,012 +32,1%
Гистидаза, мкМ/л/мин	1,55±0,18	5,51±1,13 +255,5%
Уроканиназа, мкМ/л/мин	0,025±0,006	0,116±0,04 +364%
СПА, ед/мл	3,14±0,26	5,1±0,92 +62,4%
АЗП, нМ МДА/мг	3,39±0,26	4,87±0,58 +43,6%
НЗП, нМ МДА/мг	7,86±0,87	11,96±1,13 +52,2%
СОД, ед/мг	25,12 ± 0,95	56,84±7,95 +126,2%
ГР, мМ/мл/мин	253,23 ± 25,13	144,57±17,14 -42,9%
α -токоферол плазма, мг%	1,05 ± 0,04	1,3±0,11 +23,8%
мембрана эритроцитов, мкг/мг	0,75±0,077	0,27±0,07 -64%
ШО, плазма, ед/мл	0,29±0,03	0,78±0,06 +168,9%
мембрана эритроцитов ед/мг	0,004±0,0004	0,047±0,009 +1075%
ДК, плазма, нМ/мл	6,75±0,44	8,63±0,6 +27,8%
мембрана эритроцитов, нМ/мг	0,89±0,072	2,35±0,32 +164%
МДА, плазма, нМ/мл	3,84±0,24	4,57±0,17 +19%
мембрана эритроцитов, нМ/мг	2,01±0,03	2,44±0,19 +21,4%
АГП, плазма, ед/мл	3,89±0,1	4,23±0,08 +8,7%
мембрана эритроцитов, ед/мг	2,15±0,12	3,1±0,33 +44,1%
	n = 37	n = 27 p < 0,05

ся. Незначительный прирост активности АЗП в поздние сроки гипокинезии (10.3%) (по сравнению с 15-суточной гипокинезией), наверное, можно объяснить включением активных форм кислорода, в том числе и супероксиданион - радикала, в метаболизм липидов, при котором повышается количество продуктов, являющихся субстратами для ферментов, участвующих в реакциях ферментативного ПОЛ (циклооксигеназа, липоксигеназа и др.), что является причиной резкого усиления последнего.

Повышение СПА, активности гистидазы и урокиназы, свидетельствующее о нарушении целостности эритроцитарных мембран и цитоплазматических мембран гепатоцитов, указывает на усиление ферментативного пути окисления, так как изменение параметров биомембран и активности мембраносвязанных ферментов находится в соответствии с изменениями интенсивности ферментативного ПОЛ [10]. Причиной усиления НЗП может быть также снижение активности ГР, свидетельствующее о нарушении функционирования ферментов глутатионовой системы в цитоплазматических мембранах и, следовательно, о снижении антиоксидантной защиты клетки.

Резкое снижение содержания витамина Е в мембранах эритроцитов приводит к снижению активности АОС, поскольку этот антиоксидант ответствен за непосредственное снижение уровня оксидантов, и его недостаток будет способствовать снижению антиоксидантного статуса цитоплазматических мембран. Следует отметить, что в условиях 60-суточной гипокинезии отмечается повышение содержания α -токоферола в плазме, составляющее 23.8% (таблица). Увеличение количества витамина Е в плазме при стрессе описано рядом авторов и связывается с выбросом последнего из жировых депо в ответ на воздействие стрессового фактора, а также с нарушением его захвата клеточными мембранами. Однако витамин Е наиболее эффективно проявляет свою активность после его включе-

ния в структуру мембран, и антиоксидантный эффект α -токоферола, еще не включившегося в структуру мембран, минимален [15].

Повышением активности НЗП и СОД можно объяснить и относительно небольшое увеличение содержания средних молекул (32.1%) на фоне ожидавшегося резкого повышения их содержания, учитывая возрастную роль супероксиданион - радикала в реакциях усиления ПОЛ.

Известно, что основным источником СМ является усиление протеолиза [7]. Накопление в организме активных форм кислорода приводит к усилению окислительной модификации белков [8] с последующим усилением их расщепления [2]. Относительно небольшое увеличение количества СМ на фоне данных, свидетельствующих об усилении НЗП и накоплении продуктов ПОЛ, подводит к предположению о том, что в данных условиях образующиеся активные формы кислорода расходуются в основном на окисление ненасыщенных жирных кислот с последующим включением образовавшихся продуктов в каскад ферментативных реакций липидной перекисидации.

Таким образом, полученные нами данные, а именно – увеличение содержания продуктов ПОЛ – АГ, ДК, МДА и ШО в плазме и мембранах эритроцитов, а также уменьшение содержания α -токоферола в мембранах эритроцитов, понижение активности ГР и резкое повышение активности СОД с одновременным повышением активности АЗП и, в особенности НЗП, а также СПА, активности гистидазы, урокиназы и уровня СМ свидетельствуют об интенсификации процессов ПОЛ в условиях длительной гипокинезии, причем свободнорадикальное окисление липидов протекает преимущественно по ферментативному пути, а повышение активности гистидазы, урокиназы и СПА свидетельствует о патологическом характере процесса.

Поступила 13.02.03

Հակաօքսիդանտային պաշտպանական համակարգը երկարադև սակավաշարժության պայմաններում

Վ.Պ. Հակոբյան, Ա.Տ. Մանուկյան

Հետազոտության նպատակն է 60-օրյա սակավաշարժության ազդեցության ուսումնասիրումը ճար-

պերի գերօքսիդացման պրոցեսների և հակաօքսիդանտային պաշտպանական համակարգի

վրա ողնաշարի վնասվածքով հիվանդների մոտ: Առողջ տղամարդկանց ստուգիչ խմբի համեմատությամբ՝ փորձարարական խմբում նկատվում է ճարպերի գերօքսիդացման արգասիքների՝ մալոնային երկալդեհիդի (ՄԵԱ), դիենային կոնյուգատների (ԳԿ), Շիֆի հիմքերի (ՇՀ) և հիդրօքսիպերօքսիդների (ՀՊ) կուտակում: Նույն խմբում նկատվում է α -տոկոֆերոլի քանակության նվազում էրիթրոցիտների թաղանթում, բայց վերջինիս բարձրացում՝ պլազմայում: Սուպերօքսիդիանտազի (ՄՂ) ակտիվությունը զգալիորեն աճում է, իսկ գլուտաթիոնոեդուկտազի (ԳՌ) ակտիվությունը կտրուկ նվազում է: Գումարային պերօքսիդազի, հիստիդազի և ուրոկանինազի ակտիվությունները բարձրանում են: Նկատվում է ասկորբատ-կախյալ (ոչ ֆերմենտային) ճարպերի գերօքսիդացման պրոցեսների ինտենսիվության բարձրացում:

Միևնույն ժամանակ նկատվում է NADPH-կախյալ (ֆերմենտային) ճարպերի գերօքսիդացման պրոցեսների ինտենսիվության շեշտակի աճ: Ստացված տվյալները վկայում են գերօքսիդացման պրոցեսների ինտենսիվության աճի մասին, ընդ որում, ճարպերի գերօքսիդացումը կրում է ախտաբանական

բնույթ, ինչի մասին է վկայում հիստիդազի, ուրոկանինազի և գումարային պերօքսիդազային ակտիվության, ինչպես նաև միջին մոլեկուլների (ՄՄ) քանակության բարձրացումը:

ՄՂ ակտիվությունը զգալիորեն աճում է, իսկ լուտաթիոնոեդուկտազի, ԳՌ ակտիվությունը կտրուկ նվազում է: Գումարային պերօքսիդազի, հիստիդազի և ուրոկանինազի ակտիվությունները բարձրանում են: Նկատվում է ասկորբատ-կախյալ (ոչ ֆերմենտային) ճարպերի գերօքսիդացման պրոցեսների ինտենսիվության բարձրացում:

Միևնույն ժամանակ նկատվում է NADPH-կախյալ (ֆերմենտային) ճարպերի գերօքսիդացման պրոցեսների ինտենսիվության շեշտակի աճ: Ստացված տվյալները վկայում են գերօքսիդացման պրոցեսների ինտենսիվության աճի մասին, ընդ որում, ճարպերի գերօքսիդացումը կրում է ախտաբանական բնույթ, ինչի մասին է վկայում հիստիդազի, ուրոկանինազի և գումարային պերօքսիդազային ակտիվության, ինչպես նաև ՄՄ քանակության բարձրացումը:

The antioxidant defense system in late hypokinesia

V.P. Hakopyan, A.H. Manukyan

The study of the influence of 60-day hypokinesia on the lipid peroxidation processes and the antioxidant defense system in patients with a damaged spinal cord has been the aim of this research. In comparison with the control group of healthy people an increase in the contents of malonic dialdehyde, dien conjugates, Schiff's bases and acylhydroperoxide has been detected. In the same group a decrease in the level of vitamin E in the membranes of erythrocytes has been noted. The activity of superoxide dismutase has been significantly increased and the activity of glutathione reductase decreased. The total peroxidase as well as of histidase and urokaninase activities have

been elevated. The ascorbate-dependent (non-enzymatic) and NADPH-dependent (enzymatic) lipid peroxidation has significantly increased.

The obtained data testify to intensification of the lipid peroxidation processes. The intensification of lipid peroxidation processes in the 60-day hypokinesia has a pathological character and the increase of the activities of histidase, urokaninase as well as of total peroxidase and the level of middle molecules testifies to it.

Литература

1. Акопян А.А. Экспериментальная и клиническая медицина, 1999, т. XXXIX, 1, с. 47.
2. Андреева Л.И., Горанчук В.В., Столярова Н.А. и др. Бюллетень экспериментальной биологии и медицины, 1999, 1, с. 19.
3. Владимиров Ю.А., Арчаков А.И. Перекисное окисление липидов в биологических мембранах. М., 1972.
4. Владыка А.С., Беляков Н.А., Шугаев А.И. и др. Вестник хирургии, 1986, 8, с. 126.
5. Гаврилов Б.Б., Мишкорудная М.И. Лабораторное дело, 1983, 3, с. 33.
6. Голиков П.П., Давыдов Б.Б., Матвеев С.Б. Вопросы мед. химии, 1987, 1, с. 47.
7. Горошинская А.Ю., Виноградов А.Ю., Лукаш А.И. Вопросы мед. химии, 1993, 5, с. 19.
8. Дубинина Е.Е., Леонова Н.В., Зыбина Н.Н. Мат. науч. конф. СПб, 1998, 2, с. 425.
9. Казан В.Е., Орлов О.Н., Прилико Л.Л. Биофизика, 1986, 18, с. 6.
10. Ланкин В.З. Украинский биохимический журнал, 1984, 3, с. 317.
11. Меерсон Ф.З., Казан В.Г., Голубева Л.Ю. и др. Кардиология, 1979, 8, с. 108.
12. Покровский А.А. Биохимические методы исследования в клинике. М., 1969, с. 349.
13. Таболин В.А., Смирнов Д.А., Буборин В.А. и др. Вопр. охраны мат. и детства, 1977, 4, с. 61.
14. Azbill R., Mu X., Bruce-Keller A., Mattson M., Springer J. Brain Res., 1997, 18(2), p. 283.
15. Cadenas E., Ginsberg M., Rabe U., Sies H. Biochem. J., 1984, 223, p. 55.
16. Di Mascio P., Briviba K., Sasaki S., Catalani L., Medeiros M., Bechara E., Sies H. Biol. Chem. 1997, 378 (9), p. 1071.
17. Duggan D.D. Arch. Biochem. Biophys., 1954, 84(1), p. 116.
18. Khanina N., Danilchenko V., Murashkevich M. Aviakosm. Ekolog. Med., 1997, 31(3), p. 23.
19. Libmer G., Davie R., Baur A. Blood., 1970, 36(2), p. 111.
20. Lowry O., Rosenbrough N., Farr A. J. Biol. Chem., 1952, 193(1), p. 265.
21. Nishikimi M., Rao N., Yagi K. Biochim. Biophys. Res. Commun., 1972, 46(2), p. 849.
22. Ohyashiki T., Suzuki S., Satoh E., Uemori Y. Biochim. Biophys. Acta., 1998, 1389(2), p. 141.
23. Pinto R., Bartley W. J., 1969, 112, p. 109.
24. Roberg K., Ollinger K. Am. J. Pathol., 1998, 52(5), p. 1151.
25. Sato Y., Kanazawa S., Sato K., Suzuki Y. Biol. Pharm. Bull., 1998, 99(1), ? 250.
26. Starkopf J., Andreasen T., Bugge E., Ytrehus K. Cardiovasc. Res., 1998, 37(1), p. 66.
27. Waterfall A., Singh G., Fry J., Marsden C. Brain Res. Protoc., 1997, 12(1), p. 17.
28. Wittmann I., Mazrak I., Wagner L., Nagy J. Dabetologia, 1997, 40(11), p. 1251.
29. Yin J., Smith M., Eppley R., Page S., Sphon J. Biochim. Biophys. Acta, 1998, 137 (1), 134.
30. Yoshioka T., Kawadae K., Shimoda T., Mori M. Amer. J. Obstet. and Gynecol., 1979, 135 (3) p. 372.