

Особенности течения перекисеобразовательного процесса в микросомальной фракции печеночной ткани белых крыс при адреналинмодулированной гипергликемии

К.Г. Карагезян, О.К. Бдоян, А.В. Мелкумян, А.В. Казарян, В.В. Ордян

*Институт молекулярной биологии НАН РА
375014, Ереван, ул. Асратяна, 7*

Ключевые слова: гипергликемия, малоновый диальдегид, активные формы кислорода

Свободнорадикальное окисление (СРО) липидов рассматривается как один из основных патогенетических механизмов формирования острого оксидативного стресса (ООС) при различных болезненных состояниях организма. Особого внимания заслуживает специфика активирования перекисеобразовательного процесса при лучевых поражениях и злокачественных новообразованиях [15], отравлениях четыреххлористым углеродом [7], алкоголем [3], микотоксинами [16,17,28], а также при расстройствах эндокринной системы [9,11,19,26,29] и нарушениях функциональной активности крови и кроветворной системы [4,13,14].

Согласно современным представлениям, развитие ООС сопровождается расстройствами структурно-функциональной организации и метаболической активности мембранных образований, создающих их патогенетический стереотип, соответствующим образом отражающийся на деятельности целостного организма. В развитии отмеченных расстройств существенное место отводится интенсификации процессов СРО липидов с использованием в качестве субстратов окисления неэстерифицированных жирных кислот (НЭЖК) моно-, ди-, три- и полиенового ряда, принимающих активное участие в образовании гидроперекисей (ГП) и многочисленных промежуточных продуктов перекисления, трансформирующихся в малоновый диальдегид (МДА) как конечный продукт СРО липидов. По имеющейся информации [27], процесс перекисеобразования в микросомальной фракции клеток различных уровней дифференциации осуществляется лишь в ферментативной НАДФН₂-зависимой системе перекисления

(НЗП) липидов, выступающей в роли донора электронов. В митохондриальной же фракции СРО липидов он протекает как в ферментативной, так и неферментативной (аскорбатзависимой) системе перекисеобразования (АЗП), где в роли основного донора электронов выступает аскорбиновая кислота.

Исходя из вышеизложенного, целью настоящего исследования явилось проведение специальных наблюдений в направлении изучения особенностей течения перекисеобразовательного процесса в НЗП и АЗП, а также сдвигов антиокислительной активности (АОА) липидов в различные периоды формирования экспериментально моделированных у белых крыс адреналинзависимых гипергликемических реакций.

Материал и методы

Исследования проводили на белых беспородных крысах-самцах массой 180–200 г, содержащихся в обычных условиях вивария и голодавших перед началом экспериментов в течение 12 ч. Внутривенное введение адреналина в количестве 2–5 мкг/100 г массы тела производили проколом шприца по биссектрисе угла венозного расширения, образованного верхней полостью и подключичной венами при крестообразной фиксации белых крыс на станках для мелких животных. Забор крови производили из указанной области через 15, 30, 45 и 60 мин после внутривенной инъекции адреналина.

Выделение микросомальной фракции печени производили на холоду в среде сахароза-трис-НСI-буфера [2], а ее осаждение осуществляли

центрифугированием в ВАК-60 при 105 000 об/мин в течение 1 ч. Количественное определение продуктов перекисления липидов в микросомальной фракции производили на основании расчета степени интенсивности окраски, развиваемой в реакции с тиобарбитуровой кислотой (адекватной концентрации исследуемого материала), регистрируемой спектрофотометрически при 535 нм с расчетом на 1 мг белка [30]. Об АОА судили по степени торможения процесса окисления метилолеата экстрактом, содержащим антиоксиданты, природные разновидности которых извлекались из липидной фракции животных тканей, растворялись в метилолеате и подвергались последующему окислению продуванием воздушной массы при 37°C в окислительной ячейке, а об уровне окис-

ления — по изменению перекисного числа. Для характеристики АОА липидной вытяжки использовали величину $\frac{T-T_0}{P}$, где T и T_0 — отражают время

образования 0,02 ммоль/г перекисей в метилолеате при окислении последнего с вытяжкой и без нее (в ч), а P — концентрацию липидов в метилолеате [5].

Результаты и обсуждение

Результаты исследований, отраженные в табл. 1, свидетельствуют о заметном возрастании в изученных биологических объектах количественного содержания продуктов перекисления липидов в обеих системах перекисеобразования, особенно в АЗП-зависимой системе.

Таблица 1

Динамика количественных изменений малонового диальдегида в NADP. H₂-(I) и аскорбатзависимой (II) системах перекисления липидов (в нмолях/мг белка) в микросомальной фракции гепатоцитов белых крыс в различные периоды формирования гипергликемии (15–60 мин), моделированной адреналином (2,5 мкг/100г массы тела), и эффекты сверхмалых доз тиосульфата натрия — 10⁻⁴М (1), 10⁻⁸М (2), 10⁻¹²М (3) на этом фоне через 2 ч после введения

Системы перекисления липидов	Промежутки времени, мин	Контроль без введения физ. раствора	Контроль с введением физ. раствора	Адреналиновая гипергликемия	1	2	3
I	15	2,89 ± 0,39	2,96 ± 0,41	3,41 ± 0,16	3,29 ± 0,17	3,06 ± 0,16	2,91 ± 0,31
	30	2,44 ± 0,23	2,81 ± 0,27	4,62 ± 0,16 ^x	3,09 ± 0,16 ^x	2,97 ± 0,23 ^{xx}	2,81 ± 0,21
	45	2,81 ± 0,21	2,85 ± 0,22	5,39 ± 0,20 ^x	4,44 ± 0,19 ^x	3,13 ± 0,22 ^x	2,83 ± 0,22
	60	2,83 ± 0,19	2,57 ± 0,21	6,47 ± 0,22 ^x	5,37 ± 0,22 ^x	4,03 ± 0,21 ^x	2,96 ± 0,22
II	15						
	30	3,27 ± 0,29	3,31 ± 0,31	4,64 ± 0,19 ^x	4,09 ± 0,23 ^x	3,97 ± 0,23 ^x	3,39 ± 0,27
	45	3,23 ± 0,27	3,36 ± 0,25	5,09 ± 0,22 ^x	4,69 ± 0,22 ^x	4,07 ± 0,23 ^x	3,43 ± 0,29
	60	3,31 ± 0,26	3,33 ± 0,26	5,69 ± 0,25 ^x	5,33 ± 0,23 ^x	4,27 ± 0,25 ^x	3,82 ± 0,26 ^{xx}
		3,29 ± 0,28	3,31 ± 0,28	5,99 ± 0,27 ^x	5,31 ± 0,26 ^x	4,03 ± 0,25 ^x	3,82 ± 0,25 ^{xx}

Примечание. п=36; x — P<0,001; xx — P<0,01; без обозначений — расхождения от контроля статистически не достоверны

Регистрируемая в норме стационарная концентрация перекисей липидов обусловлена, с одной стороны, скоростью течения процессов радикалообразования, а с другой — активностью реакций их разрушения, катализируемых антиоксидантами.

Установленное нами возрастание уровня липидных перекисей мы склонны объяснить нарушением динамического равновесия между эндогенными системами про- и антиоксидантного действия в пользу первых, что является одним из основных

патогенетических факторов, стимулирующих на фоне прогрессирования болезненного процесса механизм деградации эндогенных антиоксидантов. Выяснение особенностей изменения АОА при изученном болезненном состоянии организма подтверждает высказанные предположения и свидетельствует о вреязависимости развития описанных нарушений, наиболее отчетливо проявляющихся в виде понижения АОА в стадии максимального развития болезненного процесса.

Как известно, перекиси липидов отличаются ярко выраженным ингибирующим действием на сульфгидрильные группы белков [6], считающиеся

представителями природных антиоксидантов. Согласно многочисленным указаниям литературы [20–24] преимущественно последних лет [1, 8, 18, 25, 27], тиосульфат натрия (ТСН) выступает в роли признанного протектора эндогенных систем антирадикальной защиты клетки и субклеточных образований, как об этом свидетельствуют результаты, приведенные в табл. 2. Уровень падения АОА, согласно нашим наблюдениям, находится в полной зависимости от глубины стойкости и формирования гипергликемической реакции организма, соответствующей в наших экспериментах 60-й минуте после инъекции адреналина.

Таблица 2

Динамика изменений антиокислительной активности липидов (в %) в микросомальной фракции гепатоцитов белых крыс в различные периоды формирования гипергликемии (15 – 60 мин), моделированной адреналином (2,5 мкг/100г массы тела), и эффекты сверхмалых доз тиосульфата натрия – 10^{-4} М (1), 10^{-8} М (2), 10^{-12} М (3) на этом фоне через 2 ч после введения

Промежутки времени, мин	Контроль без введения физ. раствора	Контроль с введением физ. раствора	1	2	3
15	102,0 ± 0,93	83,3 ± 0,61*	88,6 ± 0,66*	95,1 ± 0,77**	97,3 ± 0,89
30	101,0 ± 0,91	79,3 ± 0,62*	89,8 ± 0,68*	94,0 ± 0,88**	96,9 ± 0,91
45	103,0 ± 0,96	65,6 ± 0,65*	76,1 ± 0,66*	92,3 ± 0,89*	96,1 ± 0,90
60	102,0 ± 0,95	52,7 ± 0,63*	71,3 ± 0,62*	81,7 ± 0,86*	95,6 ± 0,93

Примечание. n=36; обозначения те же, что и в табл. 1

В связи с отмеченным представляло существенный интерес выяснение особенностей действия ТСН и главным образом его сверхнизких концентраций (10^{-4} М, 10^{-8} М, 10^{-12} М) на динамику перекисеобразовательного процесса в НЗП и АЗП системах СРО липидов в микросомальной фракции гепатоцитов и изменения при этом АОА липидных вытяжек из исследуемого материала. Подобная постановка вопроса заслуживает особого внимания в свете современных представлений [5], касающихся факта исключительно высокой эффективности действия сверхмалых доз факторов химической и физической природы.

Согласно результатам проведенных исследований, отраженным в табл. 2, ТСН способствует повышению АОА в исследованных субклеточных

образованиях. Примечательно, что возрастание этого показателя сопровождается одновременно развивающимся уменьшением выхода перекисей в обеих системах перекисеобразования, как это показано в табл. 1. Являясь мощным ингибитором радикалообразовательных процессов в качестве активного синергиста α -токоферола, ТСН способствует в то же время увеличению эндогенных запасов глутатиона, выступающего в качестве одного из главных представителей эндогенной системы антирадикальной защиты клетки, основной механизм действия которой направлен на ускорение процессов утилизации продуктов перекисления с участием, в частности, глутатионпероксидазной системы. Высокий уровень активности последней и средство к ГП находят свое отчет-

ликое проявление в миссии одного из основных действующих начал, эффективно конкурирующих за взаимодействие с ГП, образующихся из НЭЖК, интенсивно вовлекающихся в цепь радикалообразовательного процесса, ведущего к выходу конечного продукта – МДА.

Анализ результатов проведенных исследований со всей очевидностью свидетельствует об исключительно высокой терапевтической эффективности

ТСН как основного синергиста гидроксиформы эндогенного α -токоферола – мощного ингибитора СРО липидов, значительно активирующегося при гипергликемических состояниях организма различного происхождения и участвующего в качестве главного патогенетического аргумента в формировании тяжелых проявлений ООС при многочисленных болезненных состояниях организма.

Поступила 30.08.06

Գերօքսիդառաջացման պրոցեսի ընթացքի առանձնահատկությունները սպիտակ առնետների լյարդի հյուսվածքում ադրենալինով մոդելավորված հիպերգլիկեմիայի պայմաններում

Կ.Գ. Ղարաբյոզյան, Հ.Կ. Բոյոյան, Ա.Վ. Մելքումյան, Ա.Վ. Գազարյան, Վ.Վ. Օրդյան

Ադրենալինի ազդեցության հետևանքով սպիտակ առնետների մոտ առաջացած հիպերգլիկեմիայի պայմաններում արձանագրվում է ազատառադիկալային պրոցեսների արագացում, որը զուգորդվում է մալոնային դիալդեհիդի քանակական աճով հեպատոցիտների միկրոսոմալ ֆրակցիայում: Այս տեղաշարժերին զուգահեռ արձանագրվում է նաև վերջիններում հակաօքսիդացման ակտիվության զգալի նվազում: Նշված խախտումները կարգավորվում են նատ-

րիումի քիսուլֆատի գերցածր քանակների՝ 10^{-4}M , 10^{-8}M և առավել ևս 10^{-12}M ազդեցությամբ:

Նշված նյութի տարբեր քանակների բարերար ազդեցության հիմքում ընկած մոլեկուլային սաքսանական մեխանիզմները պայմանավորված են նրա վառ արտահայտված դրական ազդեցությամբ բջջի հակառադիկալային պաշտպանության էնդոգեն համակարգերի վրա:

Peculiarities of peroxide formation processes in rat liver tissue microsomal fraction at adrenaline modulated hyperglycemia

K.G. Karageuzyan, H.K. Bdoian, A.V. Melkumyan, A.V. Ghazaryan, V.V. Ordyan

Adrenalin modulated hyperglycemia in rats is characterized by significant intensification of free radical peroxidation processes, which are accompanied by the pronounced increase in malonic dialdehyde concentration in rat liver microsomal fraction with simultaneous decrease of the antioxidation activity. Using of super low concentrations of sodium thiosulfate –

10^{-4}M , 10^{-8}M and especially 10^{-12}M leads to normalization of disorders mentioned. The possible molecular mechanisms of positive action of the physiologically active preparation can be explained by its very strong stimulating activity on endogenous systems of cell antiradical protection.

Литература

1. Аганянц М.А. Динамика изменения содержания нейтральных гликолипидов в эритроцитах при моделировании аллоксанового диабета у белых крыс и особенности нормализующего действия лазерного облучения на этом фоне. Автореф. дис... канд. биол. наук. Ереван, 2003.
2. Арчаков А.И., Девиченский В.М., Карузина И.И. и др. Влияние концентрации буфера на скорость реакций транспорта электронов в микросомах печени. Биохимия, 1968, т. 33, 3, с. 479-486.
3. Амирханян Л.Т., Карагезян К.Г. Сдвиги некоторых сторон фосфолипидного обмена в головном мозгу и печени белых крыс при длительном алкогольном отравлении. Вopr. биохимии мозга, Ереван, 1974, IX, с. 43-63.
4. Билян Л.Ф. Роль антиоксидантов в упорядочении нарушенных сторон метаболизма фосфолипидов в мембранах эритроцитов больных острым лейкозом. Дис... канд. мед. наук. Ереван, 1986.
5. Булакова Е.Б. Особенности действия сверхмалых доз биологически активных веществ и физических факторов низкой интенсивности. Российский хим. журнал, 1999, т. XLIII, с.3-11.
6. Булакова Е.Б., Дзюбери Н.М., Пальмина Н.П., Эмануэль Н.М. Антиокислительная активность липидов печени мышей при лучевой болезни и перивитном лейкозе и действие ингибиторов свободнорадикальных реакций. Докл. АН СССР, 1986, т. 163, 5, с. 1278-1281.
7. Владимиров Ю.А., Арчаков А.И. Перекисное окисление липидов в биологических мембранах. М., 1972, с. 241-243.
8. Едоян А.Р. Специфика корректирующего действия сверхнизких доз факторов химической и физической природы при нарушениях метаболизма фосфолипидов у белых крыс с моделированным аллоксаном сахарным диабетом. Автореф. дис... канд. биол. наук. Ереван, 2004.
9. Едоян А.Р., Карагезян М.К., Бояджян А.С., Осипян Л.Л., Овсепян Л.М. Особенности действия сверхмалых доз Ca^{2+} -дс-РНК в нормализации обмена фосфолипидов при отравлениях микотоксином зеараленоном и аллоксаном диабете. II Международная конференция по химии органических и элементоорганических пероксидов. Тез. докл. М., 2003, с. 37, 183-184.
10. Едоян Л.В. Качественно-количественные нарушения фосфолипидов субклеточных образований гепатоцитов аллоксандиабетических белых крыс и корректирующее действие сверхнизких доз факторов химической и физической природы. Автореф. дис... канд. биол. наук. Ереван, 2004.
11. Едоян Л.В., Карян Ш.С., Амирханян О.М., Джанталадян Е.Г., Паладян А.А., Арутюнян В.М., Едоян А.Р., Карагезян К.Г. Особенности нарушений процессов свободнорадикального окисления липидов в митохондриях аллоксандиабетических белых крыс и пути их эффективного корректирования применением сверхмалых доз Ca^{2+} -дс-РНК. International Journal on Immunorehabilitation, 2003, Vol 5, 1, p.87. abstr. N 121.
12. Казарян А.В. Особенности нарушений фосфолипидного обмена, процессов свободнорадикального окисления, свертываемости крови и эффективность механизмов их корректирования при моделированном аллоксаном сахарном диабете. Автореф. дис... канд. биол. наук. Ереван, 2003.
13. Казарян В.В. Активность перекисного окисления липидов и фосфолипазы A_2 в эритроцитах крови при лейкемии. Ж. Вестник МАНЭБ, СПб., 2001, т. 6, 42, с. 143-145.
14. Казарян В.В. Нарушение метаболизма мембранных фосфолипидов при лейкозе у коров и под действием гипоталамического цитокина PRP. Автореф. дис... канд. биол. наук. Ереван, 2004.
15. Карагезян К.Г., Овсепян Л.М., Дадаян М.А., Адоңц К.Г. Изучение перекисного окисления и антиокислительной активности липидов при экспериментальном панкреатите. Докл. АН СССР, 1986, т.286, 2, с. 73-76.
16. Карагезян М.К., Овсепян Л.М., Овакимян С.С., Бояджян А.С., Осипян Л.Л., Карагезян К.Г. Микотоксин зеараленон как инициатор процессов свободнорадикального окисления липидов в митохондриальной и микросомальной фракциях печени белых крыс. Докл. РАН, 1995, т.341, 2, с. 408-411.
17. Карагезян М.К., Овсепян Л.М., Овакимян С.С., Бояджян А.С., Осипян Л.Л., Карагезян К.Г. Молекулярный механизм токсического действия микотоксина зеараленона на метаболизм фосфолипидов, процессы перекисеобразования в мембранах митохондрий головного мозга и эритроцитов, резистентность последних к перекисному гемолизу у белых крыс и эффекты тиосульфата на этом фоне. Докл. РАН, 1995, т.41, 3, с.408-411.
18. Карян Ш.С. Этиопатогенетические особенности срывов антирадикальной защиты клетки при моделировании аллоксанового диабета у белых крыс и возможные механизмы их упорядочения. Автореф. дис... канд. биол. наук. Ереван, 2003.
19. Карян Ш.С., Едоян Л.В., Едоян А.Р., Овсепян Л.М., Карагезян К.Г. Особенности нормализующего действия лазерного излучения при нарушениях метаболизма фосфолипидов и процессов перекисеобразования в печеночной ткани аллоксандиабетических белых крыс. Информационные технологии и управление, Ереван, 2003, т.3, с.239-248.
20. Матинян Г.В. Функциональные изменения печени и лечебное действие тиосульфата натрия при хлоропреновом отравлении. Изв. АН АрмССР, 1959, т.12, 6, с. 33-42.
21. Матинян Г.В. Действие хлоропрена и тиосульфата натрия на активность орнитинтранскарбамиллазы и карбамилфосфатсинтазы. Биол. журн. Армении, 1968а, т.21, 9, с.22-29.
22. Матинян Г.В. Действие хлоропрена и тиосульфата натрия на аргининсукцинат синтазу и аргиназную активность. Биол. журн. Армении, 1968б, т.21, 10, с.16-23.
23. Матинян Г.В. Роль эндогенного тиосульфата натрия при хлоропреновом отравлении. Биол. журн. Армении, 1969, т.22, 9, с.22-29.
24. Матинян Г.В. Изменение ферментных систем белкового обмена и функции некоторых органов при хлоропреновом отравлении и антихлоропреновое действие тиосульфата натрия. Дис... докт. биол. наук. Ереван, 1970.

25. *Мартirosyan E.A.* Изучение гликофинголипидов и сфингозина в печени и сердце белых крыс при аллоксановом диабете и при его лечении. Автореф. дис..... канд. биол. наук. Ереван, 2004.
26. *Aganyantz M.A., Edoyan L.V., Karyan Sh.S., Edoyan A.R., Hovsepyan L.M., Karageuzyan K.G.* Mechanisms of rat brain glyco-, phospholipids metabolism and free radical peroxidation reaction disorders under the modulated alloxan diabetes, IST International Society for Neurochemistry and the APSN Asian-Pacific Society for Neurochemistry, Hong Kong, 2003, abstr. N 10285.
27. *Hoshtejn P., Ernster L.* Adp-activated peroxidation coupled on the TPNH oxidase system of mycosomes, *Biochem. and Biophys. Res. Commun.*, 1963, 12, p.388-394.
28. *Karageuzyan K.G., Pogosyan A.Yu., Sekoyan E.S., Zakharyan A.R., Karageuzyan M.K., Osipyany L.L., Boyajyan A.S.* Molecular mechanisms of oxidative stress in pathogenesis of mycotoxin zearalenon-induced toxic effect in rat brain tissue, Abstract of the I-st conference for Armenian Association of IBRO, Yerevan, RA, 1996.
29. *Karageuzyan K.G., Elbakyan G.V., Hovakimyan S.S., Edoyan A.R., Harutyunyan V.M., Hakobyan G.S., Hovsepyan L.M.* Neurodegenerative changes in alloxan-diabetes oxidative stress on the background of abnormalities of phospholipid and free radical peroxidation process, International Congress on "Molecular Mechanisms of Neurodegeneration", Abstracts book, Milan, Italy, 2003, abstr. N P23.
30. *Lowry D.H., Rosenbrough N.J., Farr A.L., Rahdall R.J.* Protein measurement with folin phenol reagent, *J. Biol. Chem.*, 1951, Vol. 193, p.265-269.