

Биолог. журн. Армении, 3-4 (50), 1997

УДК 616.155.2.9:546.77

ДЕЙСТВИЕ МОЛИБДЕНА НА ПРОЦЕСС ПЕРЕКИСНОГО ОКИСЛЕНИЯ ЛИПИДОВ, АКТИВНОСТЬ АНТИОКИСЛИТЕЛЬНОГО ФЕРМЕНТОВ И МЕТАБОЛИЗМ ФОСФОЛИПИДОВ

Г.В. ЗАХАРЯН*, М.М. МЕЛКОНЯН*, К.Г. КАРАГЕЗЯН**

*Институт молекулярной биологии НАН Армении, 375044, Ереван

**Ереванский государственный медицинский университет им. М. Гераци, 375025

Изучали процессы перекисного окисления липидов, содержание и состав фосфолипидов, а также активность супероксиддисмутазы, глутатионпероксидазы и глутатионредуктазы в печени белых крыс при введении различных доз молибдена. Установили, что под влиянием молибдена наблюдается увеличение количества перекиси и снижение уровня ферментов антирадикальной защиты клетки. Показана ведущая роль увеличения лизофосфатидилхолин в изменении уровня общих фосфолипидов.

Անումնասիրվել են լիպիդների պերօքսիդացիոն պրոցեսները, ֆոսֆոլիպիդների պարունակությունն ու կազմը, ինչպես նաև գերօքսիդիզմոնտազի, գլուտատիոնպերօքսիդազի, գլուտատիոնրեդուկտազի ֆերմենտային ակտիվությունները սպիտակ առնետների լյարդում, մոլիբդենի տարբեր դոզաներ ներարկելիս: Հայտնաբերվել է, որ մոլիբդենի մեծաքանակ ընդունման դեպքում նկատվում է պերօքսիդացիոն պրոցեսների արագորյան բեժգնացում և ըզջի հակառադիկալային պաշտպանության ֆերմենտների ակտիվության անկում: Ցույց է տրվել սպիտակ առնետների լյարդի իյոսվածքներում լիզոֆոսֆատիդիլխոլինների պեղացման առաջատար դերը ընդհանուր ֆոսֆոլիպիդային մակարդակի փոփոխության մեջ:

Lipid peroxidation, processes the contents and composition of phospholipids, as well as the activity of superoxide dismutase, glutathione peroxidase and glutathione reductase were studied in rats liver tissue at injection of various doses of molybdenum. The increase of peroxide and the decrease of level of the cell antimical protection enzymes were observed under the influence of molybdenum. The leading role of the lysophosphatidylcholines increase in alteration of the level of total phospholipids was revealed.

Молибден - фосфолипиды - перекисное окисление - антиокислительные ферменты - супероксиддисмутаза - глутатионпероксидаза

Согласно современным представлениям [2,5], уровень активации перекисного окисления липидов (ПОЛ) является следствием неакцепторной функции молекулярного кислорода, непосредственно взаимодействующего с метаболитами, что возможно в случае образования активированных форм кислорода или при отсутствии в среде радикалов, т.е. неспаренного электрона, обладающего высоким уровнем реакционной способности. В связи с отмеченным особую внимания заслуживает

образование в клетке активных форм кислорода в виде анион радикала ($O_2^{\cdot-}$) и синглетного кислорода. В физиологических условиях уровень указанных разновидностей кислорода оказывается строго лимитированным благодаря наличию в тканях ферментов, участвующих в реакциях ингибирования их образования на стадии активации кислорода - супероксиддисмутазы (СОД) и способствующих утилизации высоких концентраций гидроперекисей - глутатионредуктазы (ГР) и глутатионпероксидазы (ГП).

Исходя из вышеизложенного, нами была поставлена цель проследить за динамикой процесса перекиссообразования, изменениями активностей СОД, ГП, ГР и состава фосфолипидов в печени на фоне молибденовых отравлений.

Материал и методика. Исследование проводили на беспородных белых крысах обоего пола массой 150-200г, получавших ежедневно с помощью поилки на протяжении 30 дней водный раствор молибденовокислого натрия (Na_2MoO_4), что в пересчете на элементарный молибден соответствует его 50, 100, 300, 500 мг/кг массы.

Гомогенизирование печеночной ткани проводили в среде, содержащей 0,25М сахарозу и 0,01М трис-НС буфер, рН 7,4. Микросомальную фракцию выделяли центрифугированием (ВАК-60) при 105000g [1] из надосадочной жидкости, полученной после осаждения митохондрий (К-24) при 11000g. Активность реакции ПОЛ определяли в ферментативной - НАДФН - и в неферментативной - аскорбат-зависимой системах окисления по интенсивности развития розового окрашивания, обусловленного образованием хромагена в реакции комплексования малонового диальдегида с тиобарбитуровой кислотой [2]. Определение содержания общего белка осуществляли методом Лоури [7]. Активность СОД - по дисмутированию $O_2^{\cdot-}$ в модельной системе, содержащей фенилдиметилсульфат, НАДН, нитроазий тетрасиний [8]. Активность ГП и ГР - по восстановлению глутатиона в глутатионпероксидазной реакции [9].

Фракционирование индивидуальных фосфолипидов проводили методом одномерной хроматографии в тонком слое силикагеля с использованием системы растворителей: хлороформ-метанол-аммиак 65:35:5. Фосфолипидные пятна идентифицировали с помощью соответствующих свидетелей. Минерализацию липидного фосфора осуществляли в среде серной и азотной кислот с последующим расчетом неорганического фосфора в микрограммах из 1г сухой массы [3].

Статистическую значимость результатов исследований оценивали методом Стьюдента.

Результаты и обсуждение. Согласно проведенным исследованиям (табл.1), введение молибдена сопровождается активированием реакций перекиссообразования как в аскорбат-, так и НАДФН-зависимых системах перекисления липидов. У животных контрольной группы существенных отклонений и интенсивности выхода малонового альдегида (МДА) не наблюдали. Максимальные сдвиги в интенсивности течения реакций свободнорадикального окисления (СРО) липидов, особенно в неферментативной системе окисления, были зарегистрированы при 30-дневной заправке высокими дозами (300 и 500 мг/кг). Учитывая зависимость течения реакций ПОЛ от состояния ферментных систем антиокислительной защиты клетки, обусловленной уровнем ее обеспеченности веществами антиоксидантного действия, мы проводили серию экспериментов по изучению активностей СОД, ГП и ГР. Согласно табл.2, эффекты молибдена сопровождаются развитием заметного дозозависимого уменьшения активности СОД в печени, особенно при его

Таблица 1. Динамика содержания перекисей липидов (н/моль малонового диальдегида на 1 мг белка) в микросомальной фракции печени белых крыс при молибденовом токсикозе (n=6)

Дни исследований	Дозы, мг/кг	Аскорбатзависимое перекисление		НАДФН-зависимое перекисление	
Контроль		9,53±0,56		7,69±0,58	
10	50	11,17±0,64	P<0,1	10,46±1,10	P<0,05
	100	12,58±0,51	P<0,01	11,42±0,69	P<0,02
	300	14,81±0,61	P<0,001	13,71±0,53	P<0,002
	500	17,77±0,88	P<0,001	17,49±0,32	P<0,001
20	50	16,17±0,12	P<0,01	14,75±0,85	P<0,001
	100	17,51±1,00	P<0,001	15,28±1,08	P<0,001
	300	21,56±0,63	P<0,001	14,04±0,93	P<0,002
	500	24,05±1,35	P<0,001	19,48±0,82	P<0,001
30	50	14,66±0,83	P<0,001	14,80±0,53	P<0,001
	100	18,41±0,77	P<0,001	16,81±0,63	P<0,001
	300	25,51±1,12	P<0,001	23,12±1,10	P<0,001
	500	26,35±0,92	P<0,001	25,99±0,88	P<0,001

Таблица 2. Динамика изменений супероксиддисмутазы (ед.активности/мг белка), глутатионпероксидазы (мкмоль глутатиона/мг белка) и глутатионредуктазы (мкмоль НАДН/мг белка) в печеночной ткани белых крыс при действии различных доз молибдена (n=7)

Дни исследований	Дозы, мг/кг	СОД	ГП	ГР
Контроль		25,60±0,31	3,18±0,12	0,05±0,0039
10	50	20,25±0,60 а	3,68±0,25 г	0,065±0,004 б
	100	18,98±0,33 а	3,72±0,32 г	0,059±0,003 г
	300	16,32±0,41 а	3,83±0,25 б	0,056±0,005 в
	500	16,00±0,26 а	3,70±0,18 б	0,060±0,003 в
20	50	18,35±0,51 а	2,23±0,18 а	0,040±0,004 б
	100	17,26±0,43 а	2,28±0,23 г	0,038±0,002 в
	300	15,38±0,34 а	2,03±0,09 а	0,038±0,003 в
	500	14,17±0,03 а	2,00±0,15 а	0,043±0,001 в
30	50	15,73±0,35 а	1,62±0,10 в	0,037±0,002 в
	100	14,32±0,28 а	1,52±0,21 а	0,035±0,004 в
	300	13,28±0,20 а	1,48±0,17 а	0,018±0,003 а
	500	12,77±0,11 а	1,37±0,19 а	0,016±0,002 а

Примечание "а" - P<0,001; "б" - P<0,01; "в" - P<0,02; "г" - P<0,1.

высоких концентрациях - 300 и 500 мг/кг. Отмеченные сдвиги мы склонны объяснить повышением при изученном токсикозе содержания активных форм кислорода (супероксидный анион, перекись водорода, липоперекиси). Как известно, образование (·) в клетках происходит при

участии молибденсодержащих ксантиноксидазы, альдегидоксидазы, пероксидазы, наиболее активирующихся при молибденозе [4]. Цитотоксичность O_2^* обусловлена ее способностью трансформироваться в другие сильнодействующие разновидности окислителей - гидроксильный радикал (ОН) и синглетновозбужденную молекулу кислорода [6]. Вместе с тем известно об уменьшении содержания меди при избыточном поступлении в организм молибдена [4]. Нам представляется, что причиной понижения активности СОД может быть истощение ее содержания вследствие дефицита в организме меди, необходимой для биосинтеза медьсодержащей СОД.

По данным табл. 2, при действии малых доз молибдена наблюдается повышение активностей ГП и ГР, а при более высоких - 300 и 500 мг/кг, наоборот, понижение. Активирование ГП при воздействии малых доз молибдена может рассматриваться как проявление компенсаторно-приспособительной антирадикальной реакции организма, постепенно утрачиваемой по мере увеличения его дозировки с одновременно развивающимся ингибированием активностей СОД, ГП и ГР. Вышеуказанное позволяет сделать вывод о стимулирующем воздействии молибдена на интенсивность течения реакции СРО липидов со значительным выходом перекисей липидов, что в известной степени обусловлено ингибирующим воздействием высоких концентраций молибдена на активность СОД, ГП и ГР. Низкие дозы молибдена оказывают на ГП и ГР стимулирующее влияние.

Известно, что перекисное окисление затрагивает фосфолипидные компоненты клетки. Исходя из этого, нам было интересно проследить за качественным и количественным содержанием фосфолипидов при затравке молибденом животных в различные сроки. Как видно из табл. 3, молибденовый токеникоз сопровождается уменьшением в печени количества

Таблица 3. Содержание фосфолипидов (% от общего количества фосфолипидов) в печени белых крыс, получавших молибден (n=7)

Дни исследований		10				20				30				
дозы, мг/кг		50	100	300	500	50	100	300	500	50	100	300	500	
ФЛ	Кон- троль													
ЛФХ		10,48	17,08	22,28	25,84	27,79	17,72	22,86	24,58	28,68	23,80	25,87	27,70	28,58
СФМ		10,54	10,14	10,13	10,47	10,75	11,83	10,06	11,03	10,18	10,07	9,95	11,04	11,04
МФИФ		5,48	6,26	6,14	6,27	6,42	6,32	6,15	6,56	7,15	6,54	6,90	6,89	6,84
ФХ		25,94	20,07	17,14	15,29	15,15	18,83	17,97	15,93	14,08	17,39	15,55	14,70	14,67
ФС		15,54	16,26	15,48	13,57	13,33	14,37	13,49	12,08	11,12	14,08	12,20	11,18	10,90
ФЭ		17,15	13,35	11,64	11,44	9,07	13,17	12,02	11,59	9,75	10,70	10,97	10,12	9,57
КЛ		14,90	16,79	17,14	17,09	17,45	17,72	17,41	18,15	19,00	17,39	18,53	18,28	18,37

Примечание: ЛФХ - лизофосфатидилхолин; СФМ - сфингомиелин; МФИФ - монофосфоинозитидфосфатид; ФХ - фосфатидилхолин; ФС - фосфатидилсерин; ФЭ - фосфатидилэтаноламин; КЛ - кардиолипин.

ФХ, ФЭ, ФС, т.е. именно тех липидов, в составе которых имеются β -ацилы ненасыщенных жирных кислот. Наблюдается увеличение количества ЛФХ, что связано с усилением процесса перекисидации липидов, с одной стороны, и повышением активности фосфолипазы A_2 - с другой. Количество сфингомиелина не претерпевает каких-либо существенных отклонений, что объясняется его структурой, содержащей в своем составе насыщенные жирные кислоты, которые более устойчивы к окислению. Большой интерес вызывает изменение содержания МФИФ и КЛ. Благодаря наличию диссоциированных фосфатных групп МФИФ обладают ярко выраженными анионными и гидрофильными свойствами, что позволяет им в силу своей электроотрицательности при физиологических значениях рН влиять на общий заряд мембран клеток. Результаты наших исследований показали увеличение содержания МФИФ и КЛ, что, по всей видимости, связано с компенсаторно-приспособительными механизмами, направленными на нормализацию отмеченных отклонений. Таким образом, изменение скорости окислительных реакций в печени при молибденовом токсикозе связано с изменением состава фосфолипидов, приводящим к нарушению липид-белковых взаимодействий, что может иметь немаловажное значение в патогенезе молибденоза.

ЛИТЕРАТУРА

1. Арчаков В.И., Девичинский В.М. Биохимия, 33, 479-482, 1968.
2. Владимиров Ю.А., Арчаков А.И. Перекисное окисление липидов в биологических мембранах. М., 1972.
3. Зубер В.Л. В кн.: Методы биохимических исследований. Л., 1982
4. Машипян А.Х. Канд. дисс., Ереван, 1981.
5. Осипов А.Н., Азизова А.О., Владимиров Ю.А. Усп. биол. химии, 31, 180, 1990.
6. Швинка Ю.Э. В кн.: Биомембраны. Структура и медицинские аспекты. Рига, 1981.
7. Lowry O.H. et al. J. Biol. Chem., 153, 265-273, 1951.
8. Nishikimi M., Rao N.A. Biochem. Biophys. Res Commun., 116, 849-853, 1972.
9. Pinto R.F., Bartley W. J. Biochem., 115, 440-456, 1969.

Получила 31.VIII.1997