

УДК 577.115+612.015.14

БИОХИМИЯ

А. Л. Шалджян, С. Л. Мкртчян, член-корреспондент АН АрмССР В. Г. Мхитарян

Ненасыщенные жирные кислоты и перекисное окисление в печени крыс

(Представлено 22/II 1988)

Процессы перекисного окисления липидов (ПОЛ), усиливающиеся при различных патологических состояниях, а также при стрессе (1), сопровождаются, как было показано ранее (2), увеличением активности фосфолипазы A_2 , что приводит к увеличению выброса свободных ненасыщенных жирных кислот (НЖК). Последние при наличии ряда благоприятных условий могут подвергаться переокислению, как это было показано для модельных систем (3) и, возможно, являться инициаторами переокисления уже эстерифицированных ацилов фосфолипидов биомембран. Однако данные некоторых исследователей (4,5) указывают на ингибирующее действие фосфолипазы A_2 на ПОЛ, и, таким образом, вопрос о роли продуктов действия фосфолипазы A_2 , т. е. НЖК, в процессах ПОЛ остается пока открытым. Изучению этой проблемы посвящена настоящая работа. Нами было изучено действие линолевой и арахидоновой кислот на ПОЛ в различных субклеточных фракциях печени крыс в условиях *in vitro*.

Эксперименты проводили на 45 белых беспородных крысах массой 150—180 г. После декапитации интактных животных извлекали печень, которую гомогенизировали в 0,15 М КСl. Дальнейшее фракционирование гомогената с целью получения митохондрий и микросом проводили методом дифференциального центрифугирования также в солевом растворе (6,7). Полученные фракции инкубировали при 37°C различное время и в различных условиях (см. подписи к рисункам) со спиртовыми растворами линолевой (СССР, х. ч.) и арахидоновой (Sigma) кислот (конечная концентрация этанола—0,5%), после чего в них определяли интенсивность перекисного окисления липидов по уровню малонового диальдегида (МДА), обнаружение которого велось по ТБК-тесту (8). Среда инкубации содержала 0,1 М $Na_4P_2O_7$, рН=7,4, 10^{-4} или 10^{-6} М НЖК и суспензию одной из субклеточных фракций или гомогената печени (белок—1—2 мг). Инкубация НЖК с инициаторами переокисления, применяемыми в этой методике ($Fe^{+2} + НАДФН_2$) в отсутствие биологического материала не приводила к автоокислению жирных кислот. Белок определяли по Лоури. Статистическую обработку полученных данных проводили с использованием непараметрического критерия Уилкоксона—Манна—Уитни (9).

Эксперименты проводили с субклеточными фракциями, где наиболее интенсивно протекают процессы ПОЛ (микросомы и митохондрии), а также для сравнения в гомогенате. На первом этапе наших исследований было изучено влияние НЖК на ПОЛ при одновременной инкубации кислот с индукторами перекисного окисления. Надо отметить, что общая направленность колебаний уровня МДА во всех исследованных фракциях примерно одинаковая (рис. 1—3) и выражается в уменьшении скорости накопления МДА при действии НЖК в концентрации 10^{-4} М. Наиболее отчетливо эти изменения проявляются в гомогенате (рис. 1), где арахидоновая кислота практически не влияла на ПОЛ, в то время как при действии линолевой кислоты (10^{-4} М) скорость ПОЛ уменьшалась почти в 3 раза. Та же кислота в концентрации 10^{-6} М лишь в первые 30 мин заметно уменьшала накопление МДА, а спустя 30 мин, т. е. к концу 60-ой мин, эти изменения уже нивелировались. В микросомах (рис. 3) наблюдалась примерно такая же картина, но здесь отчетливую тенденцию к уменьше-

ни МДА/мг белка

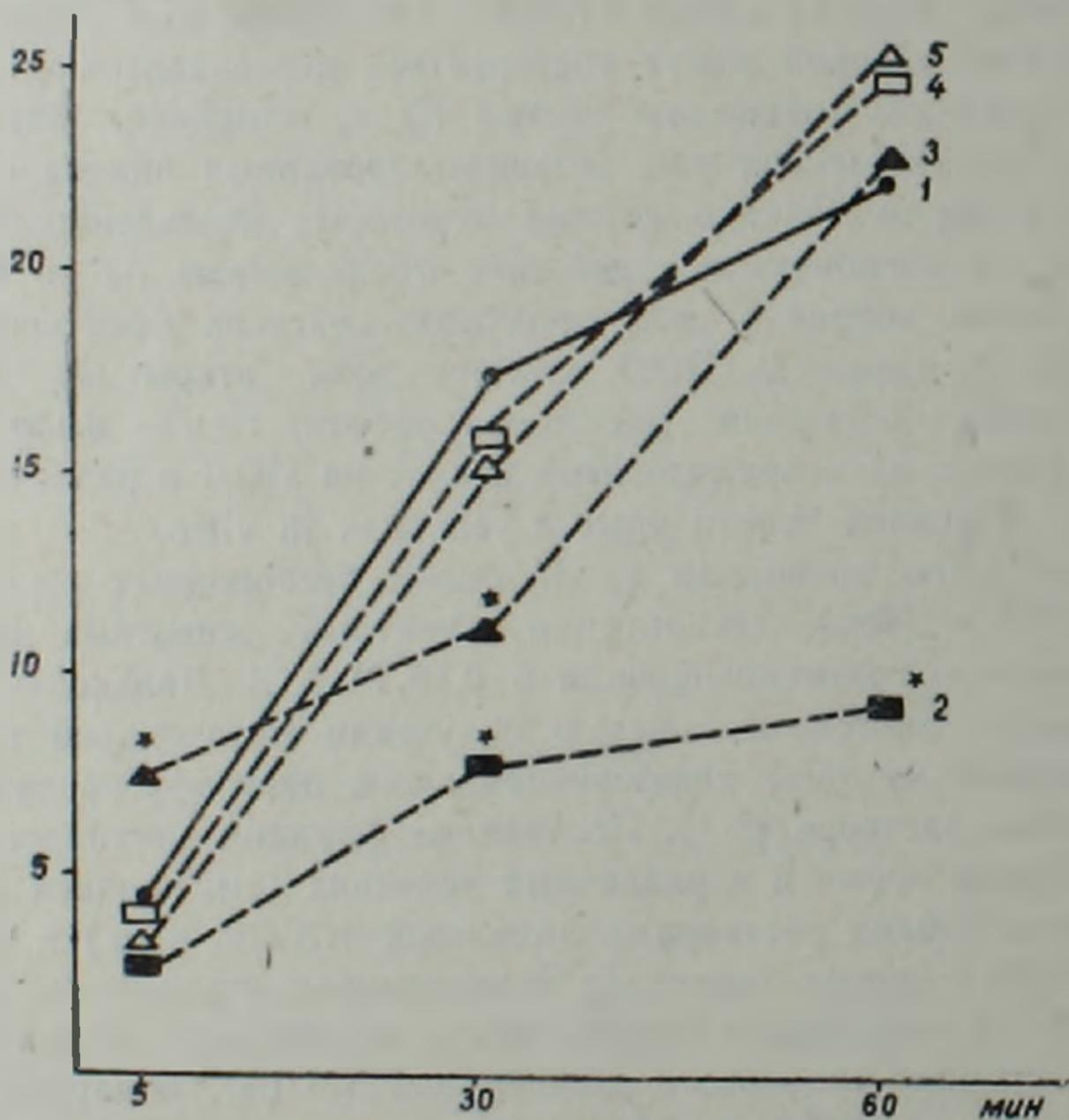


Рис. 1. Влияние НЖК на ПОЛ в гомогенате печени крыс при одновременном инкубировании жирных кислот и индукторов перекисного окисления: 1—контроль; 2—линолевая кислота 10^{-4} М; 3—линолевая кислота 10^{-6} М; 4—арахидоновая кислота 10^{-4} М; 5—арахидоновая кислота 10^{-6} М; *— достоверные данные

нию интенсивности ПОЛ проявляла и арахидоновая кислота (10^{-4}). Но более эффективными и здесь были обе концентрации линолевой кислоты (10^{-4} М в большей степени, нежели 10^{-6}). В митохон-

дриальной фракции (рис. 2) наиболее выраженное ингибирующее влияние оказывала арахидоновая кислота (10^{-4}). Несмотря на несколько парадоксальный всплеск ПОЛ к 30-й минуте при действии 10^{-4} М линолевой кислоты, общая скорость перекисления при этом также была ниже контрольных цифр (на 62,2%).

Таким образом, мы наблюдаем отчетливый дозозависимый ингибирующий эффект НЖК на ПОЛ, причем если в микросомах была

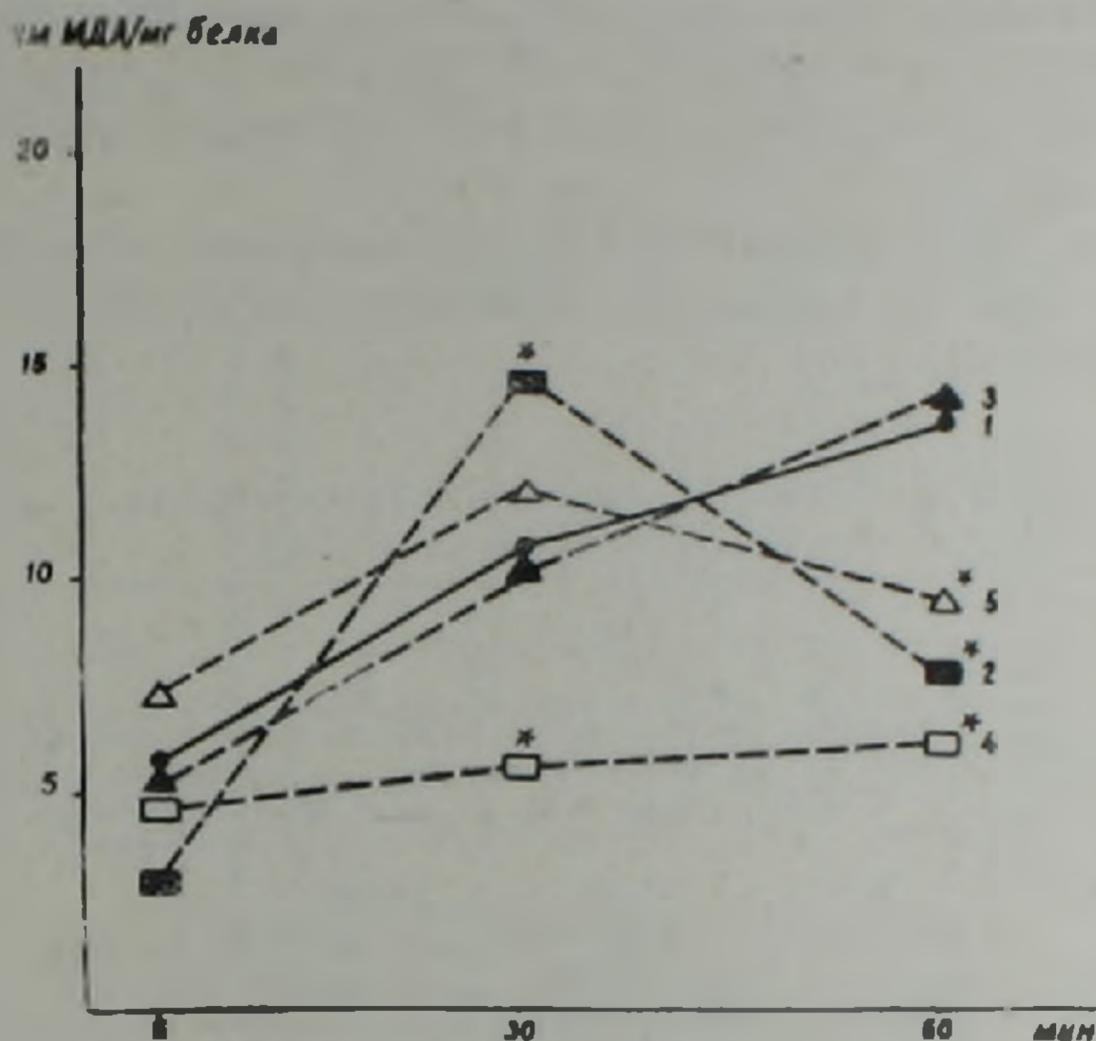


Рис. 2. Влияние НЖК на ПОЛ в митохондриях печени крыс при одновременном инкубировании жирных кислот и индукторов перекисления. Обозначения те же

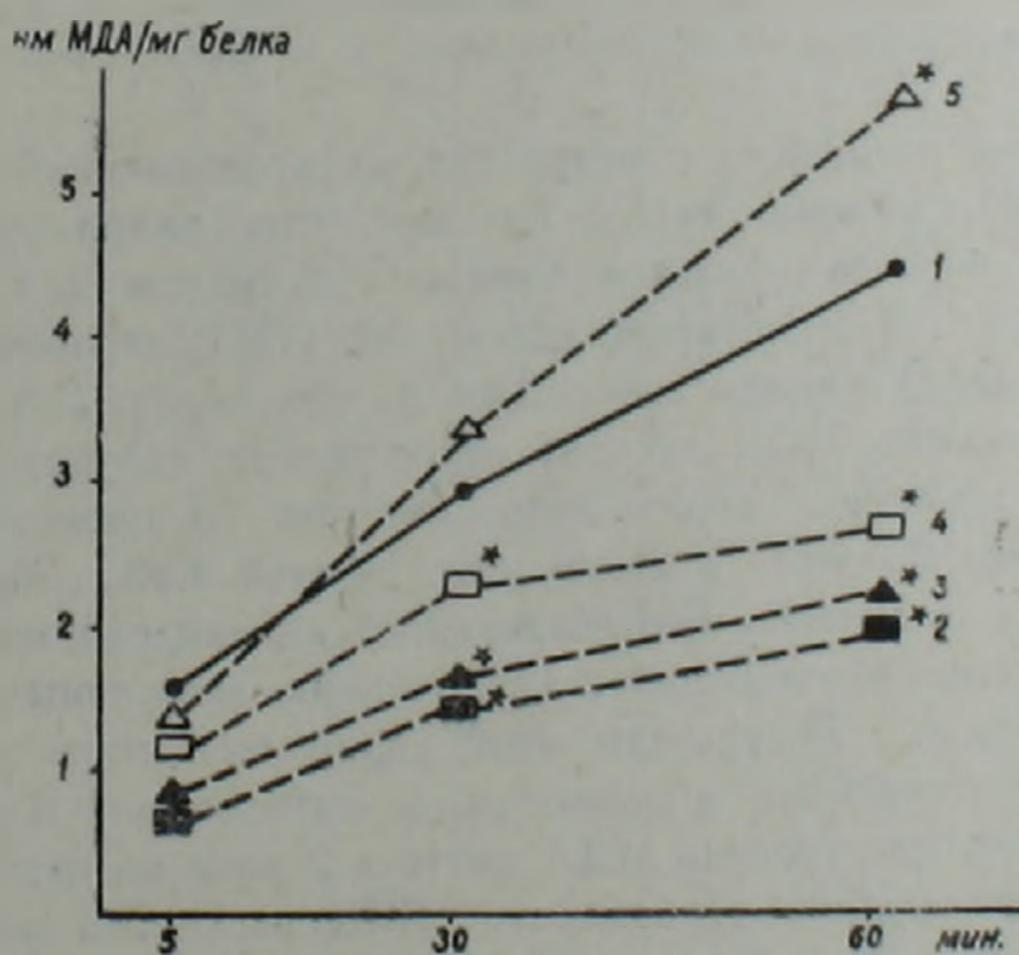


Рис. 3. Влияние НЖК на ПОЛ в микросомах печени крыс при одновременном инкубировании жирных кислот и индукторов перекисления. Обозначения те же

более активна линолевая кислота, то в митохондриях—арахидоновая. Возможно, это связано с различными скоростями утилизации этих кислот в разных органеллах клетки.

Во второй серии исследований НЖК предварительно были инкубированы в течение 15 мин совместно с митохондриями или микросомами; затем в среду добавляли инициаторы ПОЛ и после 30-минутной инкубации определяли уровень МДА. Результаты этих исследований (табл. 1) также указывают на ингибирующее действие НЖК на ПОЛ, причем эффект также дозозависимый, но здесь наблюдается практически полный параллелизм в действии обеих кислот и в микросомах, и в митохондриях.

Обе эти серии экспериментов недвусмысленно обозначили факт подавления скорости перекисного окисления свободными, неэстерифицированными НЖК.

Таблица 1

Уровень МДА (в нм/мг белка) при предварительной инкубации в течение 15 мин митохондрий и микросом с НЖК

0	1	2	3	4	5	6
	Без преинкубации	Преинкубация в теч. 15 мин	Преинкубация + л. к. 10^{-4} М	Преинкубация + л. к. 10^{-4} М	Преинкубация + а. к. 10^{-6} М	Преинкубация + а. к. 10^{-4} М
Митохондрии	45.2	38.8 $p_1 < 0.05$	35.95 $p_1 < 0.055$ $p_2 > 0.5$	26.65 $p_1 < 0.005$ $p_2 < 0.005$	36.8 $p_1 < 0.05$ $p_2 > 0.5$	29.75 $p_1 < 0.05$ $p_2 < 0.05$
Микросомы	4.6	3.55 $p_1 < 0.1$	3.53 $p_1 < 0.5$ $p_2 > 0.5$	3.25 $p_1 < 0.05$ $p_2 > 0.5$	3.75 $p_1 < 0.1$ $p_2 < 0.05$	3.8 $p_1 < 0.05$ $p_2 > 0.1$

Примечание: p_1 —достоверность по отношению к графе 1; p_2 —достоверность по отношению к графе 2; л. к.—линолевая кислота; а. к.—арахидоновая кислота.

Эти данные совпадают с результатами исследований Ньюхауза и Локеша (10, 11), которые также считают, что, например, свободная арахидоновая кислота является плохим субстратом для переокисления. Возможно, что это связано с тем, что НЖК связываются с альбумином и предохраняются тем самым от окисления. Для того, чтобы выяснить, насколько ПОЛ зависит от состояния структурированности НЖК, была проведена серия экспериментов с преинкубированием НЖК в течение 60 мин в среде, содержащей КоА, Mg^{2+} и АТФ (табл. 2), т. е. в системе, способствующей активированию ацилтрансферазной реакции, приводящей к встраиванию экзогенных НЖК в состав фосфолипидов. Результаты этой серии оказались весьма интересными. Уже инкубация и микросом, и митохондрий в вышеуказанной среде увеличила уровень МДА почти в 2 раза по сравнению с инкубацией в трис-буфере. Добавление НЖК несколько потенцировало этот эффект, причем меньшие дозы делали это эффективнее. Здесь также более отчетливым было действие линолевой кислоты.

Таким образом, получены предварительные данные, указывающие на большую подверженность переокислению НЖК, находящихся в

Таблица 2

Уровень МДА (в нм/мг белка) при предварительной инкубации в течение 1ч митохондрий и микросом с НЖК в среде, способствующей встраиванию НЖК в фосфолипиды

0	1	2	3	4	5	6	7	8
	Среда 1	Среда 2	Среда 1 + л. к. 10^{-4} М	Среда 1 + а. к. 10^{-4} М	Среда 2 + л. к. 10^{-6} М	Среда 2 + л. к. 10^{-4} М	Среда 2 + а. к. 10^{-4} М	Среда 2 + а. к. 10^{-4} М
Митохондрии	6.95	13.19 $p_1 < 0.001$	5.52 $p_1 > 0.5$	4.52 $p_1 > 0.5$	14.43 $p_1 < 0.001$ $0.5 > p_2 > 0.5$	8.57 $p_1 < 0.05$ $p_2 < 0.005$	13.77 $p_1 < 0.001$ $p_2 > 0.5$	11.79 $p_1 < 0.05$ $p_2 > 0.5$
Микросомы	8.13	12.1 $p_1 < 0.005$	9.63 $p_1 > 0.1$	10.83 $p_1 < 0.01$	13.68 $p_1 < 0.005$ $0.1 < p_2 < 0.5$	11.05 $p_1 < 0.05$ $p_2 > 0.5$	12.87 $p_1 < 0.05$ $p_2 > 0.5$	10.69 $p_1 < 0.1$ $p_2 > 0.5$

Примечание: p_1 —достоверность по отношению к графе 1; p_2 —достоверность по отношению к графе 2; среда 1—трис-НСI буфер; среда 2—содержит КоА, Mg^{+2} и АТФ

составе фосфолипидов мембран, по сравнению с их свободными аналогами. В литературе известны работы, подтверждающие эти результаты. Так, показано, что в саркоплазматическом ретикулуме КоА-производное пальмитиновой и олеиновой кислот резко усиливают ПОЛ, в то время как свободные НЖК оказывали ингибирующий эффект. По мнению этих авторов, эффект КоА-производных обусловлен их детергентноподобным действием и связыванием их с мембранами, в результате изменяются физико-химические свойства последних, что делает их более подверженными перекиссации (12).

Кроме этого объяснения, однако, вполне возможно, что само образование более ненасыщенных фосфолипидов может ускорить ПОЛ, так как согласно (13) «разжижение» структуры мембран этими фосфолипидами является фактором, способствующим переокислению. Не исключена также пространственная разобщенность свободных НЖК и индукторов ПОЛ, которые, инициируя переокисление в гидрофобной зоне мембраны, образуют гидроперекисные радикалы, не способные диффундировать в цитоплазму, и процесс окисления продолжается лишь в структурированных фосфолипидах мембран.

Ереванский медицинский институт
МЗ Армянской ССР

Ա. Լ. ՇԱԶՅԱՆ, Ս. Լ. ՄԿՐՏՉՅԱՆ, Հայկական ՍՍՀ ԳԱ քղրակից անդամ
Վ. Կ. ՄԻԹԱՐՅԱՆ

Չճագեցած ճարպաթթուներ և գերօքսիդացման պրոցեսը առնետների լյարդում

Յուլց է տրված լինուլաթթվի և արախիդոնաթթվի արգելակիչ ազդեցութեանը, կախված նրանց քանակից միկրոսոմներում, միտոքոնդրիումներում, ինչպես նաև լյարդի հոմոգենատում լիպիդային գերօքսիդացման պրոցեսի վրա:

Նրանց միածամանակյա ինկուբացիան գերօքսիդացման պրոցես խթանիչների հետ, ինչպես նաև ճարպաթթուների ու ենթաբջջային ֆրակցիայի նախինկուբացիան 15-րոպեի ընթացքում HSCoA , Mg^{+2} և ATP առկայության պայմանում նպաստում է գերօքսիդացմանը:

Քննարկվում է ազատ և կախված ճարպաթթուների դերը լիպիդային գերօքսիդացման պրոցեսում:

ЛИТЕРАТУРА—ԳՐԱԿԱՆՈՒԹՅՈՒՆ

- 1 С. Л. Мкртчян, К. А. Алексанян, Э. А. Ариратян, В. Г. Мхитарян, Журн. эксперим. и клинич. медицины, т. 27, № 1, с. 17—21 (1987) 2 А. Л. Шалджян, С. Л. Мкртчян, Тезисы докл. IV Респ. мол. конф. по физико-химической биологии, Севан, 15—18 января, 1987 3 В. Г. Мхитарян, М. А. Никогосян, Изв. АН АрмССР. Сер. хим. науки, т. 19, № 3, с. 214—219 (1966) 4 K. Hong Tan, D. V. Meyer, J. Bellin e. a. Biochem. J. v. 220, p. 243—252 (1984). 5 A. Sevanian, S. F. Muakkasah-Kaly, S. Montestaque, Arch. Biochem. Biophys, v. 223, № 2, p. 441—452 (1983). 6 W. C. Schnelder e. a., Biol. Chem., v. 176, p. 259 (1948). 7 И. А. Карузина, А. И. Арчаков, в кн.: Современные методы в биохимии, М., 1977. 8 И. Д. Стальная, Г. Г. Гаришвили, в кн.: Современные методы в биохимии, М., 1977. 9 Е. В. Гублер, Вычислительные методы анализа и распознавания патологических процессов, Л., 1978. 10 W. G. Niehaus, B. Samuelsson, Eur. J. Biochem., v. 6, p. 126—130 (1968). 11 B. R. Lokesh, S. N. Nathur, A. A. Spector, Fed. Proc. v. 39, 1727A. (1980). 12 J. Tong Mak, J. H. Krammer, W. B. Weglicki, I. Biol. Chem., v. 261, № 3, p. 1153—1157 (1983). 13 Е. В. Бурлакова, Н. Г. Храпова, Успехи химии, т. 14, № 9, с. 1540 (1985).