

Ю.О. Атаман

Інтенсивність перекисного окиснення ліпідів та антиоксидантна ферментна активність у стінці артерій і вен у динаміці інтоксикації моноіодацетатом

В работе изучены интенсивность перекисного окисления липидов (ПОЛ) и активность антиоксидантных ферментов (глутатионпероксидазы, супероксиддисмутазы и каталазы) в артериальной и венозной стенке кроликов при введении моноіодацетата (10 мг/кг) в течение 3, 7 и 14 сут. Обнаружено увеличение количества промежуточных и конечных продуктов ПОЛ, а также уменьшение активности антиоксидантных ферментов в сосудах всех типов. В венозных сосудах изменения изученных показателей были более выраженными, чем в артериях. Предполагается, что обнаруженная активация ПОЛ обусловлена первичным угнетением антиоксидантных систем, которое возникает как следствие расстройств энергетического обмена сосудистой стенки под влиянием моноіодацетата.

ВСТУП

Порушення енергопостачання судинної стінки є одним з патогенетичних чинників розвитку дистрофічно-склеротичних уражень кровоносних судин, відомих як артеріосклероз Менкеберга [3]. Експериментальні докази цього одержано дослідженнями, в яких застосовували метаболічні отрути, що пригнічують активність ферментів енергетичного обміну судинної стінки [2]. Серед агентів, що інгібують енергопостачання кровоносних судин і водночас спричиняють розвиток дистрофічно-склеротичних змін у судинній стінці чільне місце посідає моноіодоцтова кислота (моноіодацетат). Вона є класичним інгібітором гліколізу через гліцеральдегід-3-фосфатдегідрогеназу – фермент, який здійснює центральну гліколітичну оксидоредукцію [14]. Крім того, під впливом моноіодацетату пригнічується окиснення цілої низки субстратів (ізоцитрату, α -кетоглютарату,

сукцинату, малату) у циклі Кребса, а також активність деяких ферментів пентозного циклу [12]. Незважаючи на доведений факт ангіосклеротичної дії моноіодацетату і нині нез'ясованими залишаються конкретні механізми ушкодження структур судинної стінки, загибелі її клітин і розвитку пов'язаних між собою трьох основних компонентів артеріосклерозу Менкеберга – медіанекрозу, медіакальцинозу та медіасклерозу. Цілком можливо, що серед цих механізмів важливе місце посідають процеси перекисного окиснення ліпідів (ПОЛ), які беруть участь у розвитку різних видів ушкодження клітин, а, отже, є універсальними механізмами альтерації [1, 4].

Метою нашого дослідження було визначення інтенсивності ПОЛ і активності антиоксидантних систем тканин артерій і вен за умов первинних розладів енергетичного обміну, що виникають під впливом моноіодацетату.

© Ю.О. Атаман

МЕТОДИКА

Досліди виконано на 24 кролях віком 8 міс, масою 2,0–2,5 кг, яких було поділено на 4 групи (по 6 тварин у кожній): контрольну та три дослідні. Тваринам дослідних груп щодобово внутрішньовенно (у крайову вену вуха) вводили моноіодацетат з розрахунку 10 мг/кг протягом 3, 7 і 14 діб. Відповідну кількість речовини розчиняли у фізіологічному розчині (10 мг/мл), рН доводили до 7,4 насиченим розчином NaHCO_3 або 0,1 N розчином NaOH .

Через 24 год після останнього введення моноіодацетату тварин забивали відтворенням повітряної емболії. У нефракціонованих гомогенатах грудної та черевної аорти, легеневої артерії та задньої порожнистої вени визначали вміст продуктів ПОЛ (гідроперекисів ліпідів, шиффових основ) і антиоксидантну ферментну активність (глутатіонпероксидазу, супероксиддисмутазу, каталазу). Ліпіди з гомогенатів кровоносних судин виділяли та визначали за методом Folch і співавт. [17]. Екстракцію ліпідів з гомогенатів тканин проводили хлороформ-метаноловою сумішшю (2:1, 10 хв, 4°C). Вміст гідроперекисів ліпідів визначали за ультрафіолетовим спектром поглинання у наномолях на 1 мг ліпідів [6, 19], вміст шиффових основ – за спектрами флуоресценції у відносних одиницях на 1 мг ліпідів [5, 9]. Активність глутатіонпероксидази (у мікромолях відновленого глутатіону за 1 хв на 1 мг білка) досліджували за кількістю відновленого глутатіону в реакції з перекисом водню з використанням дитіонітробензойної кислоти [11], супероксиддисмутазу активність (в умовних одиницях на 1 мг білка) – методом відновлення *p*-нітротетразолію хлориду [15], каталазу активність (в умовних одиницях на 1 мг білка) – використовуючи реакцію молібдату амонію з перекисом водню [10]. Вміст білка в гомогенатах визначали за методом Lowry [18].

Увесь цифровий матеріал опрацьовано методами статистики з використанням критерію *t* Стьюдента та непараметричних статистичних методів (критерію Вілкоксона–Манна–Уїтні) [8, 16].

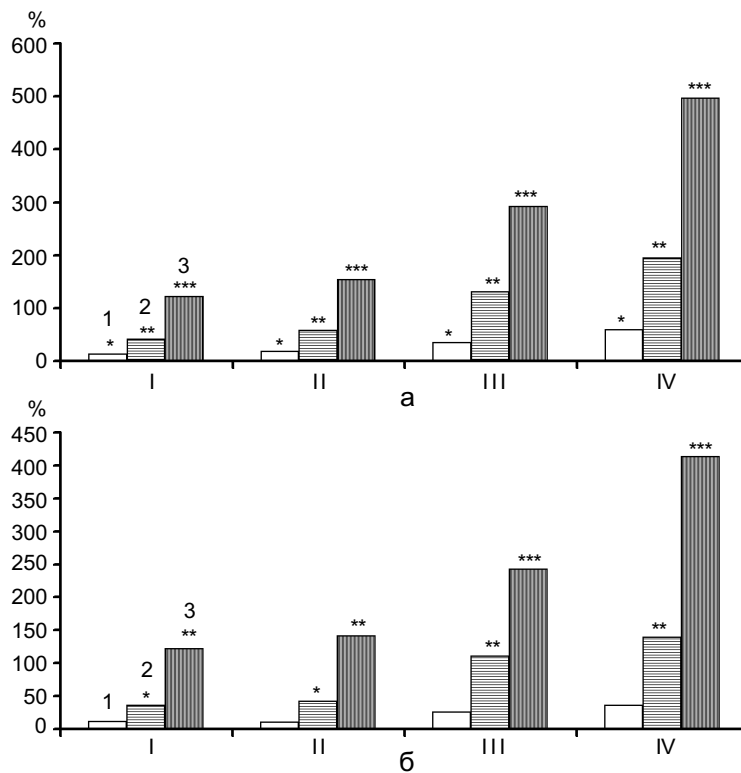
РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

Введення тваринам моноіодацетату призводило до збільшення вмісту проміжних (гідроперекиси ліпідів) і кінцевих (шиффові основи) продуктів ПОЛ у стінках усіх досліджуваних судин (рис. 1). Так, уже через 3 доби від початку експерименту можна спостерігати істотне підвищення вмісту гідроперекисів ліпідів як у тканинах артеріальних, так і венозних судин. Через 7 діб крім виявлених змін статистично достовірно збільшується вміст шиффових основ. Через 14 діб ці показники сягають максимуму, перевищуючи контрольні значення у грудній та черевній аортах у 2,2 і 2,5 раза, у легеневій артерії – у 3,4 і 4 рази, у задній порожнистій вені – у 5,1 і 6 разів.

Оскільки в основі ініціювання та активації процесів ПОЛ можуть лежати два механізми – посилена генерація первинних вільних радикалів і первинні порушення діяльності систем антиоксидантного захисту – важливо було з'ясувати стан антиоксидантних ферментних систем у тканинах досліджуваних судин. Результати експерименту показали, що введення тваринам моноіодацетату призводить до зменшення активності всіх вивчених антиоксидантних ферментів (рис. 2). Проте тут виявляє себе певна закономірність, яка полягає в тому, що “найчутливішим” до моноіодацетатної інтоксикації ферментом є глутатіонпероксидаза, активність котра знижується вже через 3 доби від початку експерименту. Через 7 діб починає зменшуватися супероксиддисмутаза (у всіх судинах) і каталаза (тільки у венах) активність, а через 14 діб – активність каталази в усіх досліджуваних артеріях.

Отже, інтоксикація моноіодацетатом супроводжується певною динамікою показників ПОЛ і систем антиоксидантного захисту, суть яких полягає у значному збільшенні інтенсивності пероксидації ліпідів, з одного боку, і у пригніченні активності антиоксидантних ферментів у тканинах артеріальних і венозних судин – з іншого. З огляду на це постає питання, як пов'язані між собою виявлені нами зміни; що є первинним – активація ПОЛ з наступним пригніченням антиоксидантних ферментних систем чи, навпаки, порушення діяльності антиоксидантів з наступною активацією ПОЛ. Відповідь на це питання, мабуть, слід шукати в площині порівняння одержаних нами результатів з даними, що їх здобуто при експериментальному відтворенні уражень кровоносних судин з використанням інших ушкоджувальних агентів. Так, було показано, що при моделюванні D-гіпервітамінозних [7] і адреналінових [13] уражень судин, так само як і в наших експериментах, відбувається збільшення вмісту проміжних і кінцевих продуктів ПОЛ у тканинах артеріальних судин (у венах – тільки при гіпервітамінозі D). Що стосується антиоксидантних ферментів, то їхня активність у грудній і черевній аортах знижується, щоправда з затримкою у часі, якщо порівнювати з накопиченням продуктів ПОЛ; у легеневій артерії активність глутатіонпероксидази, супероксиддисмутази та каталази взагалі не змінюється, а в задній порожнистій вені, навпаки, збільшується. Останнє відбувається на тлі або незмінної кількості продуктів ПОЛ

у венозній стінці (введення високих доз адреналіну), або значно меншого, ніж в артеріях їх збільшення (D-гіпервітаміноз). Наведені результати свідчать про те, що у разі D-гіпервітамінозних і адреналінових уражень активація ПОЛ з великою вірогідністю пов'язана з посиленням утворенням вільних радикалів під впливом ергокальциферолу та катехоламінів, натомість реакції з боку антиоксидантних ферментів носять вторинний характер. У чутливих до склеротичних уражень судинах (грудна і черевна аорти) врешті-решт ці системи виходять з ладу, що посилює процеси руйнування клітин, а у стійких судинах (венах) відбувається компенсаторне посилення антиоксидантного захисту, що запобігає накопи-



1. Зміни вмісту (у відсотках відносно контролю) гідроперекисів ліпідів (а) і шиффових основ (б) у тканинах артерій і вен кролів за умов інтоксикації моноіодацетатом тривалістю 3 (1), 7 (2) і 14 (3) діб: I – грудна аорта, II – черевна аорта, III – легенева артерія, IV – задня порожниста вена.

Тут і на рис. 2 статистична достовірність розбіжностей показників при порівнянні з контролем (за критерієм t Стьюдента): * $P < 0,05$; ** $P < 0,01$; *** $P < 0,001$

ченню продуктів ПОЛ у їхніх стінках.

За умов моноіодацетатної інтоксикації виявлені нами зміни дещо відрізняються від описаної вище картини. Так, зменшення антиоксидантної ферментної активності настає не з запізненням у часі, а паралельно зі збільшенням вмісту продуктів ПОЛ у тканинах судин. Крім того, найбільш істотні зміни всіх вивчених показників виявлено у

венах – судинах з найвищим рівнем енергетичного обміну і найбільшою резистентністю до розвитку дистрофічно-склеротичних уражень. Це наводить на думку про те, що в разі інтоксикації моноіодацетатом однією з патогенетичних ланок розвитку уражень судин є пригнічення систем антиоксидантного захисту з наступною вторинною активацією процесів вільнорадикального окиснення. Саме цими пусковими механізмами активації ПОЛ і відрізняється “моноіодацетатне” ушкодження судин від адреналінових і D-гіпервітамінозних уражень.

Враховуючи важливу роль енергопостачання в діяльності систем, що забезпечують адаптацію клітин до впливу звичайних факторів і захисно-компенсаторні реакції у разі дії патогенних чинників, можна припустити, що розлади енергетичного обміну в судинній стінці, у тому числі й зумовлені моноіодацетатом, мають одним з наслідків порушення енергозалежних процесів регенерації антиоксидантів і синтезу антиоксидантних ферментів. Зменшення активності та потужності антиоксидантних систем закономірно спричиняє посилення ПОЛ. А далі, незалежно від ініціаторів цього процесу, механізми ушкодження набувають універсального характеру і призводять до загибелі клітин і розвитку пов'язаних з цим вторинних явищ.

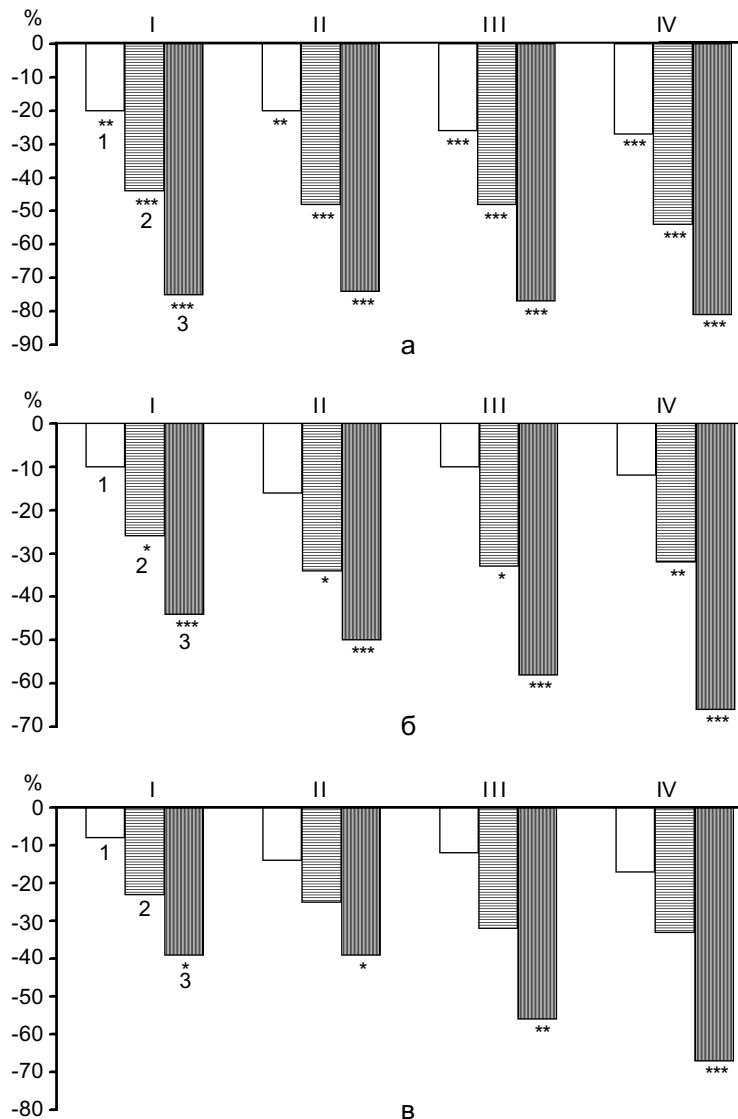


Рис.2. Зміни глутатіонпероксидазної (а), супероксиддисмутазної (б) і каталазної (в) активності тканин артерій і вен кролів за умов інтоксикації моноіодацетатом тривалістю 3 (1), 7 (2) і 14 (3) діб: I – грудна аорта, II – черевна аорта, III – легенева артерія, IV – задня порожниста вена

ВИСНОВКИ

1. За умов інтоксикації моноіодацетатом відбувається накопичення продуктів ПОЛ і зменшення антиоксидантної ферментної активності в тканинах артеріальних і венозних судин.

2. У венозних судинах, для яких характерні високі рівні енергетичного обміну і резистентності до різних видів ушкодження, зміни всіх вивчених показників були більшими, ніж у артеріях – судинах з низьким рівнем енергопостачання та низькою стійкістю до розвитку дистрофічно-склеротичних уражень.

3. Виявлена активація ПОЛ, мабуть, пов'язана з первинним пригніченням антиоксидантних систем, зумовленим порушеннями енергетичного обміну в судинній стінці, що виникають під впливом моноіодацетату.

Y.O. Ataman

INTENSITY OF LIPID PEROXYDATION AND ANTIOXIDANT ENZYME ACTIVITY IN WALLS OF ARTERIES AND VEINS AT MONOIODACETATE INTOXICATION

The intensity of the lipid peroxidation (LPO) and the antioxidant enzyme activity (glutathione peroxidase, superoxide dismutase and catalase) after monoiodoacetate injection (10 mg/kg) within 3, 7 and 14 days was examined in the arterial and venous walls of rabbits. The increase in the amount of the intermediate and final LPO products, and also the reduction in the antioxidant enzymes activity has been found in the vessels of all types. The changes in the studied parameters were more expressed in the venous vessels, than in the arteries. It is supposed that the activation of LPO is caused by the primary depression of antioxidant systems which arises as the consequence of the disorders of energy exchange in the vascular wall under the influence of monoiodoacetate.

Kharkiv State Medical University, Ukraine

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. Барабой В.А. Перекисное окисление и радиация. – К.: Наук. думка, 1991. – 270 с.
2. Быць Ю.В. Роль нарушений метаболизма сосудистой стенки в процессе ее склерозирования: Автореф. дис. ... д-ра мед. наук. – К., 1973. – 44 с.
3. Быць Ю.В., Пишак В.П., Атаман А.В. Сравнительно-патологические аспекты энергообеспечения

- сосудистой стенки. – К.-Черновцы: Прут, 1999. – 330 с.
4. Владимиров Ю.А., Арчаков А.И. Перекисное окисление липидов в биологических мембранах. – М.: Наука, 1972. – 252 с.
5. Воскресенский О.Н., Левицкий А.П. Перекиси липидов в живом организме // Вопр. мед. химии. – 1970. – **16**, №6. – С. 563–583.
6. Гаврилов В.Б., Мишкорудная М.И. Спектрофотометрическое определение содержания гидроперекисей липидов в плазме крови // Лаб. дело. – 1983. – №3. – С. 33–36.
7. Гарбузова В.Ю. Интенсивность процессов перекисного окиснения липидов та антиоксидантна активність артеріальної і венозної стінки в динаміці розвитку гіпервітамінозу D // Фізіол. журн. – 2002. – **48**, №1. – С. 87–90.
8. Гублер Е.В., Генкин А.А. Применение непараметрических критериев статистики в медико-биологических исследованиях. – Л.: Медицина, 1973. – 141 с.
9. Колесов О.Е., Маркин А.А., Федорова Т.Н. Перекисное окисление липидов и методы определения продуктов липопероксидации в биологических средах // Лаб. дело. – 1984. – №9. – С. 540–546.
10. Королюк М.А., Иванова Л.И., Майорова И.Г., Токарев Е.В. Метод определения активности каталазы // Там же. – 1988. – №6. – С. 16–18.
11. Кругликова Г.А., Штутман Ц.М. Глутатионпероксидазная и глутатионредуктазная активность печени крыс после введения селенита натрия // Укр. биохим. журн. – 1975. – **48**, №2. – С. 223–228.
12. Лабори А. Регуляция обменных процессов. – М.: Медицина, 1970. – 438 с.
13. Наумко Р.Ф. Динаміка активності антиоксидантних ферментів і вмісту продуктів перекисного окиснення ліпідів у стінці кровоносних судин тварин за умов гіперадrenalінемії // Фізіол. журн. – 2004. – **50**, №3. – С. 30–38.
14. Нейфах С.А., Казакова Т.Е., Мельникова М.П. Регуляция скорости гликолиза в клетке и структура митохондрий. – В кн.: Углеводы и углеводный обмен. – М.: Наука, 1962. – С. 106–117.
15. Суплотов С.Н., Буркова Э.Н. Суточные и сезонные ритмы перекисей липидов и активности супероксиддисмутазы в эритроцитах у жителей средних широт и крайнего севера // Лаб. дело. – 1986. – №8. – С. 459–462.
16. Урбах В.Ю. Статистический анализ в биологических и медицинских исследованиях. – М.: Медицина, 1975. – 295 с.
17. Folch J., Lees M., Stanley G.H.S. A simple method for the isolation and purification of total lipids from animal tissues // J. Biol. Chem. – 1957. – **226**. – P. 497–509.
18. Lowry O.H., Rosebrough N.J., Farr A.L., Randall R.J. Protein measurement with the folin phenol reagent // Ibid. – 1951. – **93**. – P. 265–275.
19. Pinto В.Е., Bartley W. Effect of age and sex on glutathione reductase and glutathione peroxidase activities and on aerobic glutathione oxidation in rat liver homogenate // Biochem. J. – 1969. – **112**, №1. – P. 109–115.

Матеріал надійшов до редакції 03.01.2007