

В. Г. МХИТАРЯН, Н. А. ЕСАЯН

ВЛИЯНИЕ 2-ХЛОРБУТАДИЕНА 1.3 (ХЛОРОПРЕНА) НА КСАНТИНОКСИДАЗНУЮ АКТИВНОСТЬ ПЕЧЕНИ БЕЛЫХ КРЫС

IV сообщение

Исследованиями В. Г. Мхитаряна [1, 2, 3] было установлено, что под действием хлоропрена в организме человека и животных происходят заметные изменения в обмене веществ. Это обстоятельство побудило нас в дальнейших исследованиях изучить изменения в активности ряда ферментов. Нами было установлено, что хроническая интоксикация хлоропреном приводит к неодинаковому торможению ряда ферментных систем. Так, если активность некоторых тиоловых ферментов под действием хлоропрена понижалась во всех случаях, то этой закономерности не было отмечено в отношении ферментов, активность которых не обусловлена сульфгидрильными группами.

Из многочисленных сульфгидрильных ферментов нами была изучена лишь сукциндегидразная холинэстеразная* и аденозинтрифосфатазная активность. Значительно чувствительными к хлоропрену оказались сукциндегидраза и аденозинтрифосфатаза, торможение активности которых достигало до 55—60% и менее чувствительной—холинэстераза, активность которой снижалась на 26%. Наряду с этим было установлено также, что активность одного и того же фермента подавляется в различных органах неодинаково. Более заметное снижение их активности мы наблюдали в мозгу и печени. Из ферментов, не относящихся к тиоловым, нами была изучена каталазная активность крови и печени, а также активность угольной ангидразы больших полушарий, слизистой оболочки желудка и крови белых крыс. Полученные данные по активности этих ферментов дали нам некоторое основание полагать, что они менее чувствительны к воздействию хлоропрена, чем тиоловые ферменты. В условиях нашего эксперимента выяснилось, что активность угольной ангидразы в вышеуказанных тканях понижалась на 30—35%, между тем как каталазная активность крови и печени не подвергалась заметным изменениям.

В развитии этих исследований мы сочли необходимым изучить действие хлоропрена и на другие ферментные системы. В настоящей

* Хотя и в последнее время оспаривается ее принадлежность к группе тиоферментов Munter L. A. a. Wittaker V. P. [4] и др. [14].

работе приводятся данные, касающиеся действия хлоропрена на один из тиоловых ферментов—ксантиноксидазную активность.

Ксантиноксидаза, приоритет открытия которой принадлежит Горбачевскому, обнаружена в различных тканях и обладает способностью окислять в мочевую кислоту ксантин, гипоксантин, а также аминопурины. Она присутствует в молоке и печени большинства животных, откуда и можно ее получить различными методами в весьма чистом виде. Ксантиноксидаза является сложным белком и в качестве простетической группы содержит флавин-адениндинуклеотид. Кроме этого ксантиноксидаза имеет еще другую хромофорную, железосодержащую группировку.

Согласно Уэстерфелду и сотрудникам [9, 10] препараты ксантиноксидазы содержат 0,03% молибдена, представляющего собой возможно „вторую активную группировку“ ксантиноксидазы. Роль молибдена в качестве функционально важного компонента ксантиноксидазы была показана и другими авторами.

В 1953 г. Резно и сотрудники показали, что коферментом ксантиноксидазы является металл молибден. По полученным данным в 1954 году молибден входит в состав реактивного центра ксантиноксидазы.

Наконец, по данным Баррона [15], активность ксантиноксидазы обусловлена также сульфгидрильными группами, окисление которых приводит к падению ксантиноксидазной активности.

Оптимальная активность ее лежит в пределах рН от 5,5 до 9,0, а по другим данным—между рН 8,5 и 9,0. Ксантиноксидаза довольно чувствительна к кислороду и в срезах и гомогенатах ткани быстро инактивируется. Весьма мощным ингибитором ксантиноксидазы являются цианиды [20], окисленная форма п-аминофенола [21], пирогаллол [22], хиноидные соединения, гидроксилламин [23] и др.

Калькар и другие [13] обнаружили, что производные птерина-2-амино-4-окси-6-формилптерин практически нацело угнетают ксантиноксидазу при концентрации равной 10^{-4} М.

По данным ряда авторов [11, 12], аскорбиновая кислота также оказывает ингибирующее действие на ксантиноксидазу. Ионы меди инактивируют ксантиноксидазу в очень низких концентрациях. Большой интерес представляет то обстоятельство, что специфические ингибиторы ксантиноксидазы оказывают также сильное угнетающее действие на эндогенное потребление кислорода гомогенатами печени. В связи с этим встает вопрос о роли ксантиноксидазы в эндогенном дыхании изолированных тканевых препаратов.

Как известно, ксантиноксидазная активность печени резко меняется при отсутствии или недостатке белка в пище, а также при голодании и нарушении нормального питания. В этих случаях ее активность может снижаться почти до нуля.

Сравнительно недавно Бергель и Брей [5] установили, что солилаты стабилизируют ксантиноксидазную активность.

Весьма любопытные данные были получены также Виллела и Митидьери [6] в отношении ксантинооксидазы печени крыс при отравлении их четыреххлористым углеродом. Они установили, что у крыс, получавших подкожно четыреххлористый углерод, ксантинооксидазная активность не только не угнетается, а, наоборот, значительно возрастает. Это обстоятельство может иметь важное значение для интерпретации наших данных о механизме действия 2-хлорбутадиена 1.3 на ксантинооксидазную активность.

Ксантинооксидазную активность можно определять различными методами. Мы сочли более удобным манометрический метод и пользовались методикой Аскельрода и Эльвейем [7] в модификации Ричерта, Эдварда и Уэстерфелда [8].

Постановка опыта и методика исследований. Подопытными животными служили белые крысы одного пола—самцы весом от 135 г до 220 г.

Все подопытные крысы, в том числе и контрольная группа, находились на обычной смешанной диете.

Затравка животных хлоропреном производилась в камере, статическим ингаляционным методом при расчетной концентрации хлоропрена 8 мг/л с экспозицией 2 часа в течение 190 дней.

Из 25 крыс, отобранных для затравки, 13 погибло в течение всего периода отравления.

Методика определения ксантинооксидазы в основном состояла в следующем.

После обезглавливания крыс печень быстро извлекалась и на аналитических весах бралась навеска—2,84 г, которая затем подвергалась гомогенизации с фосфатным буфером рН 7,4 в стеклянном гомогенизаторе типа Поттер. Гомогенат количественно переливался в маленький мерный цилиндр, объемом в 20 мл с притертой пробкой и фосфатным буфером, его объем доводился до 17 мл. После энергичного перемешивания гомогената из него брался по 1,7 мл и вносился в главное пространство сосудиков Варбурга, в боковой отросток сосудика наливалось 0,15 мл 0,05 М раствора ксантина, приготовленного на 0,05 N растворе едкого натрия. Во внутреннюю вставку сосудика наливалось 0,2 мл 20% раствора КОН.

Конечный объем реакционной смеси доводился в каждом сосудике до 2,2 мл, путем добавления в боковой отросток по 0,35 мл фосфатного буфера. Таким образом, в каждом сосудике было по 284 мг печеночной ткани. Опыты ставились одновременно в 4 сосудиках при 37° и 80 качаниях манометров в минуту.

После выравнивания температуры и давления, краны манометров плотно закрывались и в течение 40 минут, с 10-минутным интервалом (4 раза), производился отчет поглощенного кислорода. После определения эндогенного дыхания печеночной ткани, манометры с сосудиками быстро вынимались из термостата, содержимое отростка переливалось в главное пространство сосудиков, и, вновь погрузив

их в термостат, производился отчет поглощенного кислорода в течение 100 мин., с двадцатиминутным интервалом (5 раз).

Одновременно, в двух-трех сосудах в течение 100 мин. производилось определение эндогенного дыхания, для чего взамен раствора ксантина в эти сосуды добавлялось равное количество фосфатного буфера.

Для вычисления ксантиноксидазной активности вначале подсчитывалось количество поглощенного кислорода в сосудах с ксантином и выводились средние данные; точно также производился подсчет поглощенного кислорода без ксантина (эндогенное дыхание); из первого вычитывалось эндогенное дыхание, затем подсчитывалась ксантиноксидазная активность.

Ксантиноксидазная активность выражалась количеством поглощенного кислорода μ л на 1 г сухой печеночной ткани в течение одного часа.

По данным Ричерта, Эдвардса и Уэстерфелда, ксантиноксидазная активность печеночной ткани у белых крыс составляет 1500 единиц в норме.

Как видно из данных табл. 1, у контрольной группы крыс ксантиноксидазная активность печени колеблется в пределах 1131—1451

Таблица 1

Ксантиноксидазная активность печени у белых крыс в норме (контрольная группа)

| Дата опытов | Пол | Вес животного | $Q_{O_2}^{37}$ |
|-------------------|-----|---------------|----------------|
| 29. VI. 57 | ♂ | 170 | 1358 |
| 6. VI. 57 | ♂ | 180 | 1178 |
| 7. VI. 57 | ♂ | 160 | 1161 |
| 30. X. 57 | ♂ | 145 | 1131 |
| 31. X. 57 | ♂ | 155 | 1451 |
| 5. X. 57 | ♂ | 185 | 1332 |
| 30. XI. 57 | ♂ | 220 | 1375 |
| $M \pm m$ | | | 1284 ± 436 |
| пределы колебания | | | (1131—1451) |
| σ | | | $\pm 115,2$ |

Примечание: Обозначения для табл. $M \pm m$ —средняя величина и ее среднее квадратическое отклонение;

σ —среднее квадратическое отклонение отдельных определений.

ксантиноксидазной активности и в некоторых случаях ее активность доходит до 529 единиц. В наших опытах ксантиноксидазная активность у подопытных крыс колебалась в пределах 529—991 единицы и в

единиц и в среднем составляет 1284 единицы. Полученные нами данные частично расходятся с данными Уэстерфелда и его соавторов, по которым у белых крыс ксантиноксидазная активность печени равна 1500 единицам. Мы заметили также большую чувствительность ксантиноксидазной активности печени белых крыс к пище, которую они получили и, поэтому в течение работы обращали особое внимание на питание животных.

Данные, полученные у подопытных крыс, приведены в табл. 2. Как видно из этих данных, под действием хлоропрена у белых крыс, находящихся в течение 100 дней в атмосфере хлоропрена (8 мг/л) при экспозиции 2 часов, происходит заметное снижение печеночной

среднем составляла 776 единиц. Таким образом, ее активность понижается в среднем на 40%. Наряду с понижением ксантиноксидазной активности нами было установлено также заметное снижение и эндогенного дыхания. Эти данные еще раз говорят о том, что под действием хлоропрена у животных происходит нарушение окислительно-восстановительных процессов.

Обсуждение результатов.

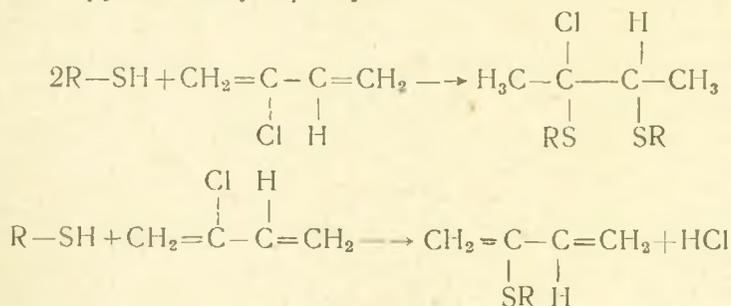
Известно, что тиоловые яды неодинаково тормозят активность сульфгидрильных ферментов. Некоторые из них оказались более чувствительными, другие—менее; так, например, по отношению β-хлорвинилди-хлорарсену наиболее чувствительными оказались аденозинтрифосфатаза мозга и АТФ-аза печени. Такая различная чувствительность к тиоловым ядам объясняется различной реакционной способностью SH групп белков этих ферментов.

Ингибирование тиоферментов может протекать по следующим реакциями: 1) путем алкилирования, 2) окислением сульфгидрильных групп в дисульфидные и 3) взаимодействием тяжелых металлов с тиолами с образованием меркаптидов. Исходя из структурной формулы и химических свойств хлоропрена можно полагать, что он оказывает свое воздействие на тиоловые ферменты или путем алкилирования по двум возможным схемам, или окислением сульфгидрильных групп в дисульфидную

Таблица 2

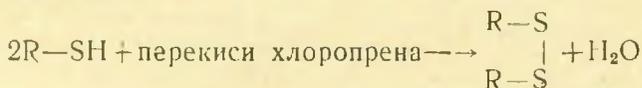
Ксантиноксидазная активность печени белых крыс, находившихся 100 дней в атмосфере 8 мг/л хлоропрена, при экспозиции 2 часов

| Дата опытов | Пол | Вес животного | Q ₀₂ ³⁷ |
|-------------------|-----|---------------|-------------------------------|
| 16. IX. 57 | ♂ | 137 | 679.2 |
| 19. XI. 57 | ♂ | 210 | 991.8 |
| 21. XI. 57 | ♂ | 200 | 745.9 |
| 23. XI. 57 | ♂ | 140 | 995.4 |
| 26. XI. 57 | ♂ | 260 | 746.0 |
| 28. XI. 57 | ♂ | 150 | 756.0 |
| 7. XII. 57 | ♂ | 165 | 771.0 |
| 10. XII. 57 | ♂ | 135 | 837.0 |
| 12. XII. 57 | ♂ | 135 | 715.0 |
| 14. XII. 57 | ♂ | 180 | 529.8 |
| M ± m | | | 776.7 ± 41.6 |
| пределы колебания | | | (529.8—991.8) |
| σ | | | ± 131.8 |



Вторая схема менее вероятная, ибо хлор в молекуле хлоропрена связан довольно прочно, хотя и не исключается возможность отщепления из него HCl в определенных условиях. Другой путь торможения—это окисление сульфгидрильных групп в дисульфидную.

Из литературы известно, что хлоропрен, будучи диеновым хлор-содержащим углеводородом, способен образовать довольно нестойкие и быстро распадающиеся перекиси. Перекиси хлоропрена, как и вообще все перекиси, могут легко окислять целый ряд соединений, в том числе и сульфгидрильные группы, превращая их в дисульфидные по следующей схеме:



В пользу этого механизма действия хлоропрена на организм пока имеется ряд косвенных доказательств.

По данным Керн, Иоскуч и Волфрам [16, 17], для получения свободного от перекисей хлоропрена необходимо производить его дистилляцию в атмосфере азота и хранить в запаянных трубках.

Нистрем [18] показал, что окисленный, то есть перекисный и неокисленный хлоропрен (дистиллированный в атмосфере чистого азота и хранившийся в запаянных ампулах) на белых крысах оказывает неодинаковую токсичность. В его опытах окисленный хлоропрен оказался в 4 раза токсичнее, чем неокисленный. За этот механизм говорят и данные наших исследований, которые показали, что под действием хлоропрена как в организме человека, так и у экспериментальных животных (белые крысы) происходит заметное снижение количества ряда легко окисляемых веществ, как, например, аскорбиновой кислоты, адреналина, глутатиона с увеличением количества их окисленных форм. В частности было установлено увеличение количества окисленной формы глутатиона и уменьшение ее восстановленной формы.

В нашей предыдущей работе [19] в опытах *in vitro* было установлено, что хлоропрен как сам по себе, так и в сочетании с ионами меди приводит к заметному нарастанию перекисей в маслах и что хлоропрен оказывает прооксидантное действие на окисление жиров. Было показано также в опытах *In vitro*, что большие концентрации хлоропрена в атмосфере оказывают окисляющее действие на рибофлавин и каротиноиды. Наконец, ампериметрическое определение сульфгидрильных групп в гомогенатах органов белых крыс, находящихся длительное время в атмосфере хлоропрена, показывают, что у подопытных крыс в печени, почках, мозгу, селезенке и в крови происходит, по сравнению с контрольной группой крыс, уменьшение количества сульфгидрильных групп.

Приведенные данные, а также ингибирование тиоловых ферментов—сукциндегидразы, аденозинтрифосфатазы, холинэстеразы, ксантиноксидазы, кислой и щелочной фосфатазы дают нам право утверждать, что хлоропрен свое токсическое действие на организм оказывает в основном через перекиси, которые и окисляют сульфгидрильные группы ферментов и их инактивируют. Все эти факты лишь косвенно подтверждают наше предположение о действии хлоропрена на орга-

низм. Насколько мы правы, покажет определение органических перекисей в тканях подопытных животных, к чему мы уже приступили.

В ы в о д ы

1. У белых крыс, находящихся в течение 100 дней в атмосфере хлоролпрена при расчетной концентрации 8/мг/л и экспозиции двух часов, происходит заметное снижение ксантиноксидазной активности печени и колеблется от 529 до 991 единицы, составляя в среднем 776 единиц.

2. Ксантиноксидазная активность печени у подопытных крыс, по сравнению с контрольной группой животных, понижается на 40%.

Кафедра биохимии

Ереванского медицинского института

Поступило 25 I 1958 г.

Վ. Գ. ՄԵԻՔԱՐՅԱՆ, Ն. Ա. ԵՍԱՅԱՆ

ՔԼՈՐՈՊՐԵՆԻ ԱԶԳԵՅՈՒԹՅՈՒՆԸ ԱՌՆԵՏՆԵՐԻ ԼՅԱՐԳԻ ՔՍԱՆՏԻՆՕՔՍԻԴԱԶԱՅԻՆ ԱԿՏԻՎՈՒԹՅԱՆ ՎՐԱ

Ա մ փ ո փ ու մ

Մեկամիջ մեկի հետազոտություններից պարզվել էր, որ թե կենդանիների և թե մարդկանց մոտ քլորոպրենի երկարատև ազդեցությունից տեղի է առնում նյութափոխանակության զգալի խանգարում: Հետազոտում ցույց է արվել, որ քլորոպրենի ազդեցության տակ իջնում է ֆերմենտների գործունեությունը, որն առավելագույն արտահայտված է լինում այն ֆերմենտների մոտ, որոնց ակտիվությունը պայմանավորված է սուլֆհիդրիլ խմբերով: Այդ խմբին պատկանող ֆերմենտներից մեր կողմից ստամոստիրված է եղել սուլցինդիկդրազայի, խոլինսթերազայի և ալենոպինտրիֆոսֆատազայի ակտիվությունը և ցույց արվել, որ սրանց ակտիվությունն իջնում է անհամաչափ և որ նույն ֆերմենտի ակտիվությունը տարբեր օրգաններում ճշնշվում է տարբեր ինտենսիվությամբ:

Տվյալ աշխատության մեջ մենք նպատակ ենք ունեցել պարզել քլորոպրենի ազդեցությունը սպիտակ առնետների լյարդի քսանտինօքսիդազայի ակտիվության վրա, որը ինչպես հայտնի է, դասվում է թիրոլային ֆերմենտների շարքը: Փորձերը իրականացվել են եղել սպիտակ առնետների վրա, որոնք 100 օր, օրական երկու ժամ պահվել են հատուկ կամերայում, որտեղ քլորոպրենի խտությունը օդում եղել է 8 մգ/լիտր:

Քսանտինօքսիդազայի ակտիվությունը որոշվել է լյարդի համոգենատներում: Կոնտրոլ առնետների լյարդում քսանտինօքսիդազային ակտիվությունը տատանվում է 1131—1451 միավորի սահմաններում և միջին հաշվով կազմում է 1284 միավոր:

Փորձի պայմաններում գտնվող առնետների մոտ քսանտինօքսիդազային ակտիվությունը անհամեմատ ցածր է, քան կոնտրոլ առնետների մոտ: Փորձի պայմաններում գտնվող առնետների քսանտինօքսիդազային ակտիվու-

թվունը տատանվում է 529—991 միավորի սահմաններում և միջին հաշվով կազմում է 776 միավոր:

Այսպես, ինչպես տեսնում ենք, քառնախնօքսիդազային ակտիվությունը քլորոպրենի ազդեցությունից ասի իջնում է 40% -ի չափով:

Մեր երկարատև հետազոտություններից ստացված ավյալների համաձայն մենք հայտնում ենք այն միտքը, որ քլորոպրենը օրգանիզմում առաջացնում է իր պերօքսիդները, որոնց միջոցով թիոլային ֆերմենտների սուլֆհիդրիլային խմբերը օքսիդանում, դառնում են զիսուլֆիդային խմբեր, որի հետևանքով և իջնում է սրանց ակտիվությունը: Թե որքանով ենք մենք ճիշտ, այդ հույս կտան մեր մտատևա փորձերը, որոնք ընթացքի մեջ են:

ЛИТЕРАТУРА

1. Մխիտարյան Վ. Գ., Известия АН АрмССР (биол. и сельхоз. науки), т. 10, 6, стр. 11, 1957.
2. Մխիտարյան Վ. Գ., Тезисы 2-го Закавказского съезда физиологов, биохимиков и фармакологов, 1956.
3. Մխիտարյան Վ. Գ., Сборник по хлороплену, 1957.
4. Munter L. A. and Wittaker V. P., Biochem. J., v. 53, стр. 167, 1953.
5. Bergel F. and Bray R. C., Nature, 4524, стр. 88, 1956.
6. Willéla Gilberto G. and Mitidieri Emilio, Nature, № 4448, 208, 1955.
7. Axelrod A. E., and Flvehjem C. A., J. Biol. Chem. 140, 725, 1941.
8. Richert D. A., Edwards S., and Westerfeld W. W., J. Biol. Chem. 181, 255, 1949.
9. Richert D. A., Westerfeld W. W., J. Biol. Chem. 203, 915, 1953.
10. Westerfeld W. W., McKibbins J. M., Roemel J. C., Hilfinger M. F., Am. J. Physiol. 157, 184, 1949.
11. Doisy Richard J. Richert Dan A., Westerfeld W. W., J. Biol. Chem. 217, 307, 1955.
12. Feigelson P., J. Biol. Chem. 197, 843, 1952.
13. Kalçar H. M., Kjeldgaard N. O., Klenow H., J. Biol. Chem. 174, 771, 1948.
14. Hargreaves Alberto B., Arch. Biochem. a. Biophys. 57, № 1, 41, 1955.
15. Barron E. S. G., Advances in Entymology v. 11, стр. 201, 1951.
16. W. Kern, H. Jockusch and A., Wolfram. Ch. Ab. v. 44, 8150, 1950.
17. W. Kern, H. Jockusch and A., Wolfram. Ch. Ab. v. 44, 2269, 1950.
18. E. E. Nystrom., Acta Medica Scandinavica supp. 219, 1948.
19. Մխիտարյան Վ. Գ., Изв. АН АрмССР (серия химич. науки) М. XI, 1958.
20. Dixon M. and Keilin D., Proc. Roy. Soc. London, Series B. 119, 159, 1936.
21. Bernheim F., and Bernheim M. L. C., Am. J. Physiol. 121, 55, 1938.
22. Gray S. J. and Felsher R. Z., Proc. Soc. Exp. Biol. and Med. 59, 287, 1945.
23. Dietrich L. S. and Borries Eleanor, J. Biol. Chem. 219, 1, 375, 1956.