

В. Г. МХИТАРЯН, С. А. АСТВАЦАТРЯН

ВЛИЯНИЕ 2-ХЛОРБУТАДИЕНА 1,3 (ХЛОРОПРЕНА) НА ФОСФАТАЗНУЮ АКТИВНОСТЬ ОРГАНОВ БЕЛЫХ КРЫС

Сообщение 5

Одним из возможных механизмов действия хлоропрена на организм является блокировка тиоловых ферментов путем окисления их сульфгидрильных групп.

С целью выяснения этого вопроса нами были проведены исследования по изучению действия хлоропрена на активность отдельных ферментативных систем. Полученные результаты показали, что длительное нахождение крыс в атмосфере хлоропрена приводит к заметному снижению активности сукциндегидразы печени, холинэстеразы мозга, аденозинтрифосфатазы печени, почек, сердечной мышцы и мозга, а также печеночной ксантиноксидазы [1, 2].

Наши исследования показали, что под действием хлоропрена различные ферментные системы изменяются не в одинаковой степени. В то время как функция одних ферментных систем значительно подавляется, функция других нарушается слабо или же совершенно не страдает. При этом большое значение имеет также локализация фермента, если в одних тканях активность определенных ферментов резко нарушается, то в других тканях их функция страдает значительно слабее.

В развитии этих исследований мы сочли необходимым изучить влияние хлоропрена и на фосфатазную систему. В настоящем сообщении приведены данные, полученные нами в отношении влияния хлоропрена на активность различных фосфатаз. Изучение сдвигов в активности этих ферментов, участвующих во многих обменных процессах, имело бы важное значение для правильной интерпретации тех сдвигов в обмене веществ, которые имеют место при хлоропреновой интоксикации.

Кислая и щелочная фосфатазы сравнительно недавно не причислялись к тиоловым ферментам. В настоящее время накоплены новые данные, подтверждающие их принадлежность к тиоловым ферментам. Согласно данным Цубой и Хадсон [3], кислая фосфатаза весьма чувствительна к следам металлов, что свидетельствует о ее сульфгидрильной природе. Кроме металлов, активность кислой фосфатазы снижается р-хлормеркурибензоатом, который является специфическим ингибитором SH групп.

Накаму [4] установил, что при инъекции мышам хлористого кадмия, а также при их отравлении ртутью во внутренних органах (печень, почка) снижается активность щелочной и кислой фосфатаз. Причем подавление активности этих ферментов проявляется в печени раньше, чем в почках. Бьонди [15] показал, что при введении кроликам ацетата свинца в лейкоцитах происходит снижение содержания щелочной фосфатазы. Имеются данные, подтверждающие необходимость свободных сульфгидрильных групп для активности фосфатаз.

Цубой и Хадсон показали, что торможение кислой фосфатазы р-хлормеркурибензоатом снимается цистеином. Сравнительно недавно М. Н. Бессонова [5] установила, что при гиповитаминозе «С» активность щелочной фосфатазы крови понижена, причем, чем сильнее выражена степень «С» гиповитаминоза, тем ниже активность щелочной фосфатазы. При насыщении организма аскорбиновой кислотой наблюдается повышение активности фосфатаз. Как кислая, так и щелочная фосфатазы в отличие от ксантиноксидазы менее чувствительны к питанию.

Недостаточность белка в питании животных не отражается в какой-либо заметной степени на активность как щелочной, так и кислой фосфатазы печени, почек и костной ткани. Согласно данным Т. Я. Балаба [6], активность кислой фосфатазы печени белых крыс, находящихся на малобелковой диете, остается в пределах нормы, а щелочной фосфатазы (субстрат натрия - глицерофосфат) даже увеличивается. Что касается почек, то недостаток белка в питании не оказывает влияния на активность кислой и щелочной фосфатаз.

Найду и Пратт [7] установили, что активность кислой и щелочной фосфатаз головного мозга белых крыс не подвергается заметным изменениям после смерти в трупах при комнатной температуре или на холоде, даже в течение 48 ч. По данным Цорполи [10], активность кислой и щелочной фосфатаз зависит от возраста и от пола животного. У мышей в возрасте от одного месяца до одного года активность щелочной и кислой фосфатаз остается без изменения. После этого периода в возрасте от одного с половиной года до двух лет активность щелочной фосфатазы резко увеличивается, а кислой фосфатазы падает. По наблюдениям того же автора, активность щелочной фосфатазы у самок выше, чем у самцов.

Фосфатазы имеют важное значение в углеводном обмене. По данным Марш и Дробкина [8, 9], у белых крыс гипергликемия приводит к повышению кислой и щелочной фосфатазы почек. Ими же установлено взаимоотношение между количеством сахара в крови и активностью печеночной, почечной и сывороточной фосфатаз. Согласно их данным, при гипергликемии активность кислой и щелочной фосфатаз почек повышается неодинаково. Так, если активность кислой фосфатазы почек повышается на 55%, то активность щелочной фосфатазы повышается на 70%. При гипогликемии отмечается понижение активности щелочной фосфатазы печени.

На основании своих данных, Марш и Драбкин делают вывод, что фосфатаза имеет важную роль при диабете.

Фосфатаза катализирует большое число важных химических реакций и связана помимо углеводного обмена также с обменом нуклеотидов и фосфолипидов. Активность фосфатазы имеет существенное значение также при ряде заболеваний. В литературе имеются данные о роли щелочной фосфатазы при рахите и в процессах обызвествления костей.

Весьма любопытные данные получены Корси [11], который установил значительное увеличение содержания щелочной фосфатазы в печени крыс при циррозе, вызванном вдыханием четыреххлористого углерода.

Е. Маковский и соавторы [12], изучая у крыс фосфатазную активность мозга при его различных функциональных состояниях, установили, что возбуждение или торможение приводит к усилению активности как кислой, так и щелочной фосфатаз.

Экспериментальная часть

Опыты ставились на белых крысах-самцах, весом от 130 до 260 г. Все подопытные крысы, в том числе и контрольные, находились на обычной смешанной диете. Затравка крыс производилась в специальной камере статическим ингаляционным методом в течение 100 дней из расчетной концентрации хлоропрена 8 мг/л с экспозицией 2 ч.

Из 25 подопытных крыс в течение всего периода отравления погибло 13.

Активность кислой и щелочной фосфатаз производилась одновременно в гомогенатах печени, почек и мозга по методу Марша и Драбкина с внесением небольших изменений.

После обезглавливания крыс немедленно извлекались печень, почки и мозг; фильтровальной бумагой удалялись следы крови; отделялась с почек капсула, а с мозга — оболочки с сосудами. Затем на аналитических весах взвешивалось 200 мг ткани почек, 400 мг ткани печени, 500 мг ткани мозга и гомогенизировалось при комнатной температуре в течение 2—3 мин. в стеклянном гомогенизаторе типа Поттер.

Гомогенат почек готовился на 0,5 м растворе поваренной соли, а печени и мозга — на дистиллированной воде. Конечные объемы гомогенатов печени и почек доводились до 10 мл, мозга — до 5 мл.

Для определения фосфатазы гомогенаты употреблялись по 1 мл. Субстратом служил забуференный раствор, натрий β-глицерофосфат в буферном растворе (Шиновар, Джонс и Рейнгарт [13]) с рН 5,0 для кислой и рН 9,8 для щелочной фосфатаз.

Субстрат готовился перед каждым опытом следующим способом.

В мерную колбу на 100 мл наливали около 80 мл дистиллированной воды, 3 мл петроленового эфира с температурой кипения 40—50° и добавляли 1 г натрий β-глицерофосфата и 0,85 г медиала. Прибавлением воды объем раствора доводился до 100 мл так, чтобы метка на колбе находилась на границе водного раствора и петролейного эфира.

Этот основной раствор хранился в холодильнике и по мере надобности из него готовился рабочий раствор. Для этого в 100 мл мерную колбу из основного раствора отмеривалось 50 мл, добавлялось 5 мл 1 N раствора уксусной кислоты, 3 мл петролеинового эфира, и объем дистиллированной водой доводился до 100 мл подобно основному раствору. Затем стеклянным электродом измерялся рН (рН равняется 5).

Таким же способом готовился рабочий раствор для щелочной фосфатазы, с той разницей, что взамен уксусной кислоты добавлялось 0,2 мл 0,1 N раствора едкого натра (рН должен быть обязательно проверен стеклянным электродом и должен быть равен 9,8).

Эти растворы также необходимо держать в холодильнике.

Для определения фосфатазной активности в широкие пробирки отмеривалось по 9 мл субстрата с рН 5,0 для кислой фосфатазы и с рН 9,8 для щелочной фосфатазы, они помещались в термостат при 37° на 15 мин., затем вынимали, добавляли по 1 мл гомогената и вновь инкубировали в течение одного часа. По истечении этого времени пробирки вынимались из термостата; в каждую пробирку добавлялось по 5 мл 10% раствора трихлоруксусной кислоты для инактивации фермента и для осаждения белков, спустя 10—15 мин. после перемешивания фильтровали.

Для определения фосфора из прозрачного безбелкового фильтрата отмеривался 1 мл, добавлялось 5 мл 0,05 N раствора едкого натра, 2 мл молибденового реактива, 2 мл рабочего раствора SnCl₂ (как восстановитель) и через 6 мин. фотометрировали в фотоэлектроколориметре с красным светофильтром при толщине слоя 0,5 см.

Для внесения при расчетах поправок параллельно с опытом определялось также первоначальное количество неорганического фосфата в исследуемых органах и в субстрате.

Таблица I

Активность кислой фосфатазы органов белых крыс, находившихся на обычной нормальной диете (контрольная группа)

Дата опытов	Пол	Вес в г	Почка	Печень	Мозг
3.IV.57	♀	260	3,22	8,0	0,5
5.IV.57		220	5,8	7,4	0,58
8.IV.57		220	5,15	6,4	0,70
29.IV.57		170	4,0	—	0,58
6.VI.57		180	6,01	6,01	0,56
7.VI.57		160	6,27	7,4	0,70
30.X.57		142	3,90	4,35	0,76
2.XI.57		148	4,03	6,5	0,46
5.XI.57		135	4,54	4,95	0,53
30.XI.57		220	3,70	3,61	0,58
M ± m				4,66 ± 0,33	6,07 ± 0,47
Пределы колебания			(3,22—6,27)	(3,61—8,0)	(0,58—0,76)
=			± 1,05	—1,4	0,095

С этой целью отмеривалось по 9 мл субстрата для кислой или щелочной фосфатаз, добавлялось по 5 мл 10% раствора трихлоруксусной кислоты, затем по 1 мл исследуемых гомогенатов и через 10—15 мин. фильтровали.

Дальнейшее определение фосфора производилось как и при опыте. Количество фосфора учитывалось по заранее приготовленной стандартной кривой, устанавливаемой по раствору KH_2PO_4 . Фосфатазная активность выражалась по количеству мг Р на 1 г влажной ткани за 1 час, при температуре 37°.

Как видно из данных табл. 1, у нормальных крыс в почках активность кислой фосфатазы колеблется от 3,22 до 6,27 единиц и в среднем составляет $4,66 \pm 0,33$. Тогда как в печени ее активность колеблется от 3,61 до 8,0 единиц и в среднем составляет $6,07 \pm 0,47$.

Наши данные частично расходятся с данными Марша и Дробкина, которые нашли у нормальных крыс в почках активность кислой фосфатазы при pH 4,9—5,1, равной $5,3 \pm 0,31$ и для печени $7,85 \pm 0,34$.

Это частичное расхождение мы склонны объяснить отсутствием возможности пользоваться крысами определенного штамма. По-видимому, этим обуславливается колебание активности фосфатазы как в печени, так и в почках в довольно широких пределах.

Что касается активности кислой фосфатазы мозга, то она, как видно из данных той же таблицы, небольшая, колеблется от 0,46 до 0,70, составляет в среднем $0,59 \pm 0,03$.

Таблица 2

Активность щелочной фосфатазы органов белых крыс, находившихся на обычной нормальной диете (контрольная группа)

Дата опытов	Пол	Вес животного в г	Печень	Мозг	
3.IV.57	♀	260	1,93	0,26	
5.IV.57		220	1,90	0,24	
8.IV.57		220	0,75	0,58	
29.IV.57		170	1,2	0,3	
6.VI.57		180	—	0,4	
7.VI.57		160	0,57	0,4	
30.X.57		142	1,13	0,3	
2.XI.57		148	1,20	0,24	
5.XI.57		135	1,2	0,3	
30.XI.57		220	1,04	0,2	
M ± m				1,21 ± 0,14	0,32 ± 0,03
Пределы колебания				(0,57—1,93) ± 0,424	(0,2—0,58) ± 0,106

В табл. 2 приведены данные об активности щелочной фосфатазы печени и головного мозга у нормальных крыс. Как видно из этих данных, активность щелочной фосфатазы в этих органах по сравнению с кислой фосфатазой значительно ниже. Согласно нашим данным, у нормальных крыс активность щелочной фосфатазы в печени колеблется в пределах 0,57—

1,93. единиц и составляет в среднем $1,21 \pm 0,14$. Эти данные в отношении щелочной фосфатазы печени почти полностью совпадают с данными Драбкина и Марша, согласно которым активность щелочной фосфатазы в печени равна в среднем $1,31 \pm 0,08$ единиц.

Активность щелочной фосфатазы головного мозга у нормальных крыс оказалась еще более низкой, чем кислой фосфатазы и колебалась от 0,2 до 0,58 единиц, составляя в среднем $0,32 \pm 0,03$ единиц. Таким образом, активность щелочной фосфатазы головного мозга у нормальных крыс оказалась, примерно, на 50% ниже по сравнению с кислой фосфатазой. Интересно, что, по данным Альбрехта [14], у взрослых мышей активность как кислой, так и щелочной фосфатазы мозга почти одинаковая.

При выполнении данной работы мы заметили, что изменение оптимума рН среды значительно сильнее отражается на активности щелочной фосфатазы, чем кислой, что совпадает с некоторыми литературными данными. Наряду с этим, мы заметили также, что для щелочной фосфатазы небольшие отклонения от оптимума рН (9,2—9,8) в сторону ее повышения приводят к неодинаковому снижению ее активности в различных органах: В одних органах ее активность падает значительно сильнее, чем в других. Особенно чувствительной оказалась щелочная фосфатаза почек. Насколько эти наблюдения достоверны, покажут ближайшие опыты, которые мы проводим.

После того как была установлена активность щелочной и кислой фосфатаз у контрольных крыс, мы приступили к определению их активности у подопытных крыс. Данные эти приведены в табл. 3 и 4. Как вид-

Таблица 3

Влияние хлоропрена на активность кислой фосфатазы органов белых крыс, находившихся 100 дней в атмосфере 8 мг/л хлоропрена при экспозиции 3 ч.

Дата опытов	Пол	Вес в г	Почка	Печень	Мозг	
16. XI. 57	опыты с хлоропреном	137	1,77	3,23	0,28	
19. XI. 57		210	2,2	4,2	0,20	
21. XI. 57		203	3,8	3,87	0,36	
23. XI. 57		139	2,48	4,43	0,28	
26. XI. 57		260	1,66	2,7	0,25	
28. XI. 57		149	1,43	3,2	0,52	
7. XII. 57		162	2,63	3,2	0,5	
10. XII. 57		135	2,7	4,5	0,28	
12. XII. 57		130	2,1	2,25	0,36	
14. XII. 57		180	3,3	3,27	0,38	
M ± m				2,35 ± 0,17	3,48 ± 0,13	0,34 ± 0,03
Пределы колебания				(1,43—3,8)	(2,25—4,5)	(0,20—0,52)
σ				± 0,054	± 0,43	± 0,098

но из данных табл. 3, активность кислой фосфатазы во всех исследуемых органах: в печени, почках и в мозгу под действием хлоропрена понижается. Причем это снижение в различных органах происходит не с одинаковой интенсивностью. Как видно из табл. 3, активность кислой

Таблица 4

Влияние хлоропрена на активность щелочной фосфатазы органов белых крыс, находившихся 100 дней в атмосфере 8 мг/л хлоропрена при экспозиции 3 ч.

Дата опытов	Пол	Вес животного в г	Печень	Мозг
16. XI. 57	♂	137	0,38	0,13
19. XI. 57		210	0,58	0,08
21. XI. 57		203	0,12	0,18
23. XI. 57		139	0,30	0,12
26. XI. 57		260	0,38	0,14
28. XI. 57		149	0,23	0,12
7. XII. 57		162	0,26	0,29
10. XII. 57		135	0,34	0,3
12. XII. 57		130	0,45	0,31
14. XII. 57		180	0,38	0,19
M ± m			0,33 ± 0,035	0,19 ± 0,025
Пределы колебания			(0,12—0,53)	(0,08—0,31)
σ			± 0,11	± 0,08

фосфатазы почек колеблется от 1,43 до 3,8 единиц и в среднем составляет $2,35 \pm 0,17$; по сравнению с контрольными крысами ее активность понижена на 50%. Подобное действие оказывает хлоропрен и на активность кислой фосфатазы печени и мозга, где ее активность в печени колебалась от 2,25 до 4,5 единиц и в среднем составляет $3,48 \pm 0,13$, а в мозгу от 0,28 до 0,52 единиц и в среднем составляет $0,34 \pm 0,03$. Сопоставление этих данных с результатом контрольных опытов свидетельствует, что активность кислой фосфатазы в печени под действием хлоропрена понижается на 42%, в мозгу на 43%. Следовательно, хлоропрен оказывает более сильное ингибирующее действие на активность кислой фосфатазы печени.

Таблица 5

Снижение активности кислой и щелочной фосфатаз в органах подопытных крыс в %

	Печень	Почка	Мозг
Щелочная фосфатаза	72,8	—	60
Кислая фосфатаза	42	50	43

Данные о действии хлоропрена на щелочную фосфатазу приведены в табл. 4. Как видно из этих данных, щелочная фосфатаза в печени у подопытных крыс находится на низком уровне и колеблется от 0,12 до 0,58 единиц, составляя в среднем $0,33 \pm 0,035$ единиц. По сравнению с контрольной группой крыс ее активность снижена на 73%.

Активность щелочной фосфатазы понижена также в головном мозгу. Из данных табл. 4 видно, что ее активность равняется в среднем $0,19 \pm 0,025$ единиц, а по сравнению с нормальными крысами ее активность подавляется на 60%.

Щелочная фосфатаза оказалась более чувствительной к воздействию хлоропрена, чем кислая фосфатаза.

Таким образом, у подопытных крыс под действием хлоропрена активность фосфатаз в органах убывает в следующем порядке: щелочная фосфатаза печени — на 73, щелочная фосфатаза мозга — на 60, кислая фосфатаза почек — на 50, кислая фосфатаза мозга — на 43 и кислая фосфатаза печени — на 42%.

В ы в о д ы

1. Под действием хлоропрена в органах у подопытных крыс происходит заметное снижение активности как щелочной, так и кислой фосфатаз.

2. Щелочная фосфатаза более чувствительна к воздействию хлоропрена, чем кислая.

3. У подопытных крыс в органах активность щелочной фосфатазы убывает в печени на 73, а в мозгу на 60%.

4. Активность кислой фосфатазы убывает в почках на 50, в мозгу на 43 и в печени на 42%.

Кафедра биохимии
Ереванского медицинского института

Поступило 14 VI 1958 г

Վ. Գ. ՄԽԻՏՐԻԱՆ, Ս. Ա. ԱՏՎԱԿԱՏՅԱՆ

ՔԼՈՐՈՊՐԵՆԻ ԱԶԳԵՅՈՒԹՅՈՒՆԸ ՖՈՍՖԱՏԱԶՈՅԻ ԱԿՏԻՎՈՒԹՅԱՆ ՎՐԱ

Ա մ փ ո փ ու մ

Մեզանից մեկի [1] հետազոտություններից պարզվել էր, որ առնետների օրգաններում քլորոպրենի երկարատև ազդեցությունից տարրեր ֆերմենտների ակտիվությունն իջնում է ոչ միատեսակ. առանձնապես առժում է այն ֆերմենտների գործունեությունը, որոնց ակտիվությունը պայմանավորված է սուլֆհիդրիլ խմբերով:

Այդպիսի ֆերմենտներից ուսումնասիրվել է լյարդի սուլցինդեհիդրազայի, ուղեղի խոլինէսթերազայի, լյարդի, երիկամի, սրտի մկանի, ուղեղի ազինոզինարիֆոսֆատազայի և լյարդի քսանտինօքսիդազայի ակտիվությունը և ցույց է արվել, որ սրանց ակտիվությունն իջնում է անհամաչափ և որ նույն ֆերմենտի ակտիվությունը տարրեր օրգաններում ճնշվում է տարրեր ինտենսիվությամբ:

Տվյալ աշխատության մեջ մենք նպատակ ենք ունեցել պարզելու քլորոպրենի ազդեցությունը ֆոսֆատազայի վրա, որի ակտիվությունը, ինչպես վերջերս պարզվել է, կախված է նույնպես սուլֆհիդրիլ խմբերից:

Այլ նպատակով ուսումնասիրվել է առնետների լյարդի, ուղեղի, երիկամի թթվային ֆոսֆատազայի և լյարդի, ուղեղի հիմնային ֆոսֆատազայի ակտիվությունը:

Ստացված տվյալների հիման վրա մենք հանդիս ենք հետևյալ եզրակացությունը.

1. Փորձի տակ եղած առնետների օրգաններում քլորոպրենի ազդեցությունից թե թթվային և թե հիմնային ֆոսֆատազաների ակտիվությունը իջնում է:

2. Հիմնային ֆոսֆատազան քլորոպրենի հանդեպ ավելի զգայուն է՝ քան թթվային ֆոսֆատազան:

3. Քլորոպրենի ազդեցություն տակ առնետների օրգաններում հիմնային ֆոսֆատազայի ակտիվությունը իջնում է լյարդում՝ 3, իսկ ուղեղում՝ 60-ով:

4. Թթվային ֆոսֆատազայի ակտիվությունը իջնում է երիկամում՝ 50, ուղեղում՝ 43⁰/₀ և լյարդում՝ 42⁰/₀-ով:

ЛИТЕРАТУРА

1. Мхитарян В. Г. Тезисы докладов Второго Закавказского съезда физиологов, биохимиков и фармакологов. Тбилиси, 1956.
2. Мхитарян В. Г., Есаян Н. А. Изв. АН АрмССР (биол. и сельхоз. науки), т. XI, 6, 1958.
3. Цубой К. К., Хадсон Р. Б., Arch Biochem a. Biophys, 55, 1, 191, 206, 1955.
4. Накаму Я. Waka-yama Med. Soc., 7, 1, 75, 1956, (РЖХимБх, 13124, 1957.
5. Бессонова М. Н. Педиатрия, акушерство і гинекология, 5, 18, 1955.
6. Балаба Т. Я. Вопросы медицинской химии, т. I, вып. 1—2, 139, 1949.
7. Найду Д., Пратт О. Е. Enzymologia, vol XVII, 1, 1954.
8. Марш Дж. Б., Драбкин Д. Л., J Biol. Chem. vol. 168, 61, 1947.
9. Драбкин Д. Л., Марш Дж. Б. J. Biol. Chem. vol. 171, 2, 455, 1947.
10. Цорцолн Л. J. Gerontol. 10, 2, 156, 1955, РЖХимБх, 9484, 1956.
11. Корси А. Arch. sci. biol. 39, 3, 241, 1955, РЖХимБх, 11288, 1956.
12. Маковский Е., Шеларну К., Михэеску С., Васу С. Укр. биох. журн. 30, 18, 1958.
13. Шиновара Г. Е., Джонс Л. М., Рейнгарт Х. Л. J. Biol. Chem. 142, 921, 1942.
14. Альбрехт В. Monatsschr Kinderheilkunde 103, 9, 412, 1955, РЖХимБх, 12309, 1956.
15. Бьонди С. Folia med. 38, 2, 133, 1955, РЖХимБх, 12312, 1956.