

В. Г. МХИТАРЯН, Л. Л. ХАЧАТРЯН

ИЗМЕНЕНИЯ ГЕКСОКИНАЗНОЙ АКТИВНОСТИ В ОРГАНАХ БЕЛЫХ КРЫС ПРИ ХЛОРОПРЕНОВОМ ОТРАВЛЕНИИ*

В 1935 г., Н., Euler и E. Adler [1], Lutwak Mann и T. Mann [2] обнаружили, что дрожжевая гексокиназа катализирует перенос фосфата с АТФ на гексозы. В дальнейшем этот факт был подтвержден S. P. Colowick и Н. М. Kalkar [3, 4] и установлен, что при этой реакции образуются глюкоза-6-фосфат, что и определяет возможность его дальнейшего использования на различных путях фосфорно-углеводного обмена клетки.

Гексокиназная реакция имеет огромное значение для энергетического обмена, так как значительная часть потребляемой организмом энергии покрывается за счет углеводов.

В 1946 г. независимо друг от друга L. Berger, M. W. Stein, S. P. Colowick и C. F. Cori [5], M. Kunitz и M. R. McDonaldt [6] изолировали гексокиназу из дрожжей и получили ее в кристаллическом виде.

Гексокиназа обнаружена также в сердечной и скелетной мышцах, сетчатке глаза, печени, почках, селезенке, желудке и в ряде других органов и тканей.

A. Geiger [7], S. Ochoa [8], S. Huszak [9] и ряд других авторов доказали наличие гексокиназы также в головном мозгу. Согласно данным C. Long-a [10] головной мозг имеет наиболее высокую гексокиназную активность.

А. В. Палладин и Б. Н. Хайкина [11] считают, что гексокиназа присутствует в головном мозгу, начиная с первых дней после рождения животных и обеспечивает утилизацию глюкозы мозгом.

Ряд данных свидетельствует об определенных сдвигах ее активности в головном мозгу при его различных функциональных состояниях.

Г. Х. Бунятян и Г. С. Хачатрян [12] наблюдали значительное повышение гексокиназной активности мозга при алиментарной и условно-алиментарной гипергликемии и снижение ее активности при корковом торможении.

Заслуживает внимания исследования C. E. Barbieri [13] и Bhat-tacharya [14]. Согласно данным первого автора при авитаминозе „С“ наблюдается понижение гексокиназной активности, а по данным Bhat-tacharya дегидроаскорбиновая кислота и аллоксан угнетают ее активность. Низкая активность гексокиназы при аллоксановом диабете бы-

* Сообщение 15-ое.

ла обнаружена также W. H. Price, C. F. Cori и S. P. Colowick [15], P. Mandel и M. H. Schmitt [16], Akaeda Ikuro [17], К. И. Шаныгиной [18], В. С. Ильиным и К. И. Шаныгиной [19] и др.

Ряд авторов причисляют гексокиназу к тиоловым ферментам. A. Sols и R. K. Crane [20] нашли, что вещества, связывающие SH-группы угнетают активность очищенной гексокиназы мозга и что цистеин способен реактивировать ее. Угнетение гексокиназной активности мозга тиоловыми ядами наблюдали также E. Bueding и S. A. MacKinnon [21].

E. S. G. Barron, Sh. Dickmann, J. A. Muntz и T. P. Singer [22] показали, что очищенная дрожжевая гексокиназа, как тиоловый фермент чувствительна к рентгеноблучению и сильно ингибируется р-хлормеркурибензоатом.

В наших предыдущих работах [23—26] было установлено, что тиоловые ферменты проявляют высокую чувствительность к хлоропрену. Так, АТФ-азная, кислая и щелочная фосфатазы, сукцинатдегидрогеназа и ксантиноксидаза сильно ингибируются при хлоропреновом отравлении.

Эти данные, а также сдвиги, наблюдаемые в углеводном обмене при хлоропреновом отравлении, давали право предполагать определенные изменения в гексокиназной активности.

Для выяснения влияния хлоропрена на гексокиназную активность нами были проведены исследования на 50 взрослых белых крысах обоего пола весом от 150 до 270 г, находившихся на общем рационе. Из этой группы 30 крыс подвергались ежедневной затравке в течение 150—160 дней в атмосфере хлоропрена (8 мг/л) при двухчасовой экспозиции. Остальные служили контролем.

Гексокиназная активность определялась в гомогенатах мозга, почек, сердца и кожи по методу C. Long'a [10].

Суть метода заключалась в следующем: после декапитации крыс, быстро вырезали кусок кожи, освобожденной от волосяного покрова, извлекали мозг, сердце и почки. На торзионных весах взвешивали по 500 мг ткани и гомогенизировали в гомогенизаторе типа Поттер с охлажденным 0,12 М фосфатным буфером pH—7,8 (фосфаты брались в виде калиевых солей, так как согласно V. Wiebelhaus и H. A. Lardy [26] ионы натрия подавляют гексокиназную активность). Объем гомогенатов довели буфером до 3 мл.

Инкубационная жидкость содержала глюкозу, АТФ, $MgCl_2$, KCl и имела 0,3 мл объема. Гомогенаты подогревали до 30° и лишь потом добавляли в инкубационную смесь в количестве 0,2 мл с содержанием 33 мг свежей ткани. Таким образом конечный объем был равен 0,5 мл.

Опыты ставили в маленьких пробирках, куда отмеривали микропипеткой по 0,1 мл глюкозы с конечной концентрацией (0,0024 М), 0,05 мл Na—соли АТФ (0,005 М), 0,05 мл $MgCl_2$ (0,005 М), 0,05 мл KCl (0,042 М) и 0,05 мл NaF (0,05 М).

Растворы глюкозы, АТФ и КСl готовили на фосфатном буфере, а MgCl₂ и NaF на дистиллированной воде.

Растворы АТФ и NaF готовили непосредственно перед опытом. Контрольные и опытные пробы ставили параллельно. В пробы, служащие контролем, добавляли по 0,25 мл 5% раствора ZnSO₄ и затем во все пробы (опытные и контрольные) добавляли по 0,2 мл гомогенаты, в контрольные пробы добавляли также по 0,25 мл 0,3 N раствора Ba (OH)₂.

Контрольные пробы оставляли на холоде, а опытные инкубировали в водяной бане при 30° в течение 10 мин. По истечении времени, опытные пробы вынимали из водяной бани и добавляли к ним по 0,25 мл 5% раствора ZnSO₄ и 0,25 мл 0,3 N раствора Ba (OH)₂. Образовавшийся осадок во всех пробах отделяли центрифугированием в течение 5 мин. со скоростью 2000 об/мин. и в надосадочной жидкости определяли глюкозу по методу N. Nelson [28].

Гексокиназную активность учитывали по убыли глюкозы в μ л (1 μ M или 180 μ г глюкозы = 22,4 μ л) на мг сухого веса ткани — час и выражали через Q-глюкозы.

По данным Лонга у белых крыс в норме гексокиназная активность мозга, сердца, почек равна соответственно 27,1, 14,5 и 7,9.

Гексокиназная активность органов контрольных крыс приведена в табл. 1. Как видно из этих данных, наиболее высокая гексокиназная активность имеется в головном мозгу, затем сердечной мышце, почках и наименьшая активность в коже.

Таблица 1
Гексокиназная активность в органах белых крыс (контроль)

Вес	Головной мозг	Сердце	Почки	Кожа
145	21,6	13,1	7,0	—
150	23,07	—	9,8	—
180	20,6	7,07	—	—
195	21,6	9,08	8,9	—
163	26,2	8,5	8,2	—
170	21,6	12,9	7,9	—
214	20,6	7,08	8,5	—
270	27,7	8,4	7,0	—
180	25,7	9,08	7,2	4,8
170	20,6	8,09	8,9	5,3
200	21,8	7,55	9,3	4,9
260	22,3	7,3	—	5,1
230	—	10,1	8,0	5,6
M±m	22,78±0,71	9,02±0,59	8,24±0,23	5,14±0,004
Пределы колебания	20,6—27,7	7,07—13,1	7,0—9,8	4,8—5,6
$\sigma \pm$	2,46	2,07	0,78	0,01

Эти данные сравнительно ниже, чем у Лонга и хорошо совпадают с данными Г. Х. Бунятына, Г. С. Хачатряна [12] и В. Б. Егян [28]. Так например, по нашим данным гексокиназная активность мозга колеблется от

20,6 до 27,1 и составляет в среднем $22,78 \pm 0,71$, тогда как по данным Лонга она равна 27,1; а по данным Г. Х. Бунятына и Г. С. Хачатряна— $22,25 \pm 0,55$. В. Б. Егян— $20,87 \pm 1,37$. Соответственно низка ее активность и в сердечной мышце. Она колеблется от 7,07 до 13,1 и составляет в среднем $9,02 \pm 0,50$, что ниже чем данные Long'a и совпадают с данными В. Б. Егян. Что касается гексокиназной активности почек, то она равна $8,24 \pm 0,23$ и неплохо согласуется с литературными данными.

Низкая гексокиназная активность в наших исследованиях по сравнению с данными Лонга, видимо, обусловлена тем, что мы не всегда имели возможность пользоваться крысами одной линии, возраста, веса и пола, а также солевым составом инкубируемой смеси.

В литературе нам не удалось найти данных в отношении гексокиназной активности кожи, определяемой по методу Лонга и поэтому лишены возможности их сравнивать. По нашим данным у белых крыс в норме ее активность в коже, она колеблется в узких пределах от 4,8 до 5,6 и составляет в среднем $5,14 \pm 0,004$.

Определив гексокиназную активность в ряде органов контрольных крыс, мы приступили к определению ее активности у подопытных крыс.

Наши исследования показали, что гексокиназная активность весьма чувствительна к хлоропрену и угнетается в различных органах далеко не одинаково. Так например, из данных табл. 2 видно, что наибольшее снижение гексокиназной активности происходит в коже. Ее активность в ряде случаев полностью подавлена и составляет в среднем $1,03 \pm 0,33$. По сравнению с контрольными крысами она понижена на 80% и статистически достоверна ($t = 6,85$; $P < 0,001$).

Таблица 2

Влияние хлоропрена на гексокиназную активность органов белых крыс, находившихся 150—160 дней в атмосфере 8 мг/л хлоропрена при двухчасовой экспозиции

Вес	Головной мозг	Сердце	Почки	Кожа
250	10,79	5,05	5,6	1,2
160	14,39	2,52	1,48	3,8
170	11,12	4,5	3,9	0
175	13,60	8,08	3,4	3,2
155	9,7	5,05	6,3	0
200	8,2	3,03	3,4	0
185	5,6	2,02	2,94	0
150	4,1	3,5	2,4	1,9
300	9,2	4,35	3,4	0
225	15,8	2,5	3,4	2,3
230	17,0	6,5	1,9	0
290	11,3	6,7	4,4	0
$M \pm m$	$10,9 \pm 1,12$	$4,47 \pm 0,54$	$3,54 \pm 0,4$	$1,03 \pm 0,33$
Пределы колебания	4,1—17,0	2,02—8,08	1,48—6,3	0—3,8
$\sigma \pm$	3,887	1,895	1,395	1,158

Весьма любопытно, что у подопытных крыс с значительным поредением шерсти, а также у оголенных от волосяного покрова крыс, гексокиназная активность оказалась резко подавленной и, наоборот, у тех подопытных крыс, у которых не имелось выпадения волос, гексокиназная активность оставалась сравнительно на высоких цифрах. Этот весьма интересный факт, возможно, имеет определенное значение для выпадения волос, наблюдаемого при хлоропреновой интоксикации.

Значительное отклонение гексокиназной активности было найдено в головном мозгу, сердечной мышце и почках. Как показывают данные табл. 2, гексокиназная активность головного мозга колеблется у подопытных крыс в больших пределах от 4,1 до 17,0 и в среднем составляет $10,9 \pm 1,12$. По сравнению с данными контрольной группы крыс она понижена на 52,17% и статистически достоверна ($t=9,14$, $P<0,001$).

Неодинаковая инактивация гексокиназы в головном мозгу у отдельных особей, видимо, обусловлена их индивидуальными особенностями.

Гексокиназная активность сердечной мышцы при хлоропреновой интоксикации в отдельных случаях резко понижена и доходит до 2,02. Она также колеблется в широких пределах от 2,02 до 6,7 и составляет в среднем $4,47 \pm 0,54$. По сравнению с контрольными данными ее активность угнетена на 50,4% и статистически достоверна ($t=5,76$, $P<0,001$), (табл. 3).

Таблица 3

Сводные данные о гексокиназной активности органов контрольных и подопытных крыс (гексокиназная активность выражена в виде Q-глюкозы)

Наименование органов и тканей	Гексокиназная активность		% торможения
	у контрольных крыс	у подопытных крыс	
Головной мозг	$22,78 \pm 0,71$ (n=12)	$10,9 \pm 1,12$ (n=12) $P<0,001$	52,15
Сердечная мышца	$9,02 \pm 0,59$ (n=12)	$4,47 \pm 0,54$ (n=12) $P<0,001$	50,45
Почки	$8,24 \pm 0,23$ (n=11)	$3,54 \pm 0,4$ (n=12) $P<0,001$	57,04
Кожа	$5,14 \pm 0,004$ (n=5)	$1,03 \pm 0,33$ (n=12) $P<0,001$	79,97

Гексокиназная активность почек при хлоропреновом отравлении также значительно понижена. Она колеблется от 1,48 до 6,3 и в среднем составляет $3,54 \pm 0,4$. По сравнению с данными контрольной группы она понижена на 57% и статистически достоверна ($t=9,4$, $P<0,001$).

В ы в о д ы

Полученные нами данные свидетельствуют о высокой чувствительности гексокиназы головного мозга, сердечной мышцы, почек и особенно

кожи к хлоропрену. По нашим данным их активность в различных органах угнетается сравнительно неодинаково. Наибольшее угнетение ее активности происходит в коже, где она понижена на 80%, затем в почках—57,04, головном мозгу—52,1 и в сердечной мышце—50,4%. Полученные результаты свидетельствуют о тиоловой природе гексокиназной активности.

Ереванский медицинский институт

Поступило 29.VII 1964 г.

Վ. Գ. ՄԽԻՏՐԻԱՆ, Լ. Լ. ԽԱՉԱՏՐՅԱՆ

ՔԼՈՐՈՊՐԵՆԱՅԻՆ ԿՐՈՆԻԿ ԹՈՒՆԱՎՈՐՄԱՆ ԺԱՄԱՆԱԿ ԷՆՔՍՈԿԻՆԱԶԱՅԻՆ ԱԿՏԻՎՈՒԹՅԱՆ ՓՈՓՈԽՈՒԹՅՈՒՆՆԵՐԸ ԱՌՆԵՏՆԵՐԻ ՄԻ ՇԱՐՔ ՕՐԳԱՆՆԵՐՈՒՄ

Ա մ փ ո փ ո ւ մ

Ցույց է տրված, որ գանգուղեղի, սրտի մկանի, երիկամների և մանավանդ մաշկի հեքսոկինազայի ակտիվությունը չափազանց զգայուն է հանդեպ քլորոպրենի նրա ակտիվությունը ճնշվում է տարրեր օրգաններում ոչ միատեսակ, ամենից շատ նա իջնում է մաշկում—80%, ապա երիկամներում—57,04%, գանգուղեղում—52,1% և սրտի մկանում—50,4%: ստացված արդյունքները վկայում են այն մասին, որ հեքսոկինազան թիոլային ֆերմենտ է:

Л И Т Е Р А Т У Р А

1. Euler H. und Adler E. Z. Physiol. chem. 235. 122, 1935.
2. Lutwak Mann C. und Mann T. Biochem. Z. 281, 140, 1935.
3. Colowick S. P. and Kalkar H. M. J. Biol. Chem. 137, 789, 1941.
4. Colowick S. P. and Kalkar H. M. J. Biol. Chem. 148, 117, 1943.
5. Berger L. et al. J. Gen. Physiol. 29, 379, 1946.
6. Kunitz M. and McDonaldt M. R. J. Gen. Physiol. 29, 143, 1946.
7. Geiger A. Biochem. J. 34, 465, 1940.
8. Ochoa S. Biol. J. Chem. 141, 245, 1941.
9. Huszak S. Biochem. Z. 312, 315, 1942.
10. Long C. Biochem. J. 50, 407, 1952.
11. Палладин А. В. и Хайкина Б. И. Укр. биохим. журн. 19, 2, 177, 1947.
12. Бунятян Г. Х. и Хачатрян Г. С. Вопросы биохимии, т. 1, АН АрмССР, 1960.
13. Barbelli C. E. Chem. Abst. 50, 12215, 1955.
14. Bhattacharya S. K. Nature 184, 4699, 1959.
15. Price W. H., Cori C. F. and Colowick S. P. J. Biol. Chem. 160, 633, 1945.
16. Mandel P. and Schmitt M. L. Bull. Soc. Chim. biol. 37, 847, 1955.
17. Okaeda Ikuro. J. Biochem. 43, 645, 1956.
18. Шаныгина К. И. Тр. Ин-та эксперим. мед. АМН СССР за 1958 г., 179, 1959.
19. Ильин В. С. и Шаныгина К. И. Вопросы мед. химии 6, 291, 1960.
20. Sols A. and Crane R. K. J. Biol. Chem. 206, 925, 1954.
21. Bueding E. and Mackinnon S. A. J. Biol. Chem. 215, 495, 1955.
22. Barron E. S. G. et al. J. Gen. Physiol. 32, 537, 1949.
23. Мхитарян В. Г. и Есаян Н. А. Изв. АН АрмССР (серия биол. и сельхоз. науки), том XI, 6, 13, 1958.
24. Мхитарян В. Г. Тр. Ереванского мединститута, вып. XI, 41, Ереван, 1960.
25. Мхитарян В. Г. Изв. АН АрмССР (серия биолог. науки), том XV, 5, 39, 1962.
26. Wiebelhaus V. and Lardy H. A. Arch. Biochem. 21, 321, 1949.
27. Nelson N. J. Biol. Chem. 153, 375, 1944.
28. Егян В. Б. Вопросы биохимии, т. 2, Изд. АН АрмССР, Ереван, 1961.