

В. Г. МХИТАРЯН, С. А. АСТВАЦАТРЯН

## ВЛИЯНИЕ ХЛОРОПРЕНА НА КАТЕПТИЧЕСКУЮ АКТИВНОСТЬ\*

В 1933 г. В. Wadschmidz-Leitz, А. Scharikowa и А. Schäffner [1] установили, что тиоловые группы имеют существенное значение для активности катепсинов и что сероводород, цистеин и восстановленный глутатион могут их реактивировать.

Эти данные, а также результаты исследования Tr. Bersin-a [2, 3] L. Hellerman-a и M. Perkins-a [4], Б. И. Гольдштейна [5] и ряда других авторов позволили причислить катепсины к тиоловым ферментам.

Н. Euler, Р. Kagger и Zehender [6] нашли, что аскорбиновая кислота активирует фермент, что в дальнейшем было подтверждено исследованиями Э. Э. Мартинсона и И. В. Фетисенко [7]. Они показали, что аскорбиновая кислота усиливает автолиз органов, т. е. активирует внутриклеточные протеиназы.

В связи с тем, что при хроническом хлоропреновом отравлении в организме снижается содержание аскорбиновой кислоты и восстановленного глутатиона, т. е. уменьшается содержание естественных активаторов катепсинов, нам было интересно выяснить угнетается ли их активность при хроническом хлоропреновом отравлении и возможна ли их реактивация.

Для разрешения этих вопросов, на нашей кафедре почти одновременно были поставлены опыты *in vivo* нами и *in vitro* Г. В. Матиняном [8]. Его исследования показали, что в опытах *in vitro* большие концентрации хлоропрена угнетают активность фермента, который может быть вновь реактивирован гипосульфитом. Наши же опыты проводились на животных, подвергнутых хроническому хлоропреновому отравлению.

### Постановка опытов и методика исследования

Динамическая затравка крыс производилась в атмосфере хлоропрена (8 мг/л) при двухчасовой экспозиции в течение 100—110 дней. Как контрольные, так и подопытные крысы содержались на смешанной диете.

Активность катепсинов определялась в головном мозгу, печени и почках по методу Willschatter и Waldschmidt-Leitz [9], видоизмененному Б. И. Гольдштейном [5]. Параллельно ставились опыты с активацией фермента сероводородом.

Суть метода заключалась в следующем: К 0,4 г. измельченной ножницами на льду ткани добавляли 1 мл 50% уксуснокислого глицерина,

\* Сообщение 16-е.

0,1 мл N раствора уксусной кислоты, 1,8 мл воды и оставляли пробу при комнатной температуре на 30 мин. По истечении этого времени приливали к ней 1 мл воды и центрифугировали. С надосадочной жидкости отмеряли 1 мл и переливали в другую пробирку, куда добавляли 8 мл 90% этилового спирта, 1 мл спиртового раствора  $\text{CaCl}_2$  и несколько капель 0,5% спиртового раствора тимолфталина и титровали 0,05 N раствором КОН (в 90% спирту) до глубокой окраски (контроль).

Остальную часть пробы перемешивали и ставили в термостат ( $37^\circ$ ) на 24 ч. По истечении этого времени ее вновь подвергали центрифугации, отмеряли 1 мл надосадочной жидкости и титровали точно так же, как это было выше (опыт).

Разность между этими двумя титрациями (контроль и опыт) давала цифру, которая соответствовала активности фермента, выраженной в миллилитрах 0,05 N КОН.

Активация фермента сероводородом производилась следующим образом: к 0,4 г измельченной ткани добавляли 1 мл 50% уксуснокислого глицерина, 0,86 мл 0,1 N раствора соляной кислоты, 0,86 мл 0,1 N раствора  $\text{Na}_2\text{S}$  и 0,1 мл раствора уксусной кислоты. Конечный объем доводили водой до 3 мл ( $\text{pH}=4$ ) и оставляли стоять при комнатной температуре 30 мин. По истечении этого срока добавляли 1 мл воды и далее повторяли все также, как это делали при определении активности фермента без сероводорода.

Полученные данные как у контрольных, так и у подопытных крыс статистически обработаны и приведены в соответствующих таблицах.

Таблица 1  
Катептическая активность (0,05N КОН в мл) в норме (контрольная группа).

	Без активации			С активацией $\text{H}_2\text{S}$		
	почка	печень	мозг	почка	печень	мозг
	3,0	1,78	0,42	3,28	1,96	0,44
	1,76	2,35	0,44	2,20	2,72	—
	2,0	2,72	0,45	2,60	2,90	0,36
	1,42	2,80	0,30	2,46	2,50	0,25
	3,20	2,58	0,48	2,95	2,96	0,58
	2,20	2,36	0,36	3,00	2,78	0,48
	2,96	2,30	—	3,42	2,94	—
	3,34	2,45	0,28	3,82	2,87	0,48
	3,40	2,60	0,30	3,70	2,92	0,28
	3,50	2,40	—	3,9	2,46	—
	3,68	3,2	0,46	3,82	2,98	0,32
	2,24	2,10	0,38	2,84	2,86	0,49
$\bar{M} \pm m$	$2,72 \pm 0,21$	$2,47 \pm 0,07$	$0,38 \pm 0,02$	$3,16 \pm 0,16$	$2,74 \pm 0,14$	$0,41 \pm 0,037$
Предел колебания	1,42—3,68	1,78—3,2	0,28—0,48	2,20—3,82	1,96—2,98	0,25—0,58
$s \pm$	0,75	0,25	0,07	0,57	0,48	0,111

Как видно из табл. 1, катептическая активность органов контрольных крыс далеко неодинакова. Наибольшая активность обнаружена в

почках, затем в печени и наименьшая в мозгу, что хорошо согласуется с данными Benz-a [10].

По нашим данным катептическая активность почек колеблется в пределах  $1,42 \pm 3,68$  и составляет в среднем  $2,72 \pm 0,21$ . Значительные колебания в активности фермента найдены и в печени. Она колеблется от 1,78 до 3,2 и составляет в среднем  $2,47 \pm 0,07$ . Наконец, исключительно низка его активность в мозгу. Она колеблется от 0,28 до 0,48 и составляет в среднем  $0,38 \pm 0,02$ . Параллельно у контрольных крыс ставились пробы с активацией фермента с сероводородом. Полученные данные хотя и несколько выше, чем данные без активации фермента, однако недостоверны ( $P > 0,05 - 0,1$ ), (табл. 2).

Таблица 2

Влияние сероводорода на катептическую активность органов контрольных крыс

Почка		% активации	Печень		% активации	Мозг		% активации
без активации	с активацией $H_2S$		без активации	с активацией $H_2S$		без активации	с активацией $H_2S$	
$2,72 \pm 0,21$ (n=12)	$3,16 \pm 0,16$ (n=12) $P > 0,1$	12,5	$2,47 \pm 0,07$ (n=12)	$2,74 \pm 0,14$ (n=12) $P > 0,05$	10,9%	$0,38 \pm 0,02$ (n=10)	$0,41 \pm 0,03$ (n=9) $P > 0,1$	7,9

Эти данные находятся как бы в противоречии с фактом активации катепсинов сероводородом. Однако противоречие это кажущееся, так как по данным Б. И. Гольдштейна [11] сероводород не оказывает заметного активирующего действия на катепсины у животных в осенние и зимние месяцы, т. е. в то время года, когда мы ставили наши опыты.

После того как была установлена катептическая активность некоторых органов контрольных животных, а также действие сероводорода на процесс реактивации фермента, мы приступили к определению его активности у подопытных крыс.

Наши исследования показали, что при хроническом хлоропреновом отравлении катептическая активность значительно угнетается, причем в различных органах оно бывает выражено сравнительно неодинаково. Так, из данных табл. 3 и 4 видно, что катептическая активность мозга угнетается на 42,1%, печени—39,3% и почек—32%. По сравнению с данными контрольных крыс это снижение достоверное ( $P < 0,05 - 0,001$ ).

Таким образом, при хлоропреновом отравлении наибольшее снижение активности катепсинов отмечается в мозгу, затем в печени и почках, что хорошо согласуется с результатами наших предшествующих исследований.

Особый интерес представляют также данные, которые получены в параллельных пробах с сероводородом.

Как явствует из данных табл. 5, сероводород вызывает реактивацию фермента в органах у подопытных крыс, причем в различных органах она бывает выражена неодинаково. Наибольшая реактивация фермента наблюдается в мозгу, затем в печени и наименьшая в почках, т. е. с той

Таблица 3  
Катептическая активность (0,05N КОН в мл) органов белых крыс, находившихся в атмосфере 8 мг/л хлоропрена в течение 100—110 дней при 2-часовой экспозиции

Вес в г	Без активации			С активацией H <sub>2</sub> S		
	почка	печень	мозг	почка	печень	мозг
250	1,68	1,80	0,26	2,44	2,18	0,32
160	1,28	1,32	0,20	1,86	1,84	0,36
170	1,0	0,8	0,15	1,72	1,72	0,28
175	2,3	2,1	—	2,6	1,9	—
155	2,15	2,0	0,3	2,76	2,7	0,42
200	1,65	1,9	0,26	1,56	2,79	0,38
185	1,90	1,1	0,36	2,4	1,4	—
150	2,2	1,82	0,12	3,4	1,84	—
250	2,56	0,68	0,10	2,85	2,48	0,25
M±m	1,85±0,16	1,50±0,15	0,22±0,03	2,39±0,19	2,09±0,15	0,34±0,026
Пределы колебания	1,0—2,56	0,68—2,1	0,10—0,36	1,56—3,4	1,4—2,79	0,25—0,42
σ±	0,47	0,43	0,086	0,59	0,44	0,064

Таблица 4  
Влияние хлоропрена на катептическую активность органов белых крыс

Почка		% торможения катептической активности	Печень		% торможения катептической активности	Мозг		% торможения катептической активности
контроль	опыт		контроль	опыт		контроль	опыт	
2,72±0,21 (n=12)	1,85±0,16 (n=9) P<0,05	32%	2,47±0,07 (n=12)	1,50±0,15 (n=9) P<0,001	39,3%	0,38±0,02 (n=10)	0,22±0,03 (n=8) P<0,001	42,1

же последовательностью, с какой совершается их инактивация. Так например, в мозгу катептическая активность повышается на 54,5, в печени—39,3 и в почках—29,2%. Таким образом, угнетенная катептическая активность у подопытных крыс вновь реактивируется сероводородом, особенно сильно в мозгу.

Полученные данные статистически обработаны и являются достоверными.

Результаты этих исследований еще раз подтверждают высокую чувствительность тиоловых ферментов к хлоропрену, одним из типичных представителей которых являются катепсины. Они показывают, что инактивация тиоловых ферментов, наблюдаемая при хлоропреновом отравлении, совершается, помимо алкилирования, в основном окислением их тиоловых групп в дисульфидные группы, вследствие чего они теряют свою активность. В пользу этого механизма говорят данные по реактивации катепсинов.

Таблица 5

Влияние сероводорода на катептическую активность органов подопытных крыс

Почка		% реакти- вазии	Печень		% реакти- вазии	Мозг		% реакти- вазии
без акти- вазии	с акти- вазией H <sub>2</sub> S		без акти- вазии	с акти- вазией H <sub>2</sub> S		без акти- вазии	с акти- вазией H <sub>2</sub> S	
1,85±0,16 (n=9)	2,39±0,19 (n=9) P<0,05	29,2%	1,50±0,15 (n=9)	2,09±0,15 (n=9) P<0,002	39,3%	0,22±0,03 (n=8)	0,34±0,26 (n=6) P<0,01	51,5%

**В ы в о д ы**

1. Катептическая активность органов белых крыс, находившихся в атмосфере хлоропрена (8 мг/л) при двухчасовой экспозиции в течение 100—110 дней, угнетается в мозгу на 42,1, в печени 39,3 и в почках—32%.

2. У отравленных хлоропреном крыс сероводород реактивирует катепсины. Наибольшая реактивация отмечается в мозгу, затем в печени и в почках.

Факт реактивации фермента сероводородом позволяет заключить, что инактивация катепсинов хлоропреном совершается за счет окисления SH-групп фермента в S-S группы.

Ереванский медицинский институт

Поступило 29.VII 1964 г.

Վ. Գ. ՄԵԻՔԱՐՅԱՆ, Ս. Ա. ԱՍՏՎԱԾԱՏՐՅԱՆ

**ՔԼՈՐՈՊՐԵՆԻ ԱԶԴԵՑՈՒԹՅՈՒՆԸ ԿԱՏԵՊՍԻՆԱՅԻՆ ՖԵՐՄԵՆՏՆԵՐԻ ԱԿՏԻՎՈՒԹՅԱՆ ՎՐԱ**

**Ա մ փ ո փ ո լ մ**

Առնետների մոտ խրոնիկ քլորոպրենային թունավորումից մի շարք օր-դաններում իջնում է կատեպսինային ֆերմենտների ակտիվությունը: Տարբեր օրգաններում այն արտահայտված է լինում ոչ միատեսակ. ուղեղում նա հա-վասար է 42,1%-ի, լյարդում՝ 39,3%-ի և երիկամներում՝ 32%-ի: Ցույց է տրված, որ քլորոպրենային թունավորման հետևանքով ինակտիվացած կա-տեպսինային ֆերմենտները հնարավոր է ծծմբաջրածնի միջոցով նորից ակտի-վացնել: Ամենից շատ այդ կատարվում է գանգուղեղում, ապա լյարդում և երիկամներում:

Ատաջված արդյունքները ասում են այն մասին, որ քլորոպրենային թու-նավորման ժամանակ կատեպսինային ֆերմենտների ինակտիվացիան տեղի է ունենում շնորհիվ այն բանի, որ ֆերմենտի SH խմբերը օքսիդանում են S=S խմբերի:

## Л И Т Е Р А Т У Р А

1. Waldschmidt Leitz E., Scharikowa A. u. Schäffner A.--Z. physiol. Chem. 214, 75, 1933.
2. Bersin Th. Biochem. Z., 248, 3, 1932.
3. Bersin Th. Enzymforschung, 4, 68, 1933.
4. Hellerman L. and Perkins M. J. Biol. Chem., 107, 241, 1934.
5. Гольдштейн Б. И. Исследования по биохимии тканевых протеиназ (катепсинов). Изд. АН УССР, Киев, 1939.
6. Euler H., Kagger P. Zehender. Helv. Chim. Acta, 17, 157, 1934.
7. Мартинсон Э. Э. и Фетисенко И. В. Биохимия, 2, 6, 809, 1937.
8. Матинян Г. В. Изв. АН АрмССР (биол. науки), т. 14, 8, 39, 1961.
9. Willschatter R. und Waldschmidt-Leitz. Ber. Dtsch. Chem. Ges., 54, 113, 1921.
10. Benz. Rev. Suisse Zool., 65, 294, 1958.
11. Гольдштейн Б. И. О влиянии сульфгидрильных групп на биологические свойства тканевых белков. Госмедиздат, УССР, Киев, 1955.