

ВЛИЯНИЕ НЖК И ПРОДУКТОВ ИХ ПЕРЕОКИСЛЕНИЯ НА АКТИВНОСТЬ β -ГЛЮКУРОНИДАЗЫ

Л. А. ЧИЛИНГАРЯН, В. Г. МХИТАРЯН

Исследовали влияние олеиновой, линолевой и линоленовой кислот, а также продуктов их переокисления на активность β -глюкуронидазы в мозге и печени белых крыс в различные сроки введения (7 и 14 дней). Установлено, что под влиянием названных агентов активность β -глюкуронидазы возрастает в прямой зависимости от ненасыщенности кислоты и степени ее пероксидации. Через 7 дней от начала введения активность достигает максимума, понижается к 15-му дню, не доходя, однако, до нормальных показателей.

Известно, что фермент β -глюкуронидаза (КФ 3.2.1.31) представлен почти во всех тканях животных, преимущественно в лизосомах и эндоплазматическом ретикулуме.

Как известно, нормально функционирующая клетка имеет твердо закрепленный ферментный остов, определенные ферментные системы, деятельность которых регулируется законами их компартиментализации в клетке и закрепленностью в мембранных образованиях цитологических структур. В лизосомах клеток известно более 60 гидролитических ферментов, расщепляющих большинство сложных веществ и биополимеров в организме. Наиболее чувствительным аппаратом в аварийных для организма ситуациях, связанных с высокой степенью напряжения метаболических процессов при репарации, регенерации [10], экстремальных физических нагрузках и стрессе [4] являются лизосомы. β -глюкуронидазу—фермент с широким функциональным назначением, в последнее время нередко используют в качестве маркерного фермента лизосом [21, 23].

Мы поставили перед собой цель изучить активность β -глюкуронидазы в мозге и печени белых крыс под влиянием ненасыщенных жирных кислот и продуктов их переокисления, инициирующих в организме цепную реакцию свободнорадикального окисления.

Материал и методика. Опыты были поставлены на белых крысах-самцах, массой 120—130 г. Контролем служили интактные крысы. Подопытные были разделены на 2 группы: первой—вводили внутривенно ненасыщенные жирные кислоты (НЖК) (олеиновую, линолевую, линоленовую) в дозе 0,1 г на 100 г массы животного; второй—в той же дозе, пероксидированные НЖК. Пероксидация достигалась продуванием воздуха через НЖК при температуре 60°. Перекисное число составляло для олеиновой кислоты—300, для линолевой и линоленовой—400.

Животных замораживали в жидком воздухе и через 7 и 14 дней после введения соответствующей жирной кислоты извлекали исследуемые ткани (мозг и печень). Активность фермента определяли по методу Колдовски и др. [17] в некоторой нашей модификации.

Готовили 1%-ные гомогенаты тканей на бидистиллате при 0° с помощью тefлонового гомогенизатора, с последующим разведением печеночного гомогената до 0,1%. Инкубационная смесь состояла из 2 мл ацетатного буфера с pH 4,0, содержащего три-тон-Х-100 р-нитрофенил-β-d-глюкуронида (фирмы Calbiochem, Calif.) в конечной концентрации 0,5 ммоль и 1 мл гомогената. Общий объем смеси составлял 4,0 мл. Смесь помещали на 60 мин в термостат при 37°. Реакцию останавливали добавлением 1 мл 1 М K₂CO₃ с образованием желтой окраски высвободившегося р-нитрофенила. Интенсивность окраски определяли спектрофотометрически при 420 нм на Spectromop-203. Активность фермента выражали в ммоль/мг белка/60 мин. Содержание белка в гомогенатах определяли по Лоури [18] с использованием в качестве рабочих стандартов кристаллического бычьего сывороточного альбумина («Koch-light», Англия).

Результаты и обсуждение. Полученные данные представлены в табл. 1 и 2. Как видно из табл. 1, перексидированная олеиновая кислота через 7 суток после начала введения повышает активность

Таблица 1

Активность β-глюкуронидазы в мозге белых крыс при различных сроках введения НЖК и продуктов их перексидации, мкМ/мг белка

Контрольные крысы	Вводимые кислоты	Подопытные крысы			
		через 7 дней	% изменения	через 14 дней	% изменения
0,083±0,005 (16)	Олеиновая	0,121±0,009 (8) p<0,001	45,7	0,101±0,004 (8) p<0,001	21,6
	Перексидированная олеиновая	0,192±0,007 (5) p<0,001	131,4	0,122±0,005 (12) p<0,001	47,0
	Линолевая	0,146±0,009 (10) p<0,001	75,9	0,132±0,007 (16) p<0,001	59,0
	Перексидированная линолевая	0,211±0,01 (9) p<0,001	154,2	0,136±0,006 (7) p<0,001	60,2
	Линоленовая	0,169±0,007 (14) p<0,001	103,6	0,14 ±0,006 (21) p<0,001	68,6
	Перексидированная линоленовая	0,237±0,01 (12) p<0,001	185,5	0,182±0,007 (7) p<0,001	119,2

Примечание: в обеих таблицах в скобках указано количество животных.

β-глюкуронидазы на 45,7%, спустя 14 суток активность фермента хотя и понижается, однако остается выше контроля на 21,6%. Линолевая кислота повышает активность β-глюкуронидазы в мозге через 7 суток на 75,9%, падая через 14 суток до 59% по сравнению с контролем, а линоленовая кислота—до 103,6 и 68,6% соответственно. Можно заметить

Таблица 2

Активность β -глюкуронидазы в печени белых крыс в различные сроки введения НЖК и продуктов их перекисаации, мкМ/мг белка

Контроль- ные крысы	Вводимые кислоты	Подопытные крысы			
		через 7 дней	% изме- нения	через 14 дней	% изме- нения
1,14±0,05 (17)	Олеиновая	1,385±0,05 (14) p<0,02	21,5	1,29±0,08 (7) p<0,05	13,2
	Пероксидированная олеиновая	2,08±0,04 (5) p<0,001	82,5	1,55±0,12 (9) p<0,01	35,9
	Линолевая	1,559±0,06 (10) p<0,001	36,2	1,37±0,03 (19) p<0,01	20,1
	Пероксидированная линолевая	2,843±0,06 (7) p<0,001	149,3	1,37±0,03 (7) p<0,001	58,8
	Линоленовая	1,72±0,08 (18) p<0,001	50,8	1,36±0,05 (14) p<0,05	19,2
	Пероксидированная линоленовая	3,25±0,14 (7) p<0,001	185,0	2,185±0,1 (7) p<0,001	91,6

большую чувствительность β -глюкуронидазной активности к НЖК по мере возрастания двойных связей в молекуле жирной кислоты.

При введении пероксидированных НЖК заметны более глубокие сдвиги. Так, пероксидированная олеиновая кислота через 7 суток повышает активность β -глюкуронидазы в мозге более, чем в 2 раза, линолевая—на 154,2%, а линоленовая—почти в 3 раза. Через 14 суток уровень активности β -глюкуронидазы при всех затравках пероксидированными жирными кислотами соответственно понижается до 47,0, 60,2 и 119,2%, однако остается выше уровня активности интактных животных. Таким образом, наивысшая активность β -глюкуронидазы в мозге наблюдается под влиянием пероксидированной линоленовой кислоты через 7 суток после начала введения.

При анализе данных об активности фермента в печеночной ткани выявлены аналогичные сдвиги в активности фермента под влиянием НЖК и продуктов их перекисаации (табл. 2). Через 7 суток после введения непероксидированной олеиновой кислоты наблюдается повышение активности β -глюкуронидазы на 21,5%, через 14—активность понижается, доходя до 13,2%, под влиянием линолевой и линоленовой кислот через 7 суток активность соответственно повышается до 36,2 и 50,8 и понижается через 14—до 20,1 и 19,2%.

Под влиянием пероксидированных НЖК наблюдаются более глубокие сдвиги: так, на 7-е сутки активность фермента повышается под влиянием олеиновой, линолевой и линоленовой соответственно на

82,5; 149,3 и 185%, а через 14 суток она, хотя и несколько понижается, однако все еще превышает контрольный уровень соответственно на 35,9; 58,8 и 91,6%.

Согласно нашим данным, мозговая ткань в целом несколько более чувствительна к введению НЖК и продуктов их перекисления, чем печеночная. Следует отметить особенности распределения β -глюкуронидазной активности в мозге. Работами Аллена и др. [14] показано, что в мозговой ткани β -глюкуронидазная активность в различных отделах мозга представлена неодинаково. Белое вещество обладает значительно большей активностью, чем серое; причем если в сером веществе фермент имеет исключительно лизосомальную локализацию, то в белом он представлен и в лизосомах (глиальных клетках) и преимущественно вне лизосом (в неидентифицированной фракции и во фракции микросом).

Установлено, что жирнокислотный состав фосфолипидов биомембран лизосом меняется в зависимости от жирнокислотного состава питания [11, 16]. Акоста и др. показали [13], что даже в концентрации $5 \cdot 10^{-6}$ свободные жирные кислоты заметно лабилизируют мембраны лизосом миоцитов сердца. Введение НЖК и продуктов их перекисления вызывает значительное повышение активности β -глюкуронидазы, что, возможно, тоже обусловлено лабильностью лизосомных мембран особенно через 7 суток после введения этих кислот и находится в четкой зависимости от степени их ненасыщенности и перекисленности. В этом аспекте представляют интерес данные Мелик-Агаян [7] о максимальном уровне липидных перекисей в печени через 7 суток после введения хлоропрена, перекисный механизм действия которого хорошо известен из работ Мхитаряна [8]. В тот же срок показано резкое снижение содержания витамина Е с жировой дистрофией при гистохимическом исследовании [2]. По данным Буниана и соавт. [15], Мура и соавт. [19], недостаток витамина Е вызывает в свою очередь резкое нарушение стабильности мембран лизосом.

В литературе имеются также многочисленные данные о высокой активности β -глюкуронидазы при радиобиологическом воздействии [3]. Одни авторы объясняют это механизмом разрыва лизосомальных мембран и солиubilизацией их ферментов, другие же—первичным разрушением антиоксидантов в клетке [24, 25].

Козловым и соавт. [6] показано накопление продуктов свободно-радикального окисления—липиперекисей при злокачественном росте в липидах мембран органелл печени (ядер, митохондрий, микросом, лизосом).

При злокачественных новообразованиях активность β -глюкуронидазы также возрастает [20, 22], так что при некоторых видах опухолей определение β -глюкуронидазной активности служит даже вспомогательным тестом в диагностике.

Зайцев [5] выявил достоверное повышение активности β -глюкуронидазы в сыворотке крови при различных гепатитах, одновременно по-

казав связь между глубиной паренхиматозных изменений в печени и степенью солиubilизации лизосомальных ферментов, что объясняется степенью повреждения лизосомальных мембран

По данным Абегаи и др. [1], при вирусном гепатите наблюдается резкое повышение содержания липидных перекисей в крови с активацией ряда других ферментов, что объясняется повышением мембранной проницаемости гепатоцитов под влиянием липидных перекисей.

Повышение активности β -глюкуронидазы под влиянием ненасыщенных жирных кислот и продуктов их переокисления, по-видимому, связано также с накоплением продуктов свободнорадикального окисления, имеющих кислую реакцию, вследствие чего увеличивается атакуемость ферментов лизосом, и встроенные в мембраны гидролазы реагируют резким возрастанием специфической активности [11].

Резкое повышение активности β -глюкуронидазы под влиянием ПЖК и продуктов их пероксидации обосновывается данными Несмеянова и др. [9] о необходимости свободной карбоксильной группы для непосредственной инициации активности β -глюкуронидазы.

Возможно, одним из индукторов распада глюкуронидов может быть переключение углеводного обмена в условиях высокой липидной пероксидации на альтернативные пути: на пентозный цикл [12] и частично на глюкуронатный путь с целью синтеза пентоз и НАДФН₂, столь необходимого в ряде биосинтетических реакций организма, и в том числе для стероидных гормонов, выполняющих регуляторную функцию как в отношении липидной пероксидации в целом, так и в регуляции активности β -глюкуронидазы в частности.

Ереванский медицинский институт,
кафедра биохимии

Поступило 15.III 1979 г.

ՉԶԱԳԵՑԱԾ ՃԱՐՊԱԹՔՈՒՆԵՐԻ ԵՎ ՆՐԱՆՑ ՊԵՐՕՐՍԻԿԱՑՄԱՆ ԱՐԳԱՍԻՔՆԵՐԻ ԱԶԳԵՑՈՒԹՅՈՒՆԸ ԱՌՆԵՏՆԵՐԻ ՈՒՂԵՂԻ ԵՎ ԼՅԱՐԴԻ β -ԴԼՅՈՒԿՈՒՐՈՆԻԿԱԶՅԻ ԱԿՏԻՎՈՒԹՅԱՆ ՎՐՄ.

Լ. Ա. ԶԻՎԻԳԱՐՅԱՆ, Վ. Գ. ՄԻՒԹԱՐՅԱՆ

Սպիտակ առնետների վրա ուսումնասիրվել է շահագեցած ճարպաթթուների (օլենինաթթվի, լինոլաթթվի և լինոլենաթթվի) և նրանց գերօքսիդացման արգասիքների ազդեցությունն ուղեղի և լյարդի β -գլյուկուրոնիդազայի ակտիվության վրա: Ճարպաթթուները ներարկվել են ներորովայնային 7 և 14 օրվա ընթացքում:

Հետազոտությունները ցույց են տվել, որ β -գլյուկուրոնիդազայի ակտիվության բարձրացումը կախված է ճարպաթթվի շահագեցվածությունից և պերօքսիդացման աստիճանից: Ընդ որում, առավելագույն ակտիվացում նկատվում է ներարկումից 7 օր հետո, այնուհետև ֆերմենտի ակտիվությունը իջնում է, սակայն 15-րդ օրը դեռ մնում է նորմայից բարձր:

CHANGES OF β -GLUCURONIDASE ACTIVITY IN RAT BRAIN AND LIVER

L. A. CHILINGARIAN, V. G. MKHITARIAN

Unsaturated fatty acids and their hydroperoxydes have been administered to rats causing the increase of β -glucuronidase activity by the 7-th day and its decrease by the 14-th day. The activity was proportional to the degree of acid unsaturation and peroxidation.

Л И Т Е Р А Т У Р А

1. Абагян И. А., Казазян А. В., Мхитарян В. Г. Журн. эксп. и клин. медицины, 15, 173, 1976.
2. Аллавердян А. Г. Тр. Инст. гигиены и проф. заболеваний, 1, 139, 1970.
3. Бак Э., Александр П. Основы радиобиологии (пер. с англ.), 232, М., 1963.
4. Валякина Т. И., Васильева Н. Б., Малькова В. П., Габриелян Н. Д., Хорлин А. Я. Биохимия, 40, 733, 1975.
5. Зайцев В. В. Автореф. канд. дисс. М., 1974.
6. Козлов Ю. П. Тр. Московского общества испытателей природы. Биоантioxidантные. 52, 5, 1975.
7. Мелик-Агаян Е. А. Автореф. канд. дисс., Ереван, 1975.
8. Мхитарян В. Г. Автореф. докт. дисс., Ереван, 1964.
9. Несмеянов Б. А., Зурабян С. О., Сосинская И. Е., Хорлин А. Я. Биохимия, 39, вып. 1, 141, 1974.
10. Покровский А. А., Арчаков А. Н., Мухамбетова Л. Х., Бурмантова Н. П., Аленичева Т. В., Жеребкова Н. С. Цитология, 11, 79, 1969.
11. Покровский А. А., Тутельян В. А., Лизосомы, М., 128, 1976.
12. Семерджян Л. В., Мхитарян В. Г. Журн. эксп. и клин. медицины, 17, 4, 11, 1977.
13. Acosta D. & Wenzel D. G. Atherosclerosis, 20, 417, 1974.
14. Allen N. & Kirmenjian H. K. J. Neurochemistry, 16, 1113, 1969.
15. Bunan J., Green J., Diplock A. T., Robinson D. Brit. J. Nutr., 21, 127, 137, 147, 1967.
16. Henning R., Kaulen H. D., Stoffel W. Hoppe-Seyl. Z. Physiol. Chem., 351, 1191, 1970.
17. Koldovsky O., Palmiery M., Jumavan J. Comp. Biochem. Physiol., 43B, 1, 1972.
18. Lowry D. H., Rosebrough N. J., Farr A. L. & Randall R. J. J. Biol. Chem., 193, 265, 1951.
19. Moore T., Sharman I. M., Stanton M. G., Dingle J. T. Biochem. J., 103, 923, 1967.
20. Stuttleworth E. C. & Allen N. Neurol., 18, 534, 1968.
21. Stahn B., Maier K., Hanning K. J. Cell. Biol., 66, 576, 1970.
22. Watts G., Mac Vigar J. & Goldburg D. M. Brit. J. Cancer, 20, 282, 1966.
23. Werb Z., Cohn L. J. Exptl. Med., 135, 21, 1972.
24. Wills E. D., Wilkinson A. E. Biochem. J., 99, 657, 1966.
25. Wills E. D., Wilkinson A. E. Radiat. Res, 31, 372, 1937.