

УДК 616.379.577.16.1.3+577.15

АНТИОКСИДАНТНАЯ РЕГУЛЯЦИЯ АКТИВНОСТИ ФЕРМЕНТОВ
АНТИРАДИКАЛЬНОЙ ЗАЩИТЫ КЛЕТКИ ПРИ
АЛЛОКСАНОВОМ ДИАБЕТЕ

В. Г. МХИТАРЯН, Д. М. ГЕВОРКЯН, Г. В. СЕМЕРДЖЯН, Л. В. МХИТАРЯН

Изучена активность глюкозо-6-фосфатдегидрогеназы, супероксиддисмутазы, глутатионпероксидазы и глутатионредуктазы в мозге, печени и сердце у крыс при диабете. Установлено угнетение активности всех указанных ферментов, особенно активности Г-6-фосфатдегидрогеназы в мозге и сердце. Внутривнутрибрюшинное введение α -токоферола, диалудина и хлористого цинка в различной степени нормализует активность ферментов в зависимости от органа, фермента и введенного антиоксиданта.

Ключевые слова аллоксановый диабет, глюкозо-6-фосфатдегидрогеназа, α -токоферол, диалудин, хлористый цинк.

Аллоксановый диабет как модель для исследования метаболических процессов способствует выяснению патогенетических механизмов сахарного диабета. Многочисленные биохимические исследования выполнены на аллоксандиабетических животных. Однако интимные биохимические механизмы этой патологии во многом еще не раскрыты.

Одни авторы приписывают диабетогенное действие аллоксана его способности связывать SH-группы глутатиона, белков и угнетать активность целого ряда тиоловых ферментов, другие же — способности специфически связываться с β -клетками поджелудочной железы и повреждать их мембраны [2].

В опытах Кадота [15] введение 8-оксихинолина, имеющего химическое сродство к цинку и образующего с ним нерастворимый комплекс, вызывало у кроликов диабет.

Маске и др. [17] показали, что диабетогенное действие аллоксана обусловлено блокированием цинка в островках панкреатической железы с образованием аллоксаната цинка, разрушающего β -клетки. Это подтверждается снижением содержания цинка в β -клетках островков при аллоксановом диабете.

Ранее нами впервые было показано, что развитие данной патологии сопровождается снижением содержания витамина Е и избыточной липидной пероксидацией [6]. Позже появляются данные о роли свободных радикалов в патогенезе аллоксанового диабета [20]. Аллоксан, поселяясь в организме в диалуровую кислоту, продуцирует в избытке высокоактивные супероксиданион и $\cdot\text{OH}$ радикалы, которые будучи агрессивными, повреждают мембраны β -клеток [9].

На основании большого фактического материала мы пришли к заключению, что аллоксан, будучи сильным окислителем, инициирует в организме процесс пероксидации, в том числе окисление тиоловых

групп, ненасыщенных липидов и фосфатидов, а также легко окисляемых биоактивных соединений, таких как витамины А, Е, С и т. п.

Указанные метаболические сдвиги, и особенно окисление ненасыщенных липидов приводит к избыточному образованию перекисей и свободных радикалов, которые вызывают деструкцию биомембран и играют немаловажную роль в патогенезе аллоксанового диабета.

Сказанным была продиктована необходимость изучения активности ферментов антирадикальной защиты клетки у аллоксандиабетических крыс с применением антиоксидантов и ионов цинка.

Материал и методика. Исследования проводили на беспородных крысах массой 150—200 г. Диабет вызвали внутрибрюшинным введением аллоксана (Sigma, США) из расчета 14—15 мг/100 г массы животного после 18-часового голодания. О развитии диабета судили по уровню глюкозы в крови, определяемой орто-толуидиновым методом. Раствор витамина Е и дилудина (этидин) готовили на Твин-80 (Ferah, ФРГ) и вводили внутрибрюшинно из расчета 0,1 и 1,0 мг/100 г массы тела соответственно за 18 ч до и спустя двое суток после введения аллоксана. Раствор хлористого цинка готовили на дистиллированной воде и вводили внутрибрюшинно из расчета 0,1 мг/100 г массы животного в те же сроки.

Крыс забивали на 5-е сутки опыта. Активность ферментов определяли в гомогенизатах мозга, печени и сердца: глюкозо-6-фосфатдегидрогеназы (Г-6-ФДГ)—по методу Глок и Маклин [14], супероксиддисмутазы—по методу Моримитсу и др. [18], глутатионпероксидазы (ГлП) и глутатионредуктазы (ГлР)—по Пинто и Бартали [19]. Белок определяли по Лоури и др. [16].

Полученные данные обобщены, статистически обработаны и приведены в соответствующих таблицах.

Результаты и обсуждение. Как видно из приведенных данных, у подопытных крыс в мозге, печени и сердце активность всех вышеуказанных ферментов подавлена, особенно Г-6-ФДГ (96,7% в сердце и 77% в мозге). Активность остальных ферментов, в частности ГлП и ГлР, снижена несколько меньше и неравномерно (5,1—53,9%). Что касается СОД, то она подавлена в этих же органах сравнительно равномерно, приблизительно на 30—37%.

Низкая активность СОД согласуется с интенсификацией процесса ПОЛ у аллоксандиабетических крыс, что установлено в одной из наших работ [6].

Выявленная взаимосвязь между активностью СОД и ПОЛ подтверждается также литературными данными. Так, показано, что избыточная липидная пероксидация угнетает активность фермента и, наоборот, подавленная активность СОД сопровождается накоплением гидроперекисей жирных кислот и вторичных продуктов ПОЛ [4].

Работами Фридовича [13], Наибандяна и сотр. [8] показано, что СОД—металлсодержащий фермент, и для его активности существенное значение имеют ионы меди и цинка, а также тиоловые группы фермента.

Обобщая все сказанное, мы были вправе допустить, что низкая активность СОД при аллоксановом диабете обусловлена, с одной стороны, низким содержанием цинка в организме, а с другой,—окислением тиоловых групп апофермента липидными перекисями и изменением валентности меди в активном центре фермента.

В энзимном ансамбле антирадикальной защиты клеток важная роль принадлежит активности ГлР, которая, как известно, катализирует

восстановление окисленного глутатиона. Как видно из приведенных данных, ее активность в мозге и печени подавлена сравнительно меньше, чем активность остальных ферментов. В сердце она подавлена довольно заметно (37%).

Другое звено в цепи антирадикальной защиты представлено группой пероксидаз, в том числе ГлП, реализующей поток атомов водорода, обезвреживающих перекиси. Как видно из приведенных данных, пероксидазная активность подавлена в печени на 60%, а в сердце и мозге—соответственно на 28 и 20% (табл.).

Таблица 1

Активность Г-6-Ф-дегидрогеназы, СОД, глутатионпероксидазы и пероксидазы
у интактных и диабетических крыс в мозге

Условия опыта	Г-6-Ф-дегидрогеназа, мкмоль НАДРН/мг белка	СОД, ед. актив. /мг белка	Глутатионпероксидаза, мкмоль SH-групп./мг белка	Глутатионпероксидаза, мкмоль НАДРН/мг белка
Интактные крысы	0,016±0,006 (n=8)	10,04±0,12 (n=11)	1,53±0,182 (n=9)	0,027±0,009 (n=9)
Аллоксандиабетические	0,00367±0,0059 n=8 P<0,001	6,32±0,062 n=11 P<0,05	1,23±0,03 n=8 P<0,001	0,022±0,007 n=9 P<0,001
Аллоксандиабетические + α-токоферол	0,0203±0,02 n=5 P>0,05	6,65±0,019 n=11 P<0,002	1,45±0,03 n=8 P>0,5	0,029±0,01 n=9 P<0,05
Аллоксандиабетические + ZnCl ₂	0,0183±0,0045 n=8 P<0,05	7,5±0,041 n=11 P<0,002	1,52±0,05 n=8 P>0,1	0,024±0,01 n=9 P<0,05
Аллоксандиабетические + дикудин	0,0149±0,005 n=8 P<0,02	7,0±0,05 n=10 P<0,05	1,64±0,02 n=8 P>0,1	0,023±0,006 n=9 P<0,05

Источником водорода в антирадикальной цепи является фонд НАДРН, пополняемый в реакциях пентозного цикла. Факторы, способствующие опустошению фондов НАДРН, определяют падение активности антиоксидантной системы и вспыхивание свободнорадикального окисления. Среди этих причин немаловажное место занимает дефицит экзогенных доноров водорода: α-токоферола, аскорбината, биофлавоноидов, а также факторов, непосредственно усиливающих свободнорадикальное окисление (СРО) [3].

При интерпретации полученных данных в цепи этих реакций определенный интерес представляет активность Г-6-ФДГ, которая, как видно из данных таблиц, была подавлена особенно сильно в мозге и несколько слабее в сердце и печени. Это привело к снижению активности остальных перечисленных ферментов, составившему, в зависимости от органа, 5—60%.

Таким образом, одной из причин низкой активности ферментов при аллоксановом диабете у крыс, возможно, является низкий уровень НАДРН, обусловленный угнетением активности ферментов пентозного цикла.

Обобщая полученные данные, можно констатировать, что при диабете у крыс сдвиги в активности ферментов, хотя и носят односторонний характер, однако значительно расходятся по степени выраженности.

Поскольку при аллоксановом диабете усилена липидная пероксидация и имеется дефицит витамина Е [6, 7], мы задались целью исследовать влияние антиоксидантов на ферменты антирадикальной защиты клетки.

Таблица 2

Активность Г-6-Ф-дегидрогеназы, СОД, глутатионпероксидазы и глутатион-S-трансферазы у интактных и аллоксандиабетических крыс в печени

Условия опыта	Г-6-Ф-дегидрогеназа, мкмоль НАДРН/мг белка	СОД, ед. актив./мг белка	Глутатионпероксидаза, мкмоль SH-глут./мг белка	Глутатион-S-трансфераза, мкмоль НАДРН/мг белка
Интактные крысы	0.018±0.0097 n=10	23.78±0.041 n=12	3.29±0.057 n=8	0.045±0.001 n=9
Аллоксандиабетические	0.0148±0.02 n=5 P<0.001	16.69±0.032 n=12 P<0.001	1.32±0.058 n=8 P<0.001	0.038±0.002 n=9 P<0.001
Аллоксандиабетические + α-токоферол	0.0269±0.0065 n=8 P<0.05	21.73±0.058 n=12 P>0.1	2.52±0.072 n=8 P<0.001	0.043±0.07 n=9 P<0.05
Аллоксандиабетические + ZnCl ₂	0.0345±0.00 n=10 P>0.5	20.73±0.058 n=12 P>0.5	2.73±0.08 n=8 P>0.5	0.0649±0.03 n=9 P<0.001
Аллоксандиабетические + дилудин	0.0251±0.0081 n=7 P<0.001	19.5±0.09 n=10 P<0.05	3.35±0.08 n=8 P>0.5	0.045±0.06 n=9 P>0.5

Кроме витамина Е, дефицит которого нарушает липид-липидные и липид-белковые взаимоотношения в биомембранах и вызывает изменение их проницаемости, исследовали также влияние антиоксиданта дилудина, синтезированного в Институте органического синтеза АН Латв.ССР [5]. Помимо названных антиоксидантов, исследовалось также влияние ионов цинка, дефицит которого установлен при сахарном диабете [10] и стрессе [11, 12], на процесс липидной пероксидации. Вовлечение цинка в сферу этих исследований обусловлено также тем, что он, по нашим данным, угнетает ПОЛ [7], возможно, инициируя синтез инсулина [1, 17].

Общим для антиоксидантов оказалась односторонненность их действия на активность ферментов у аллоксандиабетических крыс.

Как видно из приведенных данных, введение α-токоферола, дилудина и ионов цинка резко повышает у диабетических крыс активность Г-6-ФДГ в мозге, причем под влиянием α-токоферола и ионов цинка активность Г-6-ФДГ устанавливается на более высоком, по сравнению с контролем, уровне (табл. 1). α-Токоферол, ионы цинка и дилудин довольно заметно повышают активность этого фермента также в сердце и печени, которая составляет 237, 300 и 256% и 181, 233 и 170% соответственно.

Любопытно, что антиоксиданты активируют СОД в мозге у диабетических крыс несколько слабее, чем в печени и сердце.

Из данных тех же таблиц видно, что введение антиоксидантов заметно нормализует активность ГлП, причем в печени она выражена значительно сильнее, чем в мозге и сердце. Так, α -токоферол, ионы цинка и дилудин повышают ее активность у диабетических крыс на 190, 206 и 284% соответственно.

Таблица 3

Активность Г-6-Ф-дегидрогеназы, СОД, глутатионпероксидазы и глутатионредуктазы у интактных и аллоксандиабетических крыс в сердце

Условия опыта	Г-6-Ф-дегидрогеназа, мкмоль НАДН/мг белка	СОД, ед. актив./мг белка	Глутатионпероксидаза, мкмоль SH-глут./мг белка	Глутатионредуктаза, мкмоль НАДФН/мг белка
Интактные крысы	0.0167 $\pm$ 0.0073 n=7	10.24 $\pm$ 0.09 n=10	0.278 $\pm$ 0.006 n=10	0.027 $\pm$ 0.0016 n=10
Аллоксандиабетические	0.0084 $\pm$ 0.004 n=8 P<0.001	7.07 $\pm$ 0.12 n=10 P<0.001	0.20 $\pm$ 0.003 n=10 P<0.001	0.017 $\pm$ 0.0013 n=10 P<0.001
Аллоксандиабетические + α -токоферол	0.0152 $\pm$ 0.0014 n=10 P<0.02	12.26 $\pm$ 0.14 n=10 P<0.001	0.251 $\pm$ 0.002 n=10 P<0.05	0.043 $\pm$ 0.0012 n=10 P<0.05
Аллоксандиабетические + ZnCl ₂	0.0192 $\pm$ 0.0086 n=7 P<0.05	9.7 $\pm$ 0.1 n=10 P<0.05	0.27 $\pm$ 0.005 n=7 P>0.5	0.025 $\pm$ 0.002 n=10 P>0.5
Аллоксандиабетические + дилудин	0.0164 $\pm$ 0.0068 n=7 P<0.05	13.3 $\pm$ 0.03 n=10 P<0.05	0.284 $\pm$ 0.004 n=6 P>0.5	0.028 $\pm$ 0.0017 n=8 P>0.5

Не меньший интерес представляют данные о влиянии этих же антиоксидантов на активность ГлР.

Как видно из приведенных данных, у диабетических крыс исследуемые нами антиоксиданты восстанавливают активность фермента в различных органах с неодинаковой интенсивностью.

Таким образом, несмотря на некоторый разброс данных, активность ферментов под влиянием антиоксидантов нормализуется, хотя и в различной степени.

Обобщая весь фактический материал, можно с уверенностью сказать, что антиоксиданты α -токоферол, дилудин, а также ионы цинка повышают активность ферментов антирадикальной защиты клетки и оказывают благотворное влияние на течение диабета у крыс.

Полученные данные, на наш взгляд, представляют определенный практический интерес, однако для окончательного решения этого вопроса необходимы дополнительные экспериментальные и клинические исследования.

Ереванский медицинский институт,
кафедра биохимии

Поступило 15.X 1981 г.

Վ. Գ. ՄԽԻՏԱՐԻԱՆ, Գ. Մ. ԳԵՎՈՐԿԻԱՆ, Լ. Վ. ՍԵՄԵՐԴԻԱՆ, Լ. Վ. ՄԽԻՏԱՐԻԱՆ

Ալոքսանային դիաբետով հիվանդ առնետների ուղեղում, լյարդում և սրտամկանում ուսումնասիրվել է գլյուկոզա-6-ֆոսֆատդեհիդրոգենազայի սուպերօքսիդդիսմուտազայի, գլյուտաթիոնդերօքսիդազայի և գլյուտաթիոն ռեդուկտազայի ակտիվությունը: Ցույց է տրվել, որ ալոքսանային դիաբետով հիվանդ առնետների մոտ վերահիշյալ ֆերմենտների ակտիվությունը խիստ արգելակված է, մասնավորապես գլյուկոզա-6-ֆոսֆատդեհիդրոգենազայի ակտիվությունը ուղեղում և սրտամկանում (համապատասխանաբար՝ 77 և 65%):

Հակաօքսիդանտների՝ α -տոկոֆերոլի, դիլուդինի և ջինկլյուրբիդի ներորոգվանային ներարկումը բարձրացնում է ֆերմենտների ակտիվությունը, ընդ որում կարգավորման աստիճանը պայմանավորված է հետազոտվող ֆերմենտի, արգտնի և հակաօքսիդանտների տեսակով:

ANTIOXIDANT REGULATION OF THE ENZYMES ACTIVITY OF CELL ANTIRADICAL DEFENCE DURING ALLOXANE DIABETES

V. G. MCHITARIAN, D. M. GEVORKIAN, L. V. SEMERDIAN,
L. V. MCHITARIAN

The activities of the glucose-6-phosphate dehydrogenase, superoxid-dismutase, glutathione peroxidase and glutathionereductase have been studied in the brain, liver and heart of intact and diabetic rats. The diabetes decreases the activity of the above mentioned enzymes, especially the activity of the glucose-6-phosphate dehydrogenase in the brain and heart. The α -tocopherol diludine and zinc chloride intraperitoneal injections normalize these enzymes activities, depending on the organ, enzyme and injected antioxidant.

Л И Т Е Р А Т У Р А

1. Ариратян Э. А., Мхитарян В. Г. Биолог. ж. Армении, 35, 1, 21, 1982.
2. Баранов В. Г., Соколоверова И. М., Гаспарян Э. Г. и др. В кн.: Экспериментальный сахарный диабет, 39, М., 1983.
3. Геворкян Д. М., Мхитарян В. Г., Мхитарян Л. В., Семерджян Л. В., Биолог. ж. Армении, 36, 4, 270—275, 1983.
4. Геворкян Д. М., Мхитарян В. Г. Тез. конф. по пробл. физ.-хим. биолог. и биотехн. в медицине, 26, Ереван, 1984.
5. Дубир Г. Я., Велена А. Х., Рубеш Д. Я. и др. В кн.: Биофизич. и физико-химич. исследования в витаминологии, 35—37, М., 1981.
6. Мхитарян В. Г., Геворкян Д. М. Биолог. ж. Армении, 33, 6, 614, 1980.
7. Мхитарян В. Г., Геворкян Д. М. Биолог. ж. Армении, 34, 8, 783, 1981.
8. Симонян М. А., Налбандян Р. М. Биохимия, 40, 3, 404, 1975.
9. Хенриксен Т., Мело Т., Заксебоя Г. В. В кн.: Свободные радикалы в биологии, 2, 235—283, М., 1979.
10. Hagglöf B., Hattmans G., Holmgren G., Ludvigsson J. Acta endocrinol., 88, 219, 42, 1978.
11. Hooze C., Garder M., Pucheault J., Ferradint C. Bull. europ. Physiol. resp., 17 (suppl.), 43—48, 1981.

12. Flos R., Ballash J. *Angressologia*, 18, 1, 47—53, 1977.
13. Fridovich J. *Science*, 201, 4359, 875—880, 1978.
14. Glock G. E., McLean P. *Biochem. J.*, 39, 140, 1960.
15. Kadota I. *J. Lab. Clin. Med.*, 33, 8, 568—591, 1950.
16. Lowry O. H., Rosenbrough N. I., Farr A. L. et al. *J. Biol. Chem.*, 193, 256, 1951.
17. Maske H. *Diabetes*, 6, 335—340, 1957.
18. Morimitsu Nishikimi, Appaji N. Rao, Kunio Yagi *Biochim. Biophys. Commun.*, 40, 2, 849—854, 1972.
19. Pinto R. L., Bartley W. *Biochem. J.*, 112, 109, 1969.
20. Sato Y., Hotta M., Sakamoto N., Matsuoka S., Ohishti N., Yagi K. *Biochem. Med.*, 21, 104—107, 1979.

«Биолог. ж. Армении», т. XXXVIII, № 9, 1985

УДК 577.155.2

СРАВНЕНИЕ АКТИВНОСТИ ДНК-ТОПОИЗОМЕРАЗЫ I ЭМБРИОНОВ ДИКОГО ВИДА *DROSOPHILA SIMULANS* И МУТАНТНОЙ ЛИНИИ

К. Ж. АКОПЯН

Изучена активность топоизомеразы I из дикого вида дрозофилы *Dr. simulans* и производной от него мутантной линии мух с повышенной нестабильностью (*Dr. simulans vermillion*), выражающейся в высоком уровне рекомбинантных событий. Показано, что активность топоизомеразы I у 4—5-часовых эмбрионов мутантной линии примерно вдвое выше, чем у эмбрионов дикого вида той же стадии развития.

Ключевые слова: ДНК-топоизомераза, дрозофила.

Бурное развитие исследований в области молекулярной биологии, генной инженерии обусловило необходимость активного изучения ферментов, обслуживающих основные генетические процессы в клетке. К числу достаточно полно исследованных ферментов относятся рестрикционные эндонуклеазы, ДНК-полимеразы, РНК-полимеразы и др. Однако большая группа ферментов метаболизма нуклеиновых кислот пока изучена явно недостаточно как в отношении структуры, так и функциональной значимости. К числу этих ферментов относятся ДНК-топоизомеразы.

Задачей настоящей работы было сравнительное изучение активности топоизомеразы I из дикого вида дрозофилы (*Dr. simulans*) и производной от него мутантной линии мух с повышенной нестабильностью (*Drosophila simulans vermillion*), выражающейся в высоком уровне рекомбинантных событий.

Материал и методика. В работе использованы эмбрионы диких линий *Dr. simulans*, *Dr. melanogaster* и мутантной линии *Dr. simulans vermillion*, характеризующихся высоким уровнем соматического и мейотического кроссинговера. Обе линии *Dr. simulans* получены от Г. М. Ховановой (ИМГ АН СССР). Выделение суперспирализованной плазмидной ДНК pBR 322 осуществляли кислотофенольным методом с последую-