

В. Г. МХИТАРЯН, Л. М. МЕЖЛУМЯН

УРОКАНИНАЗНАЯ И ГИСТИДАЗНАЯ АКТИВНОСТЬ В КРОВИ И ПЕЧЕНИ ПРИ ХРОНИЧЕСКОМ ХЛОРОПРЕНОВОМ ОТРАВЛЕНИИ И ПОД ВЛИЯНИЕМ ПЕРОКСИДИРОВАННЫХ НЕНАСЫЩЕННЫХ ЖИРНЫХ КИСЛОТ

Внутрибрюшинное введение хлоропрена вызывает у крыс снижение гистидазной и уроканиназной активности в печени и перемещение этих ферментов в русло крови. Подобные сдвиги наблюдаются и при внутрибрюшинном введении олеиновой и линолевой кислот, причем вследствие перекисидации их токсичность повышается.

Показано, что уроканиназа и гистидаза перемещаются из печени в русло крови не одновременно, гистидаза появляется раньше и имеет более высокую активность. Установлено определенное несоответствие степени изменений активности печеночной и сывороточной гистидазы и уроканиназы как при хлоропреновом отравлении, так и под влиянием липидных перекисей. Отмечается значительное снижение гистидазной и уроканиназной активности в печени и сравнительно низкая их активность в русле крови.

Многочисленные исследования, посвященные биохимическим вопросам хлоропренового токсикоза, позволили нам прийти к заключению, что токсическое действие хлоропрена на организм обусловлено его агрессивными перекисями.

Установлено, что биохимические сдвиги, физиологические и морфологические изменения, наблюдаемые при хлоропреновой интоксикации, во многом аналогичны картине лучевого поражения. На основании большого фактического материала хлоропрен был причислен к радиомиметикам [9]. Филпоту и др. [12], Ю. Б. Кудряшову и др. [5] удалось путем внутрибрюшинного введения липидных перекисей вызвать у животных заболевание, сходное с лучевым поражением.

Многочисленные литературные данные свидетельствуют, что при радиационных поражениях, как и при хлоропреновой интоксикации, печеночная паренхима проявляет высокую чувствительность и подвергается значительным изменениям. По данным Н. О. Аветисян [1], у рабочих, занятых на производстве хлоропренового каучука, поражение печени составляет большой процент. Однако степень повреждения печеночной паренхимы при различных сроках хлоропренового отравления изучена далеко недостаточно.

Этот вопрос, имеющий важное практическое значение, мы нашли возможным разрешить путем эксперимента.

Наряду с хлоропреном мы изучали также влияние перекисидированных олеиновой и линолевой кислот. Это было вызвано тем, что

токсическое действие хлоропрена на организм обусловлено перекисным механизмом.

Известно, что у интактных крыс уроканиназы и гистидазы в крови отсутствуют и появляются лишь при поражении печеночной паренхимы вследствие их миграции из печени в кровь. По данным З. А. Горкиной и Т. В. Блиновой [4], уроканиназу можно обнаружить в сыворотке крови уже на ранних стадиях развития гепатита. В работе Т. В. Блиновой [3] показано, что с развитием патологического процесса в печени активность уроканиназы в сыворотке крови повышается. Таким образом, было установлено определенное соответствие между уроканиназной активностью крови и степенью поражения печеночной паренхимы.

Исследования проводили на половозрелых белых беспородных крысах весом 200—250 г, содержавшихся на обычной диете. Опыты с хлоропреном выполнены на 40 крысах, которым ежедневно вводили внутривентриально хлоропрен на карбоксиметилцеллюлозе в количестве 600 мкмоль на 100 г веса животного.

Активность ферментов определяли одновременно в сыворотке крови и в гомогенате печени по методу Тейбора и Меллера в модификации С. Р. Мардашева и В. А. Буробина [7, 8]. Активность ферментов в печени и в крови изучали в динамике после 7-, 14-, 30-, 45- и 60-дневных затравок и выражали ее в условных единицах. Уроканиназную и гистидазную активность в крови выражали в микромольях разложившейся (для уроканиназы) и образовавшейся (для гистидазы) уроканиновой кислоты $\times 10^2$ при одночасовой инкубации в расчете на 1 мл сыворотки крови, а для печени—в мкмольях на 1 г сырого веса/час в пересчете на 100 г веса животных.

Опыты с ненасыщенными жирными кислотами (олеиновой и линолевой) были поставлены в двух сериях. Одна серия выполнялась с предварительно перекисидированными кислотами путем их нагревания на водной бане (60°) и продувания воздухом. Перекисный кислород составлял для обеих кислот по 300 мкмоль.

Другая серия опытов производилась с неперекисидированными кислотами, причем перекисное число олеиновой и линолевой кислот равнялось нулю. Жирные кислоты вводили животным также внутривентриально в количестве 0,1 мл на 150 г веса. Активность ферментов определяли через сутки и после 7- и 14-дневных затравок.

Полученные данные свидетельствуют, что у контрольных крыс в печени гистидазная и уроканиназная активность колеблется в значительных пределах, особенно гистидазная, что, возможно, зависит от времени года. В связи с этим мы были вынуждены иметь для каждой серии опытов свою контрольную группу.

Весь полученный материал обобщен в таблицах и подвергнут статистической обработке.

Опыты с хлоропреном показали, что у крыс после первых семи суток затравки гистидаза в печени снижается, однако ее активность в крови все еще нулевая (табл. 1). Начиная с 14-го дня затравки гисти-

даза и уроканиназа в печени значительно снижаются (на 28 и 24% соответственно), появляясь в крови. С удлинением сроков затравки происходит их дальнейшее снижение в печени и значительное повышение

Таблица 1
Уроканиназная и гистидазная активность в печени и крови у крыс
при хлоропреновой интоксикации

Сроки затравки в днях	Печень (в мкмоль/г/час на 100 г веса животного)				Кровь (в условных единицах)	
	гистидаза	% торможе- ния	уроканиназа	% торможе- ния	гистидаза	уроканиназа
Контроль	9,52±0,18 (n=20)	—	10,07±0,19 (n=20)	—	0	0
1-й	8,87±0,5 (n=6)	6,9	9,92±0,3 (n=6)	—	0	0
7-й	8,12±0,34 (n=7) p<0,01	14,7	11,16±0,57 (n=6)	повышен. 11,6	0	0
14-й	6,8±0,4 (n=8) p<0,001	28,6	7,6±0,09 (n=8) p<0,001	24,0	0,35	0,1
30-й	5,6±0,27 (n=6) p<0,001	41,2	8,7±0,34 (n=7) p<0,01	13,0	0,87	0,42
45-й	5,4±0,28 (n=6) p<0,001	43,3	6,26±0,24 (n=6) p<0,01	37,4	1,4	1,15
60-й	6,1±0,4 (n=7) p<0,001	36,0	8,5±0,16 (n=7) p<0,001	15,0	2,80	2,4

ние в крови. Так, на 30-й день затравки гистидазная активность в печени составляет 5,6 ед., т. е. ниже контроля на 41,2%, в то время как уроканиназная активность составляет 8,7 ед. и ниже контроля всего лишь на 13%. На 45-й день затравки активность обоих ферментов в печени ниже контроля (гистидазы на 43,3, уроканиназы на 37,4%). У этой группы крыс гистидазная и уроканиназная активность в крови составляла 1,4 и 1,15 ед. соответственно. Интересно, что на 60-й день затравки у крыс в печени активность ферментов, особенно уроканиназы, повышается, однако все еще остается ниже контроля на 36% (гистидаза) и на 15% (уроканиназа). Весьма важно, что у этой группы крыс уроканиназная и гистидазная активность в крови оказалась наиболее высокой и достигала 2,80 и 2,4 ед. соответственно.

Полученные данные свидетельствуют о том, что под действием хлоропрена уже на 14-й день затравки (в условиях нашего эксперимента) происходит некоторое повреждение печеночной паренхимы крыс, которое значительно усиливается в дальнейшие сроки затравки.

Мы считаем, что причиной повреждения печеночной паренхимы при хлоропреновой интоксикации являются перекиси хлоропрена, которые удерживаются в печени и инициируют образование липидных пе-

рекисей. Последние разрушают биоантиоксиданты и усиливают пероксидацию фосфолипидов мембран, вызывая тем самым их деструкцию. Это подтверждается также данными В. Г. Партешко [10], которые показывают, что накопление перекисных соединений в печени вызывает деструктивные изменения микроструктуры печени. Печень теряет способность с достаточной скоростью обезвреживать постоянно поступающие липидные перекиси, что приводит к извращению нормальных окислительных процессов в печени с последующим разрушением клеточных структур. В пользу вышесказанного говорят также исследования А. Г. Аллавердяна [2], которые позволили ему прийти к заключению, что при хронической хлоропреновой интоксикации как у людей, так и в эксперименте развиваются тяжелые поражения печеночной паренхимы.

Таким образом, полученные данные дают нам право считать, что при хлоропреновой интоксикации определение активности урокиназазы и гистидазы в крови позволяет выявлять ранние сроки повреждения печени у рабочих, занятых на производстве хлоропренового каучука, и проводить соответствующие лечебно-профилактические мероприятия.

Второй раздел работы посвящен изучению действия перекисированных и неперекисированных ненасыщенных жирных кислот. Некоторые физико-химические показатели олеиновой и линолевой кислот приведены в начале статьи.

Данные о влиянии неперекисированной олеиновой кислоты приведены в табл. 2. Как видно из этих данных, олеиновая кислота в количестве 0,1 мл на 150 г веса животного при внутрибрюшинном введении не вызывает до 60-дневной затравки существенных сдвигов в активности урокиназазы и гистидазы как в печени, так и в крови. Снижение их активности в печени и весьма слабое проявление этих ферментов в крови наблюдается лишь на 60-й день.

Сравнительно иначе проявляется действие олеиновой кислоты после перекисации. Как видно из данных табл. 3, уже на 7-й день после затравки крыс в печени значительно снижается как гистидазная, так и урокиназная активность, которая составляет в среднем 6,2 и 7,3 ед. соответственно, что ниже контроля на 35,2 и 35,6%. В эти сроки у крыс в крови гистидазная активность составляла 0,2 ед., а урокиназная — 0,3 ед.

Удлинение сроков затравки до 14 дней приводит к резкому снижению гистидазной активности в печени на 52,2%, причем ее активность в крови хотя и повышается, однако сравнительно меньше (0,62 ед.). Подобные сдвиги найдены и в отношении урокиназной активности. Как видно из данных этой же таблицы, урокиназная активность в печени составляет 5,9 ед., что ниже контроля на 45,8%.

Более заметные сдвиги в активности урокиназазы и гистидазы в печени наблюдаются под влиянием линолевой кислоты. Как видно из данных табл. 4, у крыс уже через сутки после внутрибрюшинного введения неперекисированной линолевой кислоты активность гистидазы снижается в печени на 2,3%, а урокиназазы — на 6,4%. В этот срок их активность в крови все еще нулевая.

Таблица 2

Влияние перексидированной олеиновой кислоты на урокаиназную и гистидазную активность в печени и крови белых крыс

Сроки затравки в днях	Печень (в мкмоль/г/час на 100 г веса животного)				Кровь (в условных единицах)	
	гистидаза	% торможе- ния	урокаиназа	% торможе- ния	гистидаза	урокаиназа
Контроль	7,63±0,2 (n=13)	—	9,3±0,24 (n=13)	—	0	0
1-й	7,7±0,16 (n=7)	—	9,0±0,15 (n=7)	—	0	0
7-й	8,44±0,2 (n=6)	—	9,4±0,27 (n=6)	—	0	0
14-й	6,7±0,22 (n=6) p<0,01	12,2	8,7±0,17 (n=6)	6,5	0	0
60-й	6,4±0,45 (n=7) p<0,02	16,2	7,2±0,4 (n=7) p<0,001	22,6	0,16	0,17

Таблица 3

Влияние перексидированной олеиновой кислоты на урокаиназную и гистидазную активность в печени и крови у белых крыс

Сроки затравки в днях	Печень (мкмоль/г/час на 100 г веса животного)				Кровь (в условных единицах)	
	гистидаза	% торможе- ния	урокаиназа	% торможе- ния	гистидаза	урокаиназа
Контроль	9,56±0,17 (n=7)	—	10,87±0,3 (n=7)	—	0	0
1-й	9,48±0,2 (n=6)	—	11,1±0,31 (n=6)	—	0	0
7-й	6,2±0,5 (n=6) p<0,001	35,2	7,3±0,78 (n=6) p<0,02	35,6	0,2	0,3
14-й	4,1±0,62 (n=7) p<0,001	52,2	5,9±0,53 (n=7) p<0,001	45,8	0,62	0,62

Любопытно, что на 7-й день после ежедневного введения линолевой кислоты в отличие от олеиновой (табл. 2) происходит дальнейшее снижение урокаиназной и гистидазной активности в печени с выходом обоих ферментов в кровь.

Следует отметить также, что хотя и активность гистидазы в печени при хлоропреновой интоксикации на 7-й день затравки понижена в этих же пределах, однако перемещения фермента из печени в русло крови не наблюдается (табл. 1).

Заслуживают внимания результаты 14-дневной затравки. Как вид-

Таблица 4

Уроканиназная и гистидазная активность в печени и крови у крыс
под влиянием непероксидированной линолевой кислоты

Сроки затравки в днях	Печень (мкмоль/г/час на 100 г веса животного)				Кровь (в условных единицах)	
	гистидаза	% торможе- ния	уроканиназа	% торможе- ния	гистидаза	уроканиназа
Контроль	$7,88 \pm 0,28$ (n=11)	—	$9,4 \pm 0,23$ (n=11)	—	0	0
1-й	$7,70 \pm 0,30$ (n=7)	2,3	$8,8 \pm 0,1$ (n=7) $p < 0,05$	6,4	0	0
7-й	$6,4 \pm 0,17$ (n=7) $p < 0,001$	18,6	$8,3 \pm 0,15$ (n=7) $p = 0,001$	11,7	0,34	0,2
14-й	$8,6 \pm 0,28$ (n=7)	повышена 5%	$9,3 \pm 0,14$ (n=7)	—	0,3	0,2

но из табл. 4, в этот срок в печени активность уроканиназы повышается и почти достигает нормы, а гистидазная даже превышает контроль, между тем как их активность в крови продолжает оставаться в пределах 0,2—0,3 ед.

В результате пероксидации значительно повышается токсичность линолевой кислоты (табл. 5). Так, через 24 часа после ее введения активность гистидазы в печени снижается на 16%, а уроканиназы — на 4,2%. Удлинение сроков затравки до семи дней вызывает особенно резкое снижение гистидазной активности в печени (47%) и повышение ее активности в крови (0,63 ед.).

Таблица 5

Уроканиназная и гистидазная активность в печени и крови у крыс
под влиянием пероксидированной линолевой кислоты

Сроки затравки в днях	Печень (мкмоль/г/час на 100 г веса животного)				Кровь (в условных единицах)	
	гистидаза	% торможе- ния	уроканиназа	% торможе- ния	гистидаза	уроканиназа
Контроль	$8,1 \pm 0,38$ (n=11)		$10,4 \pm 0,17$ (n=11)		0	0
1-й	$6,8 \pm 0,25$ (n=7)	16,0	$9,97 \pm 0,06$ (n=7) $p < 0,05$	4,2	0	0
7-й	$4,3 \pm 0,13$ (n=6) $p < 0,001$	47,0	$9,1 \pm 0,25$ (n=6) $p < 0,001$	12,5	0,63	0,2
14-й	$4,46 \pm 0,73$ (n=6) $p < 0,001$	45,0	$9,2 \pm 0,05$ (n=6) $p < 0,001$	11,6	0,8	0,4

Что же касается уроканиназной активности, то она в печени снижается сравнительно слабее и ниже контроля лишь на 12,5%. У этих крыс уроканиназная активность в крови продолжает все еще оставаться нулевой.

Примечательно, что на 14-й день затравки, хотя дальнейшего снижения гистидазной и уроканиназной активности в печени не наблюдалось, однако их активность в крови продолжает повышаться, достигая 0,8 ед. для гистидазы и 0,4 ед. для уроканиназы.

Все вышесказанное говорит о том, что линолевая кислота вследствие перекисидации в организме повреждает цитомембраны сильнее, чем олеиновая кислота, причем разница в их действии более выражена в опытах с предварительно перекисидованными кислотами с одинаковыми перекисными числами.

На основании полученных данных мы рекомендуем взамен уроканиназной активности определять гистидазную активность крови, как наиболее чувствительную пробу для выявления ранних сроков повреждения печеночной паренхимы. Такое неодинаковое перемещение органоспецифических ферментов — уроканиназы и гистидазы — из печени в русло крови, видимо, обусловлено объемом их молекул, т. е. их молекулярной массой, их различной локализацией внутри клетки, а также связью этих ферментов с мембранами, которая может быть рыхлой или прочной.

Как известно, перемещение ферментов в русло крови из паренхиматозных органов имеет место либо вследствие повышения проницаемости клеточных мембран или скорее всего в результате альтернации клеток.

Патоморфологическое и электронномикроскопическое изучение печени крыс при хлоропреновом токсикозе А. Г. Аллавердяном [1], И. А. Манукян [6] свидетельствует, что при хронической хлоропреновой интоксикации происходит сложный прогрессирующий деструктивный процесс. По данным И. А. Манукян [6], ранние изменения ультраструктуры печени при острой хлоропреновой интоксикации характеризуются набуханием митохондрии гепатоцитов с резким просветлением матрикса и уменьшением крист. По ее данным, наиболее ранним изменением в гепатоцитах является вакуолизация цитоплазмы, а также деструктивные процессы в эндоплазматической сети, в лизосомах и в других органоидах клетки. Подобные изменения обнаружены автором у крыс в печени и под действием перекисидованных ненасыщенных жирных кислот.

Известно, что избыточное образование или поступление в организм экзогенных перекисных соединений или систем, генерирующих их образование, может привести при недостаточности антиокислительных возможностей печени к интенсификации процессов окисления в фосфолипидах, в том числе и участвующих в построении плазматических мембран, вследствие чего происходит пространственная перестройка липидных молекул с изменением плотности их упаковки, что и, веро-

ятно, является причиной изменения проницаемости наружной плазматической мембраны.

Исследования Гунтера и др. [11] показали, что между действием липидных перекисей и набуханием лизосом и митохондрий имеется тесная связь, причем ингибиторы окисления ненасыщенных липидов, и особенно α -токоферол, витамин А и серотонин, эффективно препятствуют набуханию митохондрий.

Некоторое расхождение в действиях олеиновой и линолевой кислот с одинаковым перекисным числом на проницаемость плазматических мембран гепатоцитов, видимо, обусловлено их структурными особенностями, связанными с изгибами по месту двойных связей, а также конформациями этих кислот. Не исключается, что они в организме подвергаются в дальнейшем неодинаковой перекисидации и различно вовлекаются в процессы перекисидации липидного компонента клеточных мембран.

Таким образом, перекиси липидов или системы, генерирующие их образование, резко повышают проницаемость цитомембран, что в свою очередь приводит к повреждению ряда важных биохимических функций клеток.

Однотипные, но различные по интенсивности сдвиги в уроганиназной и гистидазной активности в печени и крови под влиянием хлоропрена и перекисидованных ненасыщенных жирных кислот являются новым доказательством перекисного механизма токсического действия хлоропрена на организм.

Кафедра биохимии

Ереванского медицинского института

Поступила 19/III 1973 г.

Վ. Գ. ՄԵԽԻՏԱՐՅԱՆ, Լ. Մ. ՄԵԺԼՈՒՄՅԱՆ

ՈՒՌՈՒԿԱՆԻՆԱԶԱՅԻ ԵՎ ՀԻՍՏԻՂԱԶԱՅԻ ԱԿՏԻՎՈՒԹՅՈՒՆԸ ԱՐՅԱՆ ՄԵՋ ՈՒ
ԼՅԱՐԴՈՒՄ ՔԼՈՐՈՊՐԵՆԻ ԵՐԱՐԱՏԵՎ ԹՈՒՆԱՎՈՐՈՒՄՆԵՐԻ ԵՎ
ՊԵՐՕԻԲՍԻԴԱՅՎԱԾ ԶԼԱԳԵՑԱԾ ՃԱՐՊԱԹԹՈՒՆԵՐԻ ԱԶԴԵՑՈՒԹՅԱՆ ՏԱԿ

Ա մ փ ո փ ո լ մ

Քլորոպրենի ներորովայնային ներարկման (600 մկմոլ/100 գ քաշին) 14-րդ օրը առնետների լյարդում հիստիդազայի և ուռոկանինազայի ակտիվությունն իջել է համապատասխանաբար 28 և 24%-ով: Միաժամանակ տեղի է ունեցել ֆերմենտների տեղաշարժ լյարդից դեպի արյուն, որը վկայում է հեպատոցիտների պլազմատիկ թաղանթների թափանցելիության խախտման մասին: Թունավորման հետագա շրջաններում լյարդում հիստիդազայի և ուռոկանինազայի ակտիվությունը նշանակալից չափով իջել է, իսկ արյան մեջ՝ բարձրացել: Թունավորման 60-րդ օրը առնետների արյան մեջ ուռոկանինազայի և հիստիդազայի ակտիվությունը հասել է համապատասխանաբար 2,89 և 2,4 միավորի, որը խոսում է լյարդային հյուսվածքի լուրջ վնասման մասին:

Զհագեցած ճարպաթթուների ներորոշանային ներարկումից (0,1 մլ/150 գ քաշին) առնետների լյարդում դիտվել են ուռուկանինազայի և հիստիդազայի ակտիվության փոփոխություններ, ընդ որում դիտվել է, որ նախօրոք պերօքսիդացված թթուներն ավելի թունավոր են:

Հետազոտությունների արդյունքների վերլուծությունից պարզվում է, որ հիստիդազայի ակտիվության որոշումը ավելի զգայուն մեթոդ է քան ուռուկանինազայինը:

Քլորոպրենային թունավորումների և պերօքսիդացված շհագեցած ճարպաթթուների ազդեցության տակ լյարդում ու արյան մեջ ուռուկանինազայի և հիստիդազայի ակտիվության միանման, բայց տարբեր ինտենսիվության տեղաշարժերը նոր ապացույց են քլորոպրենի թունավորման պերօքսիդային մեխանիզմի տեսության վերաբերյալ:

Л И Т Е Р А Т У Р А

1. Аветисян Н. О. Труды Ереванского мед. института, 1965, 15, стр. 301.
2. Аллавердян А. Г. Автореферат докт. дисс. Ереван, 1970.
3. Блинова Т. В. Вopr. мед. химии, 1968, XIV, 3, стр. 307.
4. Горкина З. А., Блинова Т. В. В кн.: Биохимия микробов и иммунохимия. Горький, 1966, стр. 117.
5. Кудряшов Ю. Б., Гончаренко Е. Н., Сюз Юй-хуа. Научн. доклады высшей школы (биолог. науки), 1963, 2, стр. 109.
6. Манукян И. А. Материалы X научной сессии, посвященной 50-летию образования СССР, Ереванского Государственного института усовершенствования врачей. Ереван, 1972, стр. 47.
7. Мардашев С. Р., Буробин В. А. Вopr. мед. химии, 1963, IX, 1, стр. 93.
8. Мардашев С. Р., Буробин В. А. Вopr. мед. химии, 1962, VIII, 3, стр. 320.
9. Мхитарян В. Г. Автореферат докт. дисс. Ереван, 1964.
10. Партешко В. Г. Вопросы питания, 1964, 23, 5, стр. 20.
11. Hunter F. E. Jr., Gebicki J. M., Hoffstn P. E., Weinstein J., Scott A. J. Biol. Chem. 1963, 238, 2, p. 828.
12. Phylpot J. S., Roddyn D. B. Internat. Red. Biol., 1959, 1, 4, p. 372.