

УДК 612.35+612.397.8.015

В. Г. МХИТАРЯН, Л. В. СЕМЕРДЖЯН

ВЛИЯНИЕ ПЕРЕОКИСЛЕННЫХ НЕПРЕДЕЛЬНЫХ ЖИРНЫХ
КИСЛОТ НА АКТИВНОСТЬ ТРАНСКЕТОЛАЗЫ
И ТРАНСАЛЬДОЛАЗЫ В ПЕЧЕНИ КРЫС

Изучено влияние перекисленных непредельных жирных кислот (олеиновой и линолевой) на активность транскетолазы и трансальдолазы печени крыс. Установлено, что вышеуказанные кислоты при внутрибрюшинном их введении в течение 1, 7 и 14 дней в количестве 0,1 мл на 150 г веса животного вызывают фазовые сдвиги в активности указанных ферментов, причем сдвиги, наблюдаемые под влиянием перекисленной линолевой кислоты, более выражены.

В настоящее время липидной перекиссации придается большое значение в патогенезе развития ряда заболеваний (атеросклероз, диабет, лучевая и ожоговая болезни, токсикозы различной этиологии), а также при воздействии некоторых повреждающих агентов на клетку.

Известно, что при физиологических условиях в метаболизирующих тканях образуются липидные перекиси [13, 18, 29], оптимальный уровень которых регулируется биоантиоксидантами [1, 5, 6]. Однако при избыточном образовании их происходит гемолиз эритроцитов, накопление биологически инертных полимеров, поражение генетического аппарата, повреждение биомембран и т. п.

По данным ряда авторов [2, 15, 26], угнетение митоза при радиационном и ультрафиолетовом облучении сопровождается одновременным накоплением в тканях продуктов перекиссации липидов, причем для поддержания структурной целостности митотического аппарата, для регенерации тканей, восстановления тиоловых групп белков и для устранения липидных перекисей и свободных радикалов расходуется значительное количество восстановленного НАДФ, который, как известно, образуется в окислительных реакциях пентозофосфатного цикла.

В литературе имеется большое количество работ, посвященных влиянию радиации на активность некоторых ферментов пентозного цикла [3, 4, 17], имеющих важное значение для обеспечения организма восстановленным НАДФ, а также для создания фонда пентоз, необходимых для биосинтеза нуклеиновых кислот.

По данным В. Г. Мхитаряна и Э. М. Микаелян [11], у крыс при внутрибрюшинном введении перекиссированных и неперекиссированных ненасыщенных жирных кислот (НЖК) наблюдаются фазовые сдвиги в содержании нуклеиновых кислот, интенсивность и направленность которых зависит от структуры НЖК и длительности их воздействия на организм.

В одной из наших работ [12] было показано, что под влиянием хлоропрена, перекиси бензоила, гидроперекиси кумола, а также пероксидированных олеиновой и линолевой кислот угнетается глюкозо-6-фосфатдегидрогеназная активность в крови. Полученные результаты интерпретированы биохимическими механизмами метгемоглобинемии, наблюдаемой при этом токсикозе.

Известно, что в пентозном цикле, помимо окислительных ферментов, участвуют также и неокислительные—транскетолаза и трансальдолаза, активность которых меняется в зависимости от состояния организма. Так, по данным А. М. Каразе и А. И. Колотиловой [7], при диабете и при голодании в печени крыс активность транскетолазы резко снижается, в то время как активность трансальдолазы снижается незначительно. При этом инсулин заметно повышает активность транскетолазы и почти не влияет на таковую трансальдолазы.

Согласно данным Р. М. Шатинскене и В. И. Колотиловой [16], при гипертиреозе в сердечной мышце стимулируется активность ферментов как окислительных, так и неокислительных реакций пентозофосфатного цикла.

Сравнительно недавно Н. В. Майданова [10] установила, что двусторонняя адреналэктомия крыс снижает активность транскетолазы в печени, которая повышается на короткий срок после однократного введения катехоламинов. Любопытно, что у интактных крыс при однократном введении кортизона и гидрокортизона активность транскетолазы угнетается лишь через 15 часов.

Г. А. Кочетков и К. Р. Кобылянская [9] показали, что активность транскетолазы при мягких условиях фотоокисления быстро снижается.

В настоящей работе мы ставили задачу оценить значение транскетолазной (КФ 2.2.1.2) и трансальдолазной (КФ 2.2.1.1) активности печени при различных уровнях липидной перекисидации, вызванной экзогенными липидными перекисями.

Методика исследования

Опыты ставили на половозрелых белых крысах-самцах весом 150 ± 10 г линии Вистар. Животных разделили на 3 группы: I—интактные крысы служили контролем, II и III группам вводили предварительно пероксидированные жирные кислоты (олеиновую или линолевою), полученные путем их нагревания на водяной бане при 60° и продувании воздухом. Перекисный кислород составлял для обеих кислот по 300 мкмоль. Затравку крыс производили ежедневно путем внутрибрюшинного введения кислот в количестве 0,1 мл/150 г веса животного в три срока. Активность ферментов определяли через сутки и после 7- и 14-й затравок.

Животных декапитировали в холодных условиях, быстро извлекали печень и перфузировали изотоническим раствором 0,15 М KCl, на литр которого добавляли 8 мл 0,02 М раствора KHCO_3 для поддержания

pH—7,0 в соответствии с рекомендацией Глока и Мак-Линна [24]. Гомогенаты готовили на этой же среде из расчета 20 мл на 1 г ткани и центрифугировали при $0^\circ \pm 1$ (20000 g) в течение 60 мин.

Полученную надосадочную жидкость диализовали на холоду в той же среде изотонического раствора при $1^\circ \pm 2$ в течение 24 часов.

Активность транскетолазы и трансальдолазы определяли по скорости образования соответствующих метаболитов при инкубации надосадочной жидкости с рибозо-5-фосфатом. Инкубационную смесь составляли по Брунсу с соавт. [21]—0,5 мл супернатанта исследуемой ткани (4—5 мг белка), 5 мкмоль Р-5-Ф, 50 мкмоль трис-HCl буфера (pH-7,6). Общий объем пробы—1,5 мл. Инкубацию проводили в течение 20 мин при 37° . Реакцию останавливали добавлением 0,5 мл 20%-ной ТХУ. Об активности транскетолазы судили по накоплению седогептулозо-7-фосфата (С-7-Ф), количество которого определяли цистеиновым методом по Браунстону и Денстедту [22]. Активность трансальдолазы оценивали по образованию фруктозо-6-фосфата, который определяли по методу Дише и Девн [23]. Белок определяли по Лоури [27].

Активность ферментов выражали в мкмольях $\times 10^{-3}$ образующегося продукта реакции и рассчитывали на 1 мг белка экстракта печени за 1 мин инкубации.

Результаты и обсуждение

Как известно, транскетолазная реакция занимает одно из центральных мест в пентозофосфатном цикле обмена углеводов и является лимитирующим звеном в пути биосинтеза пентозофосфатов [19, 20]. Результаты наших исследований показали, что сдвиги в активности не-окислительных ферментов пентозного цикла, наблюдаемые у крыс в печени под влиянием НЖК, зависят как от структуры и степени их пероксидации, так и от длительности их воздействия на организм (табл. 1).

Приведенные в табл. 1 данные показывают, что у интактных крыс активность транскетолазы в печени составляет в среднем $16,8 \times 10^{-3}$ мкмоль С-7-Ф на 1 мг белка за 1 мин, что соответствует литературным данным [7]. Из табл. 1 видно, что у подопытных крыс (II группа) спустя 24 часа после затравки пероксидированной олеиновой кислотой активность транскетолазы снижается на 16,6%. При удлинении сроков затравки до семи дней ее активность повышается на 14,3% и вновь снижается после 14 затравок на 21,4%. При тех же условиях опыта пероксидированная линолевая кислота спустя 24 часа после затравки вызывает у подопытных крыс (III группа) некоторое повышение активности транскетолазы, которая резко снижается после 7-дневной затравки. К этому сроку активность транскетолазы составляет $10,6 \times 10^{-3}$ мкмоль С-7-Ф на мг белка/мин, что ниже контроля на 36,7%. Любопытно, что на 14-й день затравки активность фермента вновь значительно повышается, достигая $21,6 \times 10^{-3}$ мкмоль С-7-Ф на мг белка/мин, что на 25,6% выше контрольного уровня. Таким образом, под влия-

Таблица 1

Активность транскетолазы и трансальдолазы в печени крыс под действием пероксидированной олеиновой кислоты

Ферменты	Контрольные крысы	Подопытные крысы					
		через сутки	% изменений	через 7 дней	% изменений	через 14 дней	% изменений
Транскетолаза ¹ Пределы колебания	16,8±0,174 16,4—17,3 (n=15)	14,0±0,79 12,3—15,9 (n=9) p<0,001	-16,6	19,2±0,16 18,5—20,0 (n=9) p<0,001	+14,3	13,2±0,13 12,8—14,8 (n=10) p<0,001	-21,4
Трансальдолаза ² Пределы колебания	3,42±0,037 3,26—3,68 (n=12)	4,31±0,067 3,92—4,59 (n=9) p<0,001	+26,0	2,85±0,032 2,62—3,04 (n=10) p<0,001	-16,7	3,18±0,039 3,04—3,32 (n=7) p<0,001	-7,1

Таблица 2

Активность транскетолазы и трансальдолазы в печени крыс под действием пероксидированной линолевой кислоты

Ферменты	Контрольные крысы	Подопытные крысы					
		через сутки	% изменений	через 7 дней	% изменений	через 14 дней	% изменений
Транскетолаза ¹ Пределы колебания	16,8±0,174 16,4—17,3 (n=15)	17,4±0,112 17,4—18,8 (n=9) p<0,001	+3,4	10,6±0,25 10,0—11,9 (n=9) p<0,001	-36,7	21,1±0,165 20,6—22,2 (n=10) p<0,001	+25,6
Трансальдолаза ² Пределы колебания	3,42±0,037 3,26—3,68 (n=12)	2,65±0,065 2,30—2,88 (n=9) p<0,001	-22,3	4,58±0,03 4,12—4,80 (n=9) p<0,001	+33,9	3,82±0,046 4,0—3,59 (n=9) p<0,001	+11,3

¹ в мкмольях × 10⁻³ С-7-Ф на 1 мг белка за 1 мин.² в мкмольях × 10⁻³ Ф-6-Ф на 1 мг белка за 1 мин.

нием пероксидированных олеиновой и линолевой кислот в печени наблюдаются фазовые сдвиги в активности транскетолазы, особенно под влиянием пероксидированной линолевой кислоты.

Интересно, что подобные фазовые сдвиги в активности транскетолазы обнаружены у крыс в печени при аллоксановом диабете, голодании и действии ионизирующей радиации.

Известно, что рибозо-5-фосфат изомеразы (КФ 5.3.1.6) и рибулозо-5-фосфат-3-эпимеразы (КФ 5.1.3.1) являются весьма активными ферментами, поэтому при избытке Р-5-Ф они не могут лимитировать скорость транскетолазной реакции [25, 28]. В связи с этим мы допускаем, что обнаруженные изменения в активности транскетолазы обусловлены непосредственным действием пероксидированных НЖК на фермент. Характер изменений в активности трансальдолазы несколько отличается от сдвигов, наблюдаемых в активности транскетолазы.

Из данных, приведенных в табл. 1 и 2, видно, что у интактных крыс активность трансальдолазы составляет в среднем $3,42 \times 10^{-3}$ мкмоль Ф-6-Ф на 1 мг белка за 1 мин, что ниже литературных данных и, возможно, обусловлено сезонными колебаниями.

У подопытных крыс средний прирост Ф-6-Ф в печени спустя 24 часа после затравки олеиновой кислотой составляет $4,31 \times 10^{-3}$ мкмоль на 1 мг белка за 1 мин, что на 26% выше нормального уровня. С удлинением сроков затравки до 7 дней активность фермента снижается на 16,2% и, хотя она несколько повышается на 14-й день опыта, однако все еще продолжает оставаться ниже контрольного уровня на 7,1%.

Иная закономерность наблюдается под влиянием окисленной линолевой кислоты. Как показывают данные табл. 2, на следующий день после затравки активность фермента значительно понижается и составляет в среднем $2,65 \times 10^{-3}$ мкмоль на 1 мг белка за 1 мин, что на 22,3% ниже контрольного уровня. На 7-й день опыта активность резко повышается и составляет $4,58 \times 10^{-3}$ мкмоль на 1 мг белка за 1 мин, что на 33,9% выше нормы. После 14 затравок показатель активности фермента хотя и снижается, однако все еще остается на уровне, выше контрольного (на 11,3%).

Фазовые изменения в активности трансальдолазы и транскетолазы в печени под влиянием экзогенных липидных перекисей обусловлены их задержкой в печени [8, 14] и нарушением стационарного равновесия между процессом пероксидации липидов и уровнем биоантиоксидантов в клетке. В результате этого происходит накопление продуктов свободнорадикального окисления липидов, способных активно действовать на метаболизм клетки.

Исходя из собственных и литературных данных, мы считаем, что обнаруженные изменения в активности транскетолазы и трансальдолазы объясняются действием нескольких факторов, среди которых основная роль принадлежит перекисям и свободным радикалам. Причем характер сдвигов будет зависеть от концентрации антиоксидантов и количества перекисей и свободных радикалов. Последние могут алкилиро-

вать или окислять тиоловые группы ферментов и тем самым угнетать их активность.

Допускается, что интенсивная пероксидация может способствовать усиленному окислению тиамина и тем самым вызывать значительный его дефицит в организме, а также угнетать активность тиаминпирофосфаткиназы и понижать концентрацию тиаминпирофосфата-кофермента транскетолазы.

Не исключается также, что тормозящий эффект пероксидированных НЖК вызван частичной деструкцией белкового компонента фермента и скорее всего его активного центра, в состав которого, помимо SH-групп, входит гистидин, весьма чувствительный даже к видимому свету [9].

Наконец, перекиси и свободные радикалы могут непосредственно действовать на трансальдолазу и транскетолазу по типу неспецифических эффекторов и изменять их активность.

Кафедра биохимии
Ереванского медицинского
института

Поступила 8/X 1974 г.

Վ. Գ. ՄԻԻՔԱՐՅԱՆ, Լ. Վ. ՍԵՄԵՐՋՅԱՆ

ՊԵՐՕՔՍԻԴԱՅՎԱՆ ԶՀԱԳԵՑԱՆ ԺԱՐՊԱԹՈՒՆԵՐԻ ԱԶԴԵՑՈՒԹՅՈՒՆԸ
ԱՌՆԵՏՆԵՐԻ ԼՅԱՐԴՈՒՄ ՏՐԱՆՍԿԵՏՈԼԱԶԱ ԵՎ ՏՐԱՆՍԱԼԴՈԼԱԶԱ
ՖԵՐՄԵՆՏՆԵՐԻ ԱԿՏԻՎՈՒԹՅԱՆ ՎՐԱ

Ա մ փ ո փ ու մ

Սպիտակ առնետների վրա ուսումնասիրվել է պերօքսիդացված ճարպաթթուների (օլեինաթթու, լինոլաթթու) ազդեցությունը՝ լյարդի տրանսկետոլազա և տրանսալդոլազա ֆերմենտների ակտիվության վրա: Ճարպաթթուների կենդանիներին ներարկվել են ներորոգվայնային ճանապարհով 0,1 մլ 150 գ քաշին 1, 7 և 14 օրվա ընթացքում:

Հետազոտությունները ցույց են տվել, որ վերոհիշյալ թթուների ազդեցության տակ լյարդում տեղի են ունենում տրանսկետոլազայի ակտիվության ֆազային տեղաշարժեր, որոնք ավելի արտահայտված են պերօքսիդացված լինոլաթթվի ազդեցության տակ:

Փորձի նույն պայմաններում նման փոփոխություններ են հայտնաբերվել նաև տրանսկետոլազայի ակտիվության մեջ:

Л И Т Е Р А Т У Р А

1. Бурлакова Е. Б., Дзюба Н. М. Биофизика, 1966, 11, стр. 154.
2. Бурлакова Е. Б. Биофизика, 1967, 12, 1, стр. 82.
3. Гильгертова И., Шонка И. В. В кн.: Пентозный цикл и ионизирующая радиация. Л., 1968, стр. 74.
4. Горелик Ю. Я., Русанова А. М. Там же, стр. 79.
5. Журавлев А. И., Поливода А. И., Тарусов Б. Н. Радиобиология, 1961, 1, 3, стр. 321.

6. Журавлев А. И., Василевский В. А., Кашеенко В. Биоломинесценция. Труды МОИП. М., 1965, стр. 19.
7. Каразе А. М., Колотилова А. И. Биохимия, 1973, 38, стр. 515.
8. Карножицкий В. Успехи химии, 1972, XII, 8, стр. 1932.
9. Кочетков Г. А., Кобылянская К. Р. Вopr. мед. химии, 1965, 11, 6, стр. 80.
10. Майданова Н. В. Вopr. мед. химии, 1972, 18, стр. 47.
11. Мхитарян В. Г., Микаелян Э. М. Биологич. журнал Армении, 1974, XXVII, 1, стр. 3.
12. Мхитарян В. Г., Семерджян Л. В. Материалы научной сессии, посвященной 50-летию образования СССР. Ереван, 1972, стр. 326.
13. Нейфах Е. А., Каган В. Е. Биохимия, 1969, 34, стр. 511.
14. Партешко В. Г. Успехи современной биологии, 1969, 2/5, стр. 68.
15. Романцев Е. Ф. В кн.: Ранние радиационно-химические реакции. М., 1966.
16. Шатинскене Р. М., Колотилова В. И. Вopr. мед. химии, 1970, 16, стр. 491.
17. Шонка И. В кн.: Пентозный цикл и ионизирующая радиация. Л., 1968, стр. 9.
18. Bieri L. C., Anderson A. A. Arch. Biochem. a. Biophys., 1969, 90, 109.
19. Brin M., Shohet S., Davidson C. S. J. Biol. Chem., 1958, 230, 319.
20. Bruns F. H., Danwald E., Noltmann E. Biochem. Z., 1958, 330, 483.
21. Bruns F. H. et al. Biochem. Z., 1958, 330, 497.
22. Brownstone Y. S., Denstedt O. F. Canad. J. Biochem., 1960, 39, 527.
23. Dishe Z., Deul A. Biochem. et biophys. Acta, 1960, 39, 140.
24. Glock G. E., McLean P. Biochem. J. 1953, 55, 400.
25. Gumaa K. A., Novello F., McLean P. Biochem. J., 1969, 114, 253.
26. Harman D., Plette L. H. J. Gerontol., 1960, 21, 560.
27. Lowry O. H. et al. J. Biol. Chem., 1951, 193, 256.
28. Novello F., Gumaa K. A., McLean P. Biochem. J., 1969, 111, 713.
29. Wills E. D., Wilkinson A. E. Radiation Res., 1967, 31, 737.