

УДК 612.015.33

Л. В. МХИТАРЯН, Д. Н. ГЕВОРКЯН, В. Г. МХИТАРЯН

ИЗМЕНЕНИЯ В АКТИВНОСТИ НЕКОТОРЫХ ФЕРМЕНТОВ
ЦИКЛА КРЕБСА ПОД ВЛИЯНИЕМ ПЕРОКСИДИРОВАННЫХ
НЕПРЕДЕЛЬНЫХ ЖИРНЫХ КИСЛОТ

Пероксидированные олеиновая и линоленовая кислоты при внутрибрюшинном введении крысам в количестве 0,1 мл на 150 г веса животного вызывают в мозге фазовые изменения в активности цитратсинтетазы. Активность пируватдегидрогеназы в мозге под влиянием линоленовой кислоты повышается и, наоборот, несколько угнетается олеиновой кислотой. При тех же условиях опыта α -кетоглутаратдегидрогеназная активность через 24 часа повышается, затем к 7-му дню опыта несколько снижается и на 14-й день остается ниже контрольного уровня. Активность малатдегидрогеназы меняется лишь под влиянием олеиновой кислоты спустя 24 часа после ее введения. В остальные сроки ее активность колеблется почти в пределах нормы.

В настоящее время липидным перекисям придается большое патогенетическое значение в развитии целого ряда заболеваний—атеросклероза, лучевой болезни, диабета, ожоговой болезни, токсикозов различной этиологии, болезни Боткина и т. п. Установлено, что липидные перекиси вызывают набухание митохондрий, тормозят их сокращение вследствие окисления или алкилирования SH-групп белков митохондрий и нарушают их функции [11, 15].

В ряде работ показано, что липидные перекиси образуются и при физиологических условиях, оптимальный уровень которых регулируется биоантиоксидантами. Однако при нарушении компенсаторных механизмов, а также при избыточном поступлении экзогенных перекисей в организм содержание их в тканях может превысить нормальный уровень и привести к иницированию свободно-радикального окисления липидов с последующей дезорганизацией клеточного метаболизма [4].

Как известно, цикл трикарбоновых кислот (ЦТК) имеет исключительно большое значение, так как он обеспечивает энергией многочисленные функции организма. В литературе имеется большое количество данных о влиянии различных повреждающих факторов, в том числе и рентгеновских лучей, на активность ферментов цикла Кребса. Сравнительно недавно обнаружены изменения в активности ферментов (ЦТК) при сахарном диабете [2, 3, 10] и значительное повышение содержания липидных перекисей, определяемых по реакции с тиобарбитуровой кислотой при аллоксановом диабете [8], что согласуется с данными Кацумата, Кадзуо и др. [5].

В одной из наших работ [9] удалось установить угнетение активности ферментов (ЦТК) под влиянием хлоропрена, токсическое

действие которого на организм, как было показано нами [6], обусловлено его агрессивными перекисями.

В свете вышеизложенного представлялось весьма интересным изучить влияние экзогенных перекисидированных непредельных жирных кислот на активность ферментов ЦТК в мозге.

Методика и материал исследования

Опыты проводились на белых крысах весом 180—200 г. Перекисидированные олеиновую и линоленовую кислоты с перекисным кислородом 240 и 220 мкмоль соответственно вводили внутривентриально в количестве 0,1 мл на 150 г веса животного. Крыс забивали через 24 часа и после 7- и 14-й ежедневных затравок. Гомогенаты коры мозга готовили в холодных условиях на фосфатном буфере РН 7,4.

Активность цитратсинтетазы определяли по методу Нательсона и др. [16] в присутствии оксалоацетата, ацетата натрия, АТФ, HSKoA и выражали в мкмоль лимонной кислоты на 1 г ткани/час. Активность пируват-, малат- и α -кетоглутаратдегидрогеназ определяли по Норману и др. [17]. Активность ферментов измеряли на спектрофотометре СФ-4А при 570 нм и выражали в мкг формазана, образовавшегося в пробе за 1 час в расчете на 1 г ткани.

В связи с тем, что активность цитратсинтетазы и пируватдегидрогеназы зависела от времени года, колеблясь в широких пределах, мы вынуждены для каждой серии опытов ставить свой контроль.

Результаты и обсуждение

Наши исследования показали, что перекисидированные непредельные жирные кислоты (НЖК) вызывают у крыс в коре головного мозга неодинаковые сдвиги в активности ферментов цитратного цикла.

Таблица 1

Динамика изменения активности цитратсинтетазы в коре головного мозга крыс после введения перекисидированных олеиновой и линоленовой кислот (в мкмоль лимонной кислоты на 1 г ткани час)

Контрольные крысы	Кислота	После введения ненасыщенных жирных кислот					
		через 24 часа	% изменения	через 7 дней	% изменения	через 14 дней	% изменения
$2,08 \pm 0,04^*$ (n=17)	олеиновая	$2,05 \pm 0,03$ (n=8)	—	$3,41 \pm 0,02$ (n=8) $P < 0,001$	+64	$2,46 \pm 0,03$ (n=8) $P < 0,001$	+18
$1,67 \pm 0,07^{**}$ (n=9)	линоленовая	$1,37 \pm 0,04$ (n=7) $P < 0,01$	-20,0	$3,21 \pm 0,05$ (n=8) $P < 0,001$	+91	$1,90 \pm 0,1$ (n=8) $P > 0,1$	+11,3

* опыты ставились весной

** опыты ставились осенью

Из данных табл. 1 видно, что активность цитратсинтетазы спустя 24 часа после внутрибрюшинного введения пероксидированной олеиновой кислоты остается без изменения. Однако с удлинением сроков затравки до 7 дней активность фермента значительно повышается и составляет в среднем 3,41 мкмоль/г/час, что на 64% выше контроля. Дальнейшее удлинение сроков затравки приводит на 14-й день опыта к заметному снижению активности фермента, хотя по сравнению с контрольными данными она все еще остается выше на 18%.

Пероксидированная линоленовая кислота при тех же условиях опыта вызывает несколько иные изменения. Так, спустя 24 часа после ее введения активность цитратсинтетазы составляет 1,37 мкмоль/г/час, что на 20% ниже контрольного уровня.

Угнетение активности цитратсинтетазы в опытах *in vitro* под влиянием НЖК наблюдали также Пейнд и Мид [18]. После 7-дневной затравки ее активность резко повышается и достигает 3,21 мкмоль/г/час, что на 96% выше контроля. На 14-й день опыта активность фермента хотя и резко снижается и доходит до 1,90 мкмоль/г/час, однако все еще остается выше предела нормы.

Из данных, приведенных в табл. 1, видно, что активность цитратсинтетазы особенно заметно повышается на 7-й день опыта под влиянием олеиновой кислоты—на 64% и линоленовой—на 91%.

Любопытно, что эти же кислоты, как это было показано в одной из наших работ [7], повышают содержание эндогенных перекисей в мозге также на 7-й день опыта, причем под влиянием линоленовой кислоты—более чем в два раза.

Сопоставляя эти данные, можно заключить, что между активностью цитратсинтетазы и содержанием эндогенных перекисей имеется определенная корреляция. Согласно данным Дюбойса [13], под влиянием рентгеновских лучей (в механизме действия которых на организм придается большое значение перекисям и свободным радикалам) происходит заметное увеличение содержания лимонной кислоты. Таким образом, под влиянием экзогенных липидных перекисей активность цитратсинтетазы в мозге подвергается фазовым изменениям, которые во многом аналогичны сдвигам, наблюдаемым в мозге у крыс при хлоропреновом отравлении [9] и при рентгеноблучении.

Мы допускаем, что фазовые изменения в активности цитратсинтетазы под влиянием липидных перекисей связаны с включением компенсаторных механизмов, в том числе и биоантиоксидантов, в частности, витамина Е, содержание которого в мозге под влиянием перекисей также подвергается фазовым изменениям [1]. Не исключается, что изменение в активности цитратсинтетазы связано с аллостерической перестройкой фермента под влиянием липидных перекисей.

Наряду с активностью цитратсинтетазы нами исследовано также действие перекисей олеиновой и линоленовой кислот на активность пируват-, малат- и α -кетоглутаратдегидрогеназ, что представляет

определенный интерес, поскольку позволяет судить об интенсивности отдельных этапов цикла Кребса. Полученный материал приведен в табл. 2.

Как видно из данных, приведенных в табл. 2, у контрольных крыс в коре головного мозга активность вышеуказанных ферментов распределяется следующим образом: пируватдегидрогеназа > малатдегидрогеназа > α -кетоглутаратдегидрогеназа, что согласуется с данными Путилиной и Ещенко [10]. Наряду с этим показано, что активность пируватдегидрогеназы заметно изменяется в зависимости от времени года и, возможно, зависит от содержания тиамина в организме животных [19]. При воздействии олеиновой кислоты (табл. 2) через 24 часа активность пируватдегидрогеназы несколько понижается, в то время как под влиянием линоленовой кислоты, как это видно из той же таблицы, наоборот, повышается на 29%. Следовательно, через 24 часа олеиновая и линоленовая кислоты оказывают неодинаковое действие на активность пируватдегидрогеназы.

Однако спустя 7 дней после затравки олеиновой кислотой активность пируватдегидрогеназы продолжает понижаться, и к 14-му дню опыта ее активность составляет $130 \pm 2,4$ мкг формазана/г/час, что ниже контрольного уровня на 24,3%. Что же касается линоленовой кислоты, то, как видно из данных табл. 2, активность фермента хотя и продолжает оставаться выше контрольного уровня на 22,9%, однако по отношению к 24-часовой затравке наблюдается тенденция к снижению, которая становится более значительной на 14-й день опыта.

Наряду с пируватдегидрогеназой, при тех же условиях опыта изучалась активность α -кетоглутаратдегидрогеназы. Установлено, что в отличие от пируватдегидрогеназы ее активность не подвергается сезонным колебаниям. Как видно из данных табл. 2, активность α -кетоглутаратдегидрогеназы спустя 24 часа после затравки олеиновой кислотой повышается на 26%, затем несколько снижается и к 14-му дню опыта составляет 52,5 мкг формазана/г/час, что ниже контрольного уровня на 13,9%. При тех же условиях опыта под влиянием линоленовой кислоты активность фермента в первые два срока почти не меняется, и лишь на 14-й день опыта она ниже нормы на 11,3%.

Сравнивая изменения в активности этих двух ферментов, можно заметить, что под влиянием экзогенных липидных перекисей к концу сроков затравки наблюдается одинаковая направленность и тенденция к понижению. Любопытно, что у этих же крыс в мозге активность малатдегидрогеназы почти не изменяется, за исключением однодневной затравки олеиновой кислотой. Относительно высокая стабильность малатдегидрогеназы к липидной перекисидации обусловлена, по-видимому, тем, что для ее активности SH-группы не имеют существенного значения [14].

Таким образом, в гомогенатах мозга исследованные нами ферменты цикла Кребса имеют неодинаковую чувствительность к экзогенным липидным перекисям и могут быть распределены в убывающем порядке

Таблица 2

Динамика изменения активности пируват-, α -кетоглутарат- и малафдегидрогеназ в коре головного мозга крыс после введения пероксидированной олеиновой и линоленовой кислот (в мкг формазана на 1 г ткани/час)

Ферменты	Контрольные крысы	Кислота	После введения ненасыщенных жирных кислот					
			через 24 часа	% изменения	через 7 дней	% изменения	через 14 дней	% изменения
Пируватдегидрогеназа	172,06 $\pm$ 0,90*	олеиновая	155,62 $\pm$ 3,02 P>0,2	-9,6	133,86 $\pm$ 1,32 P<0,001	-23,0	130,26 $\pm$ 2,49 P<0,001	-24,3
	137,48 $\pm$ 4,05**	линоленовая	178,34 $\pm$ 1,81 P<0,002	+29,0	168,78 $\pm$ 1,81 P<0,001	+22,9	147,34 $\pm$ 3,36 P>0,1	+7,4
α -кетоглутаратдегидрогеназа	60,22 $\pm$ 1,22	олеиновая	75,98 $\pm$ 3,3 P<0,001	+26	68,48 $\pm$ 1,14 P<0,001	+13,7	52,51 $\pm$ 1,89 P<0,001	-12,8
	53,97 $\pm$ 1,64	линоленовая	58,11 $\pm$ 2,59 P>0,1	+6	55,61 $\pm$ 2,26 P>0,1	+3,3	47,82 $\pm$ 1,42 P>0,02	-11,3
Малатдегидрогеназа	87,52 $\pm$ 0,94	олеиновая	63,21 $\pm$ 1,25 P<0,001	-17,8	90,26 $\pm$ 1,76 P>0,1	+4,0	93,48 $\pm$ 2,51 P>0,05	+6,9
	90,07 $\pm$ 2,09	линоленовая	86,15 $\pm$ 0,9 P>0,1	-4,4	93,4 $\pm$ 1,33 P>0,1	+3,6	96,6 $\pm$ 1,89 P>0,02	+7,2

* Контроль и опыты с олеиновой кислотой ставились осенью.

** Контроль и опыты с линоленовой кислотой ставились весной.

следующим образом: пируватдегидрогеназа > α -кетоглутаратдегидрогеназа > малатдегидрогеназа.

Ереванский медицинский институт,
кафедра биохимии

Поступила 28/V 1975 г.

Լ. Վ. ՄԽԻԹԱՐՅԱՆ, Դ. Ն. ԴԵՎՈՐՅԱՆ, Վ. Գ. ՄԽԻԹԱՐՅԱՆ

ՊԵՐՕՔՍԻԴԱՅՎԱԾ ՉԶԱԳԵՑԱԾ ԺԱՐՊԱԹՔՈՒՆՆԵՐԻ ԱԶԴԵՑՈՒԹՅՈՒՆԸ
ԿՐԵՐՍԻ ՑԻԿԼԻ ՄԻ ՇԱՐՔ ՖԵՐՄԵՆՏՆԵՐԻ ԱԿՏԻՎՈՒԹՅԱՆ ՎՐԱ

Ա մ փ ո փ ո լ մ

Սպիտակ առնետների վրա ուսումնասիրվել է նախօրոք պերօքսիդացված օլեինաթթվի և լինոլենաթթվի ազդեցությունը ուղեղի ցիտրատսինթետազայի, պիրուվատ, α -կետոգլուտարատ և մալատհիդրոգենազների ակտիվության վրա: Ծարպաթթուները կենդանիներին ներարկվել են ներորովայնային ճանապարհով 0,1 մլ 150 գ քաշին 1, 7 և 14 օրերի ընթացքում:

Ստացված արդյունքները ցույց են տալիս, որ օլեինաթթվի և լինոլենաթթվի ազդեցության տակ ցիտրատսինթետազայի ակտիվությունը ուղեղում ենթարկվում է ֆազային փոփոխությունների. փորձի 7-րդ օրը օլեինաթթվի ազդեցության տակ ֆերմենտի ակտիվությունը ստուգիչ խմբի համեմատությամբ բարձր է 64 տոկոսով, իսկ լինոլենաթթվի ազդեցության տակ զրեթե երկու անգամ:

Այդ նույն կենդանիների մոտ լինոլենաթթվի ազդեցության տակ պիրուվատդեհիդրոգենազայի ակտիվությունը ուղեղում բարձրանում է, իսկ օլեինաթթվի ազդեցության տակ ճնշվում:

Լինոլենաթթվի ազդեցության տակ α -կետոգլուտարատդեհիդրոգենազայի ակտիվության փոփոխություններ չեն նկատվել: Մալատդեհիդրոգենազայի ակտիվության փոփոխություններ ուղեղում մեր փորձի պայմաններում չի բացահայտված, բացառությամբ օլեինաթթվի, որի ներարկումից 24 ժամ հետո ֆերմենտի ակտիվությունը իջնում է 17,8 տոկոսով:

Л И Т Е Р А Т У Р А

1. Агаджанов М. И., Мелик-Агаян Е. А., Мхитарян В. Г. Биол. ж. Армении, 1974, 27, 12, стр. 28.
2. Гулый М. Ф. Укр. биохим. ж., 1970, 42, стр. 189.
3. Егян В. Б., Бунатян Г. Х., Туршян Г. А., Акопян Г. Е. Вопр. биохимии мозга, Ереван, 1970, 4, стр. 147.
4. Карнажицкий В. Успехи химии, 1972, 12, 8, стр. 1420.
5. Кацумата Кадзую, Ямада Кодзо и др. Folia endocrinol. Japan, 1969, 45, 7, 778. РЖХим, 1970, 13Ф, 536.
6. Мхитарян В. Г. Докт. дисс. Ереван, 1964.
7. Мхитарян В. Г., Агаджанов М. И., Мелик-Агаян Е. А. Биол. журн. Армении, 1974, 27, 6, стр. 3.
8. Мхитарян В. Г., Агаджанов М. И., Мелик-Агаян Е. А. III Всесоюз. биохим. съезд. Рефераты научных докладов. Рига, 1974, 1, стр. 241.

9. Мхитарян Л. В., Геворкян Д. М., Мхитарян В. Г. Сб. научн. трудов Ер. мед. инстита, XVI, 1974, I, стр. 209.
10. Путилина Ф. Е., Ещенко Н. Д. Вестн. Ленингр. ун-та, 1969, 15, 3, стр. 112.
11. Эмануэль Н. М. Изв. АН СССР, ОХН, 1963, 11, 12, стр. 1298.
12. Cuestas R. a. Dixit P. K. Proc. Soc. Exp. Biol. a. Med., 1973, 142, 889.
13. Dubois K. P., Cochran K. W., Doulls S. Proc. Soc. Exp. Biol. a. Med., 1951, 76, 38.
14. Guha A., Englard S., Listowsky Y. J. Biol. Chem., 1968, 243, 609.
15. Kibrick A. C., Salford L. B., Skupp S. J. Proc. Soc. Exp. Biol. a. Med., 1951, 101, 137.
16. Natelson S., Pincus S., Lugovoy J. J. Biol. Chem., 1948, 175, 745.
17. Nordmann J., Nordmann N., Gauchery O. Bull. Soc. Chim. Biol., 1951, 33, 1826.
18. Pande S. V., Mead J. F. J. Chem., 1968, 243, 6180.
19. O'Brien J. R. P. a. Peters R. A. J. Physiol., 1955, 85, 454.