

УДК 616.632+616—099—08

Л. В. СЕМЕРДЖЯН, В. Г. МХИТАРЯН

## АКТИВНОСТЬ ФЕРМЕНТОВ ПЕНТОЗНОГО ЦИКЛА В ПЕЧЕНИ КРЫС ПРИ ХРОНИЧЕСКОМ ХЛОРОПРЕНОВОМ ТОКСИКОЗЕ И РОЛЬ ВИТАМИНА «Е» В ЭТОМ ПРОЦЕССЕ

Изучены сдвиги в активности некоторых ферментов пентозного цикла в печени крыс при хлоропреновом отравлении и влияние  $\alpha$ -токоферилацетата на их активность при различных сроках затравки. Установлено, что на 7-й день опыта активность Г-6-ФД и 6-ФГД, а также активность транскетолазы и трансальдолазы снижается, причем больше угнетается 6-ФГД (39,1%). С удлинением сроков затравки до 15 дней активность всех ферментов повышается на 12—24% и к 30-му дню вновь угнетается. При введении хлоропрена совместно с витамином Е активность всех ферментов колеблется во всех сроках эксперимента в пределах нормы.

В настоящее время все большее значение как этиологический фактор приобретают различные промышленные яды. Многие отечественные [4, 9] и зарубежные исследователи [23] указывают на способность большой группы химических веществ вызывать (преимущественно) поражение печени. Особое место в ряду гепатотропных ядов занимает хлоропрен, который нашел широкое применение в различных отраслях народного хозяйства. Установлен механизм токсического действия хлоропрена [9, 7]. Показано, что оно обусловлено его агрессивными перекисями, которые, поступая в организм, усиливают процесс липидной перекисидации. Известно также, что при хлоропреновом токсикозе в тканях организма, в частности в печени, повышается количество липидных перекисей [9, 10], подавляется антиокислительная активность печени [1, 12], вследствие чего нарушается катаболизм клетки [8, 9, 11]. Аналогичные данные имеются в литературе относительно отравлений четыреххлористым углеродом, озоном, гидразином, этанолом и НЖК. В этих нарушениях ведущую роль играет процесс липоперекисидации [3, 12, 20, 16]. Учитывая наибольшую поражаемость печени под воздействием хлоропрена, а также важную роль пентозного цикла в репаративных процессах, мы задались целью изучить при этих условиях состояние окислительных и неокислительных ферментов пентозофосфатного цикла—транскетолазы (ТК) и трансальдолазы (ТА). Одновременно интересно было выяснить действие  $\alpha$ -токоферола на ферменты пентозного цикла в динамике.

### Материал и методика

Опыты проводились на белых крысах-самцах весом 150—180 г, находившихся на обычном рационе в виварии. Животные были распре-

делены на три группы: 1-ая—интактные животные, 2-ая—крысы, отравленные хлоропреном, и 3-я—животные, получавшие параллельно с хлоропреном  $\alpha$ -токоферилацетат. Затравку производили ежедневно в течение 7, 15 и 30 дней путем внутривнутрибрюшинного введения хлоропрена в количестве 600 мкмоль на 100 г веса тела в 5% растворе КМ-целлюлозы (0,1 мл). Третьей группе животных, помимо хлоропрена, вводили в те же сроки  $\alpha$ -токоферилацетат в количестве 2 мг на 100 г веса в виде тонкой эмульсии в 10% водном растворе Твин-80 (0,5 мл).

Активность глюкозо-6-фосфатдегидрогеназы (Г-6-ФД) (КФ 1.1.1.49) и 6-фосфоглюконатдегидрогеназы декарбоксилирующей (6-ФГД) (КФ 1.1.1.44) в диализированном супернатанте печени определяли спектрофотометрическим методом Глока и Мак Лина [19], измеряя величину оптической плотности проб при 340 нм через каждую минуту в течение 5 мин при 20°.

Инкубационная смесь в кювете спектрофотометра содержала 0,1 мл ферментного препарата (0,8—0,99 мг белка), 50 мкмоль  $MgCl_2$ , 0,25 мкмоль НАДФ (Boehringer), 5 мкмоль субстрата глюкозо-6-фосфатдинатриевой соли (Reanal) и 6-фосфоглюконат Ba-соли (Reanal), которую переводили в Na-соль, 125 мкмоль глицилглицинового КОН-буфера, pH 7,6 для глюкозо-6-фосфатдегидрогеназы и pH 9,0 для 6-фосфоглюконатдегидрогеназы. Контрольная проба не содержала НАДФ. Общий объем реакционной смеси 2,5 мл. Активность ферментов выражали в мкмольях НАДФ, восстановленного за 1 мин, на 1 мг растворимого белка.

Активность неокислительных ферментов пентозного цикла определяли по скорости синтеза специфических метаболитов при инкубации надосадочной жидкости с рибозо-5-фосфатом (P-5-Ф) (Reanal). Инкубационную смесь составляли согласно Брунсу и соавт. [15]. Пробы содержали на 1,5 мл объема: 50 мкмоль трис-HCl буфер, pH—7,6, 5 мкмоль P-5-Ф и 0,5 мл супернатанта печени. Инкубацию проводили в течение 20 мин при 37°. Реакцию прекращали добавлением 0,5 мл охлажденного 20% ТХУ. Об активности транскетолазы судили по накоплению седогептулозо-7-фосфата (С-7-Ф), количество которого определяли цистиновым методом по Броунстону и Денстедту [14]. Активность транскетолазы оценивали по скорости образования Ф-6-Ф, количество которого определяли по методу Дише и Деви [18]. Содержание белка определяли по Лоури [21] с кристаллическим бычьим сывороточным альбумином (Кох-Лайт, Англия) в качестве стандарта. Активность ферментов выражали в мкмольях  $\times 10^{-3}$  образовавшихся продуктов реакции и рассчитывали на 1 мг белка экстракта печени за 1 мин инкубации.

### Результаты исследований и обсуждение

Результаты проведенных исследований в обобщенном виде представлены в таблицах. Как видно из данных табл. 1, у интактных крыс

активность Г-6-ФД и 6-ФГД колеблется в пределах нормы и согласуется с литературными данными [19]. Подобные результаты получены и в отношении ТК и ТА [5]. Как видно из данных табл. 1, у подопытных крыс спустя 7 суток после ежедневных затравок хлоропреном активность Г-6-ФД и 6-ФГД угнетается по сравнению с контролем на 17,3 и 39,1% соответственно. При этих же условиях эксперимента активность неокислительных ферментов пентозного цикла снижается — транскетолазы на 13,3%, а трансальдолазы на 17,2%. С удлинением сроков затравки до 15 дней активность ферментов изменяется в противоположном направлении, причем активность Г-6-ФД повышается на 23,8%, а 6-ФГД на 14,9%, примерно на столько же повышается активность ТК — 21,3% и ТА — 12,5%.

Небезынтересно, что, по данным Е. А. Мелик-Агаян [7], в эти же сроки у подопытных крыс под влиянием хлоропрена резко повышается уровень липидных перекисей в печени, и, наоборот, резко снижается содержание витамина Е. В эти сроки у крыс гистохимически обнаружена также жировая дистрофия печени [2].

Следует отметить, что идентичные изменения в активности дегидрогеназ пентозного цикла описаны в литературе и при интоксикации озоном. Показано, что параллельно с увеличением концентрации липидных перекисей, помимо активности глутатионпероксидазы и глутатионредуктазы, повышается также активность Г-6-ФД. Причем под влиянием витамина Е снижается как концентрация липидных перекисей, так и активность глутатионпероксидазы и Г-6-ФД.

Повышение активности ферментов пентозного цикла и особенно лимитирующего Г-6-ФД, возможно, имеет защитную роль, усиливая катаболизм перекисей липидов за счет повышения концентрации НАДФН<sub>2</sub> [6, 17]. Наряду с этим вследствие активации неокислительной фазы пентозного цикла, возможно, повышается содержание пентоз, которые и обеспечивают синтез нуклеиновых кислот, необходимых для обеспечения репаративных процессов в поврежденной ткани печени. В пользу такой интерпретации говорят данные Э. М. Микаелян [11], которая показала, что в печени крыс под влиянием хлоропрена повышается в этот срок содержание ДНК и РНК. При удлинении сроков затравки хлоропреном до 30 дней активность Г-6-ФД и 6-ФГД вновь угнетается, причем активность последней снижается несколько больше, чем Г-6-ФД. Подобные изменения претерпевает активность ТК и ТА.

Таким образом, хлоропрен и липидные перекиси, индуцированные хлоропреном, вызывают в печени фазные изменения в активности ферментов пентозного цикла, причем на 7-й день затравки их активность снижается, особенно 6-ФГД, затем к 15-му дню происходит резкое изменение в активности ферментов в противоположную сторону с повышением активности 6-ФГД и ТК на 23,8 и 21,3% и несколько меньше 6-ФГД и ТА на 14,9 и 12,5% соответственно. К 30-му дню опыта активность всех изучаемых ферментов вновь снижается и остается ниже контрольного уровня на 5—14%.

Таблица 1

Активность Г-6-ФД и 6-ФГД в печени при хроническом хлоропреновом отравлении (активность выражена в мкмоль НАДФН<sub>2</sub>/мин на 1 мг белка)

Ферменты	Контрольные крысы	Подопытные крысы					
		через 7 дней	% изменения	через 15 дней	% изменения	через 30 дней	% изменения
Г-6-ФД Р	0,342±0,001 (n=9)	0,283±0,002 (n=9)* <0,001	-17,3	0,420±0,0051 (n=9) <0,001	+23,8	0,308±0,0016 (n=9) <0,001	-9,9
6-ФГД Р	0,772±0,002 (n=10)	0,470±0,0059 (n=10) <0,001	-39,1	0,887±0,0021 (n=8) <0,001	+14,9	0,644±0,0011 (n=10) <0,001	-14,1

Таблица 2

Активность Г-6-ФД и 6-ФГД в печени при совместном действии хлоропрена и витамина Е (активность выражена в мкмоль НАДФН<sub>2</sub>/мин на 1 мг белка)

Ферменты	Контрольные крысы	Подопытные крысы					
		Через 7 дней	% изменения	через 15 дней	% изменения	через 30 дней	% изменения
Г-6-ФД Р	0,342±0,001 (n=9)	0,319±0,0020 (n=9) <0,001	-6,8	0,348±0,001 (n=8) <0,01	+1,7	0,333±0,0018 (n=9) <0,01	-3,5
6-ФГД Р	0,772±0,0022 (n=10)	0,696±0,001 (n=10) <0,01	-8,1	0,819±0,0018 (n=9) <0,05	+5,8	0,845±0,002 (n=9) <0,05	-1,6

\* n—число животных.

Активность ТК и ТА в печени крыс при хроническом хлоропреновом отравлении

Ферменты	Контрольные крысы	Подопытные крысы					
		через 7 дней	% измене- ния	через 15 дней	% измене- ния	через 30 дней	% измене- ния
ТК <sup>1</sup> Р	17,3±0,552 (n=10)	14,07±0,161 (n=8) <0,001	-13,3	21,4±0,198 (n=8) <0,001	+21,3	15,8±0,196 (n=7) <0,001	-8,7
ТА <sup>2</sup> Р	3,67±0,025 (n=10)	3,04±0,0191 (n=8) <0,001	-17,2	4,13±0,046 (n=8) <0,001	+12,5	3,35±0,028 (n=7) <0,01	-5,1

Активность ТК и ТА в печени крыс при совместном действии хлоропрена и витамина Е

Ферменты	Контрольные крысы	Подопытные крысы					
		через 7 дней	% измене- ния	через 15 дней	% измене- ния	через 30 дней	% измене- ния
ТК <sup>1</sup> Р	17,3±0,552 (n=10)	16,8±0,162 (n=8) <0,005	-2,9	18,5±0,323 (n=8) <0,02	+6,9	18,15±0,161 (n=8) <0,01	+4,9
ТА <sup>2</sup> Р	3,67±0,025 (n=10)	3,43±0,040 (n=8) <0,01	-5,7	3,68±0,0186 (n=8) <0,5	-	3,68±0,022 (n=9) <0,5	-

- 1) мкмоль  $\times 10^{-3}$  С-7-Ф на 1 мг белка за 1 мин  
 2) мкмоль  $\times 10^{-3}$  Ф-6-Ф на 1 мг белка за 1 мин

Как известно, липидные перекиси занимают определенное место в превращениях липидов. Они образуются в тканях и при физиологических условиях, количество их регулируется при помощи эффективных защитных систем, способных предотвращать повреждающее действие перекисей липидов либо ингибируя их образование, либо обезвреживая образовавшиеся перекиси [6, 17]. К таким системам относятся супероксиддисмутаза, глутатионпероксидаза, глутатионредуктаза, ферменты пентозного цикла—Г-6-ФД и 6-ФГД, обеспечивающие образование НАДФН<sub>2</sub>, а также некоторые антиоксиданты, как аскорбиновая кислота,  $\alpha$ -токоферол, восстановленный глутатион и т. п. [17, 23].

Перекиси липидов, образовавшиеся ферментативным или неферментативным путем, в связи с их агрессивностью представляют определенную опасность для клетки. Они могут вызывать морфологические изменения и нарушать нормальный метаболический процесс путем инактивации некоторых ферментных систем, окислять SH-группы и изменять их конформацию. Усиленная липидная перекисидация может нарушать мембранную проницаемость, вследствие чего в клетке наступает хаотическое состояние, приводящее к гибели клетки.

Многочисленные исследования В. Г. Мхитаряна [9] показали, что хлоропрен обладает радиомиметическим действием, вызывает у подопытных крыс резкое снижение содержания аскорбиновой кислоты, витамина Е, SH-групп белков и восстановленного глутатиона, в результате чего в организме, в том числе и печени, накапливаются липидные перекиси.

Мы допускали, что одной из причин развития токсической дистрофии печени и нарушения пентозного цикла в печени является высокое содержание свободных радикалов и липидных перекисей. В связи с этим было интересно с помощью протекторов свободнорадикальных реакций воздействовать на процесс липидной перекисидации и выяснить активность этих же ферментов.

С этой целью в следующей серии опытов нами было изучено влияние  $\alpha$ -токоферилацетата на активность ферментов пентозного цикла. Результаты этих исследований приведены в табл. 2 и 4. Как видно из данных табл. 2, при совместном введении хлоропрена с витамином Е у крыс на 7-й день затравки Г-6-ФД угнетается всего лишь на 6,8%, между тем как без витамина Е она снижается на 17,3% (табл. 1). Интересно, что сдвиги в активности 6-ФГД в этот срок более выражены. Как видно из той же таблицы, при совместном введении хлоропрена с витамином Е активность ее в печени снижается лишь на 8,1%, в то время как без витамина она угнетается на 39,1%.

Подобным сдвигам подвергается активность ТА и ТК. При сопоставлении данных табл. 3 и 4 видно, что на 7-й день опыта у крыс при совместном введении хлоропрена с витамином Е активность обоих ферментов в печени снижается весьма незначительно. Эти данные, как и морфологические исследования, свидетельствуют, что ежедневное ве-

дение витамина Е в количестве 5 мг уже на 7-й день опыта оказывает благоприятное влияние на течение хлоропренового токсикоза.

Весьма любопытно, что на 15-й день опыта, когда под влиянием хлоропрена наблюдается высокая активность дегидрогеназ пентозного цикла, у крыс при введении хлоропрена совместно с витамином Е их активность остается почти в пределах нормы. Подобные результаты получены и на 30-й день опыта. Небольшие изменения найдены и в активности ТА и ТК. Результаты этих исследований в целом совпадают с данными наших прежних исследований, где показана фазность сдвигов в активности ТК и ТА под влиянием пероксидированных олеиновой и линолевой кислот [12].

Суммируя весь фактический материал, можно допустить, что активизирующее действие  $\alpha$ -токоферилацетата на активность ферментов пентозного цикла при хлоропреновом токсикозе, видимо, опосредовано путем подавления липидной пероксидации.

Кафедра биохимии Ереванского мединститута

Поступила 16/IV 1976 г.

Լ. Վ. ՍԵՄԵՐՋՅԱՆ, Վ. Գ. ՄԽԻՐԱՐՅԱՆ

ՊԵՆՏՈՉԱՅԻՆ ԶԻԿԼԻ ՖԵՐՄԵՆՏՆԵՐԻ ԱԿՏԻՎՈՒԹՅՈՒՆԸ ԱՌՆԵՏՆԵՐԻ  
ԼՅԱՐԴՈՒՄ ՔԼՈՐՈՊՐԵՆԱՅԻՆ ԽՐՈՆԻԿ ԹՈՒՆԱՎՈՐՄԱՆ ԺԱՄԱՆԱԿ  
ԵՎ Ե ՎԻՏԱՄԻՆԻ ԴԵՐԸ ԱՅՊ ՊՐՈՑԵՍՈՒՄ

Ա մ փ ո փ ո լ մ

Ուսումնասիրվել է պենտոզային ցիկլի մի քանի ֆերմենտների ակտիվությունը առնետների լյարդում քլորոպրենային թունավորման ժամանակ և  $\alpha$ -տոկոֆերիլացետատի ազդեցությունը ֆերմենտների ակտիվության վրա թունավորման տարբեր ժամկետներում:

Քլորոպրենի և Ե վիտամինի համատեղ ներարկման դեպքում նշված ֆերմենտների ակտիվությունը փորձի բոլոր ժամկետներում գրեթե չի փոփոխվում և մնում է նորմայի սահմաններում:

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Агаджанов М. И., Мелик-Агазян Е. А., Мхитарян В. Г. Биол. журн. Армения, 1973, XXVI, 4, стр. 28.
2. Аллавердян А. Г. Труды Института гигиены труда и проф. заболеваний. Ереван, 1970, 1, стр. 139.
3. Арчаков А. И., Карузина И. И. В сб.: Успехи гепатологии, 4. Рига, 1973, стр. 39.
4. Бондарь Э. М. Клиническая гепатология. М., 1970.
5. Қаразе А. М., Колотилова А. И. Биохимия, 1973, 38, стр. 515.
6. Владимиров Ю. А., Оленев В. И., Суслова Т. Б., Потапенко А. Я. Биофизика, 1975, 5, стр. 56.
7. Мелик-Агаян Е. А. Автореф. канд. дисс. Ереван, 1975.
8. Мхитарян В. Г., Семерджян Л. В. Мат. XLIX научн. сессии мединститута. Ереван, 1970, стр. 121.
9. Мхитарян В. Г. Автореф. докт. дисс. Ереван, 1964.

10. Мхитарян В. Г., Агаджанов М. И., Мелик-Агаян Е. А. Материалы XLIX научной сессии мединститута. Ереван, 1970, стр. 185.
11. Мхитарян В. Г., Микаелян Э. М. Материалы XLIX научной сессии мединститута. Ереван, 1971, стр. 128.
12. Мхитарян В. Г., Семерджян Л. В. Журнал экспериментальной и клинической медицины АН Арм. ССР, 1975, XV, 4, стр. 10.
13. Партешко В. Г. Успехи современной биологии, 1969, 68, 2(5), стр. 197.
14. Brownstone Y. S., Denstedt O. F. Canad. J. Biochem. a physiology, 1961, 39, 527.
15. Bruns F. H. et all. Biochem. Z., 1958, 330, 497.
16. Bunyan J., Sawthorne M. A. et all. Brit. J. Nutr., 1969, 23, 2, 309.
17. Chow C. K., Tappel A. K. Lipids, 1972, 7, 8, 518.
18. Dishe Z., Devi A. Biochem. et. Biophys. Acta., 1960, 39, 140.
19. Glock G. E., McLean P. Biochem. J., 1953, 55, 3, 400.
20. Goldstein B. O., Buckley R. D., Gordonas R., Balchum O. S. Science, 1970, 169, 3946, 605.
21. Lowry O. H. et all. J. Biol. Chem, 1951, 193, 256.
22. Tappel A. L. Vitamines and Hormones, 1962, 20, 493.
23. Zaitin K., Tappel A. L. Arch. Biochem. and Biophys., 1960, 88, 113.