

УДК 613.63:661.729

Л. В. СЕМЕРДЖЯН, В. Г. МХИТАРЯН

ВЛИЯНИЕ ОРГАНИЧЕСКИХ ПЕРЕКИСЕЙ НА ДИНАМИКУ
АКТИВНОСТИ ФЕРМЕНТОВ ПЕНТОЗНОГО ЦИКЛА

Изучено влияние перекиси бензоила и гидроперекиси кумола на активность ферментов пентозо-фосфатного пути обмена углеводов. Установлено, что внутрибрюшинное их введение вызывает фазные изменения в активности глюкозо-6-фосфат и 6-фосфоглюконат дегидрогеназ в печени белых крыс. Подобные сдвиги наблюдаются и в активности транскетолазы и трансальдолазы. Показано, что гидроперекись кумола угнетает активность ферментов значительно сильнее, чем перекись бензоила, причем сдвиги в активности окислительных ферментов более выражены, чем трансферментов. Наиболее чувствительной к гидроперекиси кумола оказалась дегидрогеназа 6-ФГ, а из трансферментов — трансальдолаза. В отличие от гидроперекиси кумола перекись бензоила несколько снижает активность окислительных ферментов и трансферментов в начальные сроки затравки, а в последующие сроки, наоборот, повышает.

Органические перекиси в настоящее время привлекают к себе все больше внимания не только в связи с их значением в полимеризационных процессах, но и как продукты, находящие разнообразное и ценное техническое применение [6]. Большинство из них является горючими и опасными веществами ввиду их способности к саморазложению, возможно, со взрывом.

Известно, что ионы железа и трет-амины оказывают индуцирующее действие на распад перекисей с образованием свободных радикалов. Перекиси в отличие от гидроперекисей распадаются в основном с образованием свободных радикалов, в то время как гидроперекиси распадаются как радикальным, так и нерадикальным механизмом. Перекиси и гидроперекиси отличаются различием окислительных потенциалов, причем перекиси с лабильной структурой более агрессивны, чем перекиси со стабильной структурой.

Органические перекиси и гидроперекиси являются биологически активными метаболитами. Они обладают мутагенным действием, повреждают хромосомный аппарат, способствуют метгемоглобинообразованию, повреждают структуру биомембран, снижают содержание SH групп, угнетают активность целого ряда тиоловых ферментов и т. п. Исследования Вайтцеля и сотр. [24, 25] показали, что органические перекиси и гидроперекиси тормозят дыхание и гликолиз, подавляют рост асцитных клеток карциномы Эрлиха, угнетают активность ряда ферментов. По их данным, этот эффект зависит от структуры перекисей и гидроперекисей, причем последние в противоположность большинству перекисей тормозят дыхание сильнее, чем гликолиз. Наряду с этим обнаружена неодинаковая чувствительность ферментов гликолиза к пере-

кисям. Так, глицеральдегиддегидрогеназа оказалась в 10 раз чувствительнее, чем альдолаза и лактатдегидрогеназа. Согласно данным Вайтцеля и сотр., перекиси угнетают биосинтез НАД, реагируют с лабильными тиоловыми группами белков крови.

Органические перекиси и гидроперекиси проявляют в опытах с каталазой противоположное действие. Если гидроперекиси расщепляются каталазой, то перекиси, наоборот, являются в основном устойчивыми. Установлено также, что перекиси в отличие от гидроперекисей не влияют на активность каталазы.

Исследованиями В. Г. Мхитаряна и сотр. [14] установлено, что перекись бензоила, гидроперекись кумола и дифенилэтана вызывают неодинаковые сдвиги в содержании ганглиозидов мозга, а также в содержании эндогенного витамина Е в печени и мозге [9].

В настоящее время липидной пероксидации придается большое значение. Показано, что усиленная липидная пероксидация является одним из важных патогенетических факторов в развитии целого ряда заболеваний, таких как атеросклероз, ожоговая болезнь, стрессы различной этиологии, диабет, болезнь Боткина, различные профинтоксикации и т. п.

Исследования, проведенные нами, показали, что органические перекиси, введенные в организм, индуцируют процесс липидной пероксидации, вследствие чего в организме повышается содержание эндогенных липидных перекисей, причем характер и интенсивность пероксидации зависят от структуры вводимых перекисей.

Многочисленные исследования, выполненные В. Г. Мхитаряном [11] по изучению токсического действия 2-хлорбутадиена 1.3 (хлоропрен) на организм, привели к выводу о перекисном механизме действия хлоропрена, что было подтверждено в дальнейших исследованиях [9]. В одной из наших работ [16] было показано, что индуцированная хлоропреном избыточная липидная пероксидация угнетает ферменты пентозного цикла. Введение α -токоферилацетата предотвращает токсическое действие хлоропрена и нормализует активность ферментов пентозного цикла.

Анализ как собственных, так и литературных данных привел нас к предположению, что нарушение пентозного цикла при хлоропреновом токсикозе обусловлено липидными перекисями, индуцированными перекисями хлоропрена. С целью подтверждения этого мнения мы сочли возможным изучить влияние органических перекисей (перекись бензоила и гидроперекись кумола) на активность ферментов пентозного цикла в печени крыс. Обнаружение однотипных по характеру сдвигов в активности ферментов пентозного цикла могло бы послужить доказательством нашего предположения.

Материал и методика исследования

Опыты проводили на белых крысах-самцах весом 150—180 г, содержащихся на обычном рационе в виварии. Животных разделили на

3 группы: I—интактные крысы служили контролем, II и III группам вводили врозь перекись бензоила и гидроперекись кумола внутривнутрибрюшинно на 5%-ном растворе карбоксиметилцеллюлозы в количестве 20 мкмоль на 100 г веса животного ежедневно в течение 7, 15 и 30 дней. Активность глюкозо-6-фосфатдегидрогеназы (Г-6-ФД) (КФ 1.1.1.49) и 6-фосфоглюконатдегидрогеназы (декарбоксилирующей) (6-ФГД) (КФ 1.1.1.44) определяли спектрофотометрическим методом Глока и Маклина [17]. Реакционная смесь в кювете спектрофотометра подробно описана в предыдущей работе [16]. За единицу ферментативной активности принимали то количество фермента, которое катализировало при 20° превращение 0.01 мкмоль НАДФ в минуту. Активность транскетолазы (ТК) (КФ 2.2.1.1.) и трансальдолазы (ТА) (КФ 2.2.1.2.) определяли по скорости синтеза специфических метаболитов при инкубации экстрактов печени с рибозо-5-фосфатом. Инкубационную смесь составляли согласно Брунсу и соавт. [20]. Об активности транскетолазы судили по накоплению седогептулозо-7-фосфата (С-7-Ф), количество которого определяли цистеиновым методом по Браунстону и Денстедту [19]. Активность трансальдолазы оценивали по образованию фруктозо-6-фосфата (Ф-6-Ф), который определяли по методу Дише и Деви [21]. Белок определяли по Лоури [23]. Активность ферментов выражали в мкмольях $\times 10^{-3}$ образующегося продукта реакции и рассчитывали на 1 мг белка экстракта печени за одну минуту инкубации.

Результаты исследований и обсуждение

Полученные данные, приведенные в табл. 1—4, свидетельствуют, что у интактных крыс в печени активность ферментов как окислительных, так и неокислительных реакций пентозного цикла варьирует в значительных пределах и зависит от времени года, что согласуется с имею-

Таблица 1

Сдвиги в активности Г-6-ФД и 6-ФГД в печени белых крыс под влиянием гидроперекиси кумола (активность выражена в мкмольях НАДФН/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	0,337 $\pm$ 0,001 (n=10)	0,245 $\pm$ 0,001 (n=9)	-27,3	0,414 $\pm$ 0,009 (n=10)	+22,9	0,239 $\pm$ 0,001 (n=9)	-28,9
Р		<0,001		<0,001		<0,001	
6-ФГД	0,767 $\pm$ 0,001 (n=10)	0,470 $\pm$ 0,005 (n=10)	-38,7	0,839 $\pm$ 0,002 (n=10)	+15,9	0,453 $\pm$ 0,001 (n=10)	-40,0
Р		<0,001		<0,001		<0,001	

щимися в литературе сообщениями [5, 7, 18]. Из представленных данных видно, что при внутрибрюшинном введении органических перекисей (перекись бензоила и гидроперекись кумола) сдвиги в активности

Таблица 2

Изменения в активности ТК и ТА в печени белых крыс
под влиянием гидроперекиси кумола

Ферменты	Контроль- ные крысы	Подопытные крысы					
		через 7 дней	% изме- нения	через 15 дней	% изме- нения	через 30 дней	% изме- нения
ТК*	16,8±0,14 (n=10)	13,8±0,14 (n=8)	-17,9	18,7±0,29 (n=8)	+11,6	15,1±0,39 (n=10)	-10,2
Р		<0,001		<0,01		<0,01	
ТА**	3,67±0,02 (n=10)	3,29±0,03 (n=10)	-15,9	4,25±0,07 (n=7)	+15,7	3,21±0,07 (n=8)	-12,9
Р		<0,001		<0,001		<0,001	

* мкмоль·10⁻³ С-7-Ф/мг белка/мин

** мкмоль·10⁻³ Ф-6-Ф/мг белка/мин

Таблица 3

Сдвиги в активности Г-6-ФД и 6-ФГД в печени белых крыс под влиянием
перекиси бензоила (активность выражена в мкмольях НАДФН/мин на 1 мг белка)

Ферменты	Контроль- ные крысы	Подопытные крысы					
		через 7 дней	% изме- нения	через 15 дней	% изме- нения	через 30 дней	% изме- нения
Г-6-ФД	0,239±0,001 (n=9)	0,209±0,0046 (n=7)	-12,5	0,2705±0,002 (n=9)	+16,5	0,301±0,003 (n=8)	+25,8
Р		<0,001		<0,001		<0,001	
6-ФГД	0,622±0,001 (n=12)	0,521±0,002 (n=8)	-16,2	0,778±0,003 (n=8)	+17,2	0,750±0,001 (n=8)	+10,2
Р		<0,001		<0,001		<0,001	

Таблица 4

Изменения в активности ТК и ТА в печени белых крыс
под влиянием перекиси бензоила

Ферменты	Контроль- ные крысы	Подопытные крысы					
		через 7 дней	% изме- нения	через 15 дней	% изме- нения	через 30 дней	% изме- нения
ТК	17,4±0,10 (n=14)	15,2±0,99 (n=9)	-12,7	19,1±0,45 (n=6)	+9,7	20,5±0,18 (n=9)	+17,8
Р		<0,01		<0,02		<0,01	
ТА	4,04±0,03 (n=8)	3,68±0,06 (n=7)	-8,8	4,56±0,03 (n=8)	+12,8	4,43±0,04 (n=8)	+9,6
Р		<0,001		<0,001		<0,001	

изучаемых ферментов в основном носят фазный характер, причем гидроперекись кумола вызывает более значительные сдвиги в активности ферментов, чем перекись бензоила. Эти данные согласуются с резуль-

татами исследований М. И. Агаджанова и соавт. [1], согласно которым окислительная активность хлоропрена, перекисей бензоила и гидроперекисей кумола колеблется в больших пределах. Более агрессивными оказались перекись хлоропрена, затем гидроперекись кумола и менее активной — перекись бензоила. Любопытно, что подобные данные в отношении токсичности гидроперекиси кумола и перекиси бензоила имеются в литературе [6].

Из данных табл. 1 видно, что спустя 7 дней после введения гидроперекиси кумола активность ферментов цикла снижается, причем окислительных ферментов (Г-6-Ф и 6-ФГД) значительно больше (27,3 и 38,7% соответственно), чем трансферментов. При этих же условиях опыта под влиянием перекиси бензоила (табл. 3) активность изучаемых ферментов снижается намного меньше (12,5 и 16,2%), хотя направленность метаболических превращений в обоих случаях идентична. Подобная направленность наблюдается и в отношении трансферментов.

Как видно из данных табл. 2—4, на 7-й день опыта под влиянием гидроперекиси кумола и перекиси бензоила наблюдается снижение транскетолазной и трансальдолазной активности, причем под влиянием гидроперекиси кумола их активность снижается несколько больше (17,9 и 15,9% соответственно), чем под влиянием перекиси бензоила (12,7 и 8,8% соответственно). Таким образом, на 7-й день опыта степень угнетения активности Г-6-ФД и 6-ФГД под влиянием гидроперекиси кумола и перекиси бензоила более выражена, чем угнетение активности ТК и ТА. На основании вышеизложенного можно заключить, что эффект воздействия органических перекисей на активность окислительных ферментов пентозного цикла выражен более сильно, чем на трансферменты.

Это приводит к предположению, что реакции ТК и ТА обратного направления, ведущие к появлению пентозофосфатов, могут при условиях затравки перекисями протекать более интенсивно, чем окислительные реакции прямого пути превращения пентозофосфата. Возможность образования рибозо-5-фосфата в ходе неокислительных реакций пентозного цикла подтверждают данные Кларка и соавт. [22]. Допускается, что этим путем компенсируется недостаток активности дегидрогеназ за счет реализации обратного направления неокислительных реакций этого пути, ведущих к образованию пентозофосфатов, необходимых для биосинтеза нуклеиновых кислот, обмен которых при этих условиях существенно нарушен [10]. Аналогичные сдвиги в метаболизме ПФП (пентозофосфатного пути) обмена обнаружены нами и при воздействии хлоропрена и пероксидированных ненасыщенных жирных кислот [12, 13, 16].

При удлинении срока введения перекисей до 15 дней имеет место противоположный эффект, т. е. повышение активности ферментов. Так, под влиянием гидроперекиси кумола активность 6-ФГД, Г-6-ФД возрастает на 22,9% против контроля, а активность 6-ФГД — на 15,9%. Подобные сдвиги наблюдаются и со стороны ТК и ТА (табл. 2), причем акти-

вирование обеих трансфераз описано в литературе при высоком пролиферативном пуле клетки.

Небольшая в физиологических условиях скорость использования тканями глюкозо-6-фосфата в реакциях пентозного цикла, по сравнению со скоростью гликолитического его расщепления, в патологических условиях резко меняется [15] за счет повышения активности Г-6-ФД. Увеличение в два раза активности Г-6-ФД, наблюдаемое в наших опытах, позволяет предположить преимущественное переключение метаболизма глюкозо-6-фосфата с гликолитического на ПФП. Это может быть результатом проявления специфической для печени приспособительной реакции, направленной на повышение снабжения печени пентозой и восстановленным НАДФ, необходимых для репарации поврежденной ткани печени. В этих же сроках эксперимента перекись бензоила и гидроперекись кумола вызывают аналогичные изменения в активности изучаемых ферментов.

При удлинении сроков до 30 дней под влиянием перекиси бензоила активность как окислительных, так и неокислительных реакций ПФП продолжает оставаться на высоком уровне (табл. 3 и 4) по сравнению с интактными животными. Представляет интерес тот факт, что при тех же условиях гидроперекись кумола резко подавляет активность окислительных ферментов на 28,9—40% (табл. 1) от исходного уровня, причем наблюдается синхронизм между окислительными и неокислительными реакциями.

Как известно, активность ферментов окислительных реакций ПФП коррелируется с интенсивностью митотических процессов и по времени совпадает с периодом регенерации. Можно допустить, что наблюдаемое снижение активности Г-6-ФД и 6-ФГД на 30-й день после введения гидроперекиси кумола связано с морфологической перестройкой печеночной паренхимы. Этот факт подтверждается как морфологическими, так и гистохимическими исследованиями А. Г. Аллавердяна, И. А. Манукяна [2, 8], показавших, что при длительном отравлении хлоропреном и органическими перекисями последние оказывают избирательное действие на элементы защитной системы организма (купферовские и плазматические клетки).

Полученные сдвиги в активности ферментов ПФП согласуются с теми глубокими изменениями микроструктуры печени, которые наблюдаются под влиянием органических перекисей. Следует отметить, что подобное соответствие наблюдается под влиянием хлоропрена [16] и при рентгенооблучении [3, 4]. Однотипные, но разные по интенсивности биохимические сдвиги в активности ферментов ПФП как под воздействием хлоропрена, так и органических перекисей, а также идентичные морфологические изменения подтверждают наше предположение об универсальности перекисного механизма действия этих двух веществ.

Таким образом, на основании анализа собственных данных можно заключить, что одним из механизмов нарушения ферментативных реакций ПФП пути обмена углеводов является липидная пероксидация, ко-

торая индуцируется органическими перекисями. Изменения в динамике активности ферментов как в сторону понижения, так и в сторону их повышения коррелируются интенсивностью процесса липидной пероксидации.

Кафедра биохимии Ереванского
медицинского института.

Поступила 29/XII 1976 г.

Լ. Վ. ՍԵՄԵՐՋՅԱՆ, Վ. Գ. ՄԵԼԻԿ-ԱՐՅԱՆ

ՕՐԳԱՆԱԿԱՆ ՊԵՐՕԻԶՍԻԴԵՆՐԻ ԱԶԴԵՑՈՒԹՅՈՒՆԸ ՊԵՆՏՈԶԱՅԻՆ ՑԻԿԼԻ ՖԵՐՄԵՆՏՆԵՐԻ ԱԿՏԻՎՈՒԹՅԱՆ ՎՐԱ

Ա մ փ ո փ ո ւ մ

Ուսումնասիրվել է բենզոլիլ պերօքսիդի և կոալո հիդրոպերօքսիդի ազդեցությունը պենտոզային ցիկլի ֆերմենտների ակտիվության վրա: Ցույց է տրված, որ սրանց ներդրության պարզարկումը առնետների լյարդում առաջացնում է գլյուկոզա-6-ֆոսֆատ և 6-ֆոսֆոգլյուկոնատ դեհիդրոգենազայի ակտիվության ֆազայի փոփոխություններ:

Նույնատիպ փոփոխություններ նկատվում է նաև տրանսալդոլազայի և տրանսկետոլազայի մոտ:

Ստացված արդյունքները ցույց են տալիս, որ կոալո հիդրոպերօքսիդը արգելակում է վերը նշված ֆերմենտների ակտիվությունը ավելի ուժեղ քան բենզոլիլ պերօքսիդը, ընդ որում դեհիդրոգենազների վրա այդ արգելակումը արտահայտված է ավելի ուժեղ, քան տրանսֆերմենտների վրա:

Ի տարբերություն կոալո հիդրոպերօքսիդից, բենզոլիլ պերօքսիդի թունավորման սկզբնական շրջանում ֆերմենտների ակտիվությունը իջնում է, իսկ հետագա ժամկետներում բարձրանում:

ЛИТЕРАТУРА

1. Агаджанов М. И., Мелик-Агаян Е. А., Мхитарян В. Г. Биол. ж. Армении, 1973, 26, 4, стр. 28.
2. Аллавердян А. Г. Автореферат докт. дисс. Ереван, 1970.
3. Гильгертова И., Шонка А. В. кн.: Пентозный цикл и ионизирующая радиация. Л., 1968, стр. 74.
4. Горелик Ю. Я., Русанов А. М. Там же, стр. 79.
5. Захарин Ю. Л. Вopr. мед. химии, 1968, 14, 4, стр. 348.
6. Карнажицкий В. Органические перекиси. М., 1961.
7. Кудрявцева Г. В. Автореферат канд. дисс. Л., 1974.
8. Манукян Н. А. Материалы X научной сессии, посвященной 50-летию образования СССР, Ер. гос. ин-та усовершенствования врачей. Ереван, 1972, стр. 47.
9. Мелик-Агаева Е. А. Автореферат канд. дисс. Ереван, 1975.
10. Микаелян Э. М., Мхитарян В. Г. Материалы XIX научной сессии Ереванского медицинского ин-та. Ереван, 1971, стр. 105.
11. Мхитарян В. Г. Докт. дисс. Ереван, 1964.
12. Мхитарян В. Г., Семерджян Л. В. Материалы научной сессии Ереванского медицинского института, посвященной 50-летию образования СССР. Ереван, 1972, стр. 326.

13. Мхитарян В. Г., Семерджян Л. В. Журн. exper. и клинич. мед. АН Арм.ССР, 1975, XV, 6, стр. 10.
14. Мхитарян В. Г., Бадалян Г. Е. Труды Ереванского мединститута, 1974, вып. XVI, стр. 204.
15. Разумовская Н. И., Плесков В. М., Петрова Т. Л. Биохимия, 1970, 1, стр. 196.
16. Семерджян Л. В., Мхитарян В. Г. Журн. exper. и клинич. мед. АН Арм.ССР, т. XVI, 5, стр. 153.
17. Glock G. F., McLean P. Biochem. J., 1953, 55, 400.
18. Glock G. F., McLean P. Biochem. J., 1954, 56, 171.
19. Brownstone Y. S., Denstedt O. F. Canad. J. Biochem., 1961, 39, 533.
20. Bruns F. H. et al. Biochem. Z., 1958, 330, 497.
21. Dische Z., Devl A. Blochim. biophys. Acta, 1960, 39, 140.
22. Clark M. G., Williams J. F., Kolos G., Hickie J. B. Int. J. Bloch., 1973, 3, 368.
23. Lowry O. H. et al. J. Biol. Chem., 1951, 193, 256.
24. Weltzel G., Buddecke E., Schneider F. Hoppe-Seyler's Z. physiol. Chem., 1961, 323, 211.
25. Weltzel G., Buddecke E., Schneider F., Pfell H. Hoppe-Seyler's Z. physiol. Chem. 1961, 325, 65.