

УДК 616—099+613.63

Л. В. МХИТАРЯН, В. Г. МХИТАРЯН

ВЛИЯНИЕ α -ТОКОФЕРИЛАЦЕТАТА НА АКТИВНОСТЬ НЕКОТОРЫХ ФЕРМЕНТОВ ЦИКЛА КРЕБСА В ГОЛОВНОМ МОЗГЕ КРЫС ПРИ ХЛОРОПРЕНОВОМ ОТРАВЛЕНИИ

Исследована активность цитратсинтазы, пируватдегидрогеназы и некоторых дегидрогеназ цикла Кребса в мозге крыс при внутрибрюшинном введении хлоропрена. Установлено, что активность цитратсинтазы после 15 ежедневных затравок резко возрастает и возвращается к исходному уровню на 30-й день опыта. При совместном введении хлоропрена с α -токоферилацетатом активность фермента на 15-й день опыта превышает контрольный уровень лишь на 24% и нормализуется на 30-й день.

Активность пируват- и α -кетоглутаратдегидрогеназ подвергается фазовым изменениям и на 30-й день опыта подавлена на 17,2 и 32,5% соответственно. НАД-зависимая малатдегидрогеназа во все сроки затравки подавлена на 26 и 43%.

При совместном введении хлоропрена с α -токоферилацетатом активность дегидрогеназ подвергается сравнительно небольшим изменениям и на 30-й день опыта находится в пределах нормы.

Многочисленными исследованиями В. Г. Мхитаряна [6] установлено, что токсическое действие хлоропрена на организм обусловлено его агрессивными перекисями, в связи с чем хлоропрен причислен к радиомиметическим веществам. В дальнейших исследованиях Е. А. Мелик-Агаян [5] показала, что у белых крыс хлоропрен вызывает избыточную липидную пероксидацию, особенно в печени и несколько слабее в мозге.

Известно, что цикл трикарбоновых кислот (ЦТК), или цикл Кребса, является универсальной окислительной системой клетки, связан с процессами фосфорилирования и играет важную роль в энергетическом балансе организма. В связи с этим определение интенсивности цикла путем изучения активности ферментов и интермедиатов при различных состояниях организма представляет определенный интерес.

Установлено [7], что внутрибрюшинное введение пероксидированных ненасыщенных жирных кислот (НЖК) вызывает фазовые изменения в активности ферментов ЦТК.

Л. С. Черкасова и соавт. [9] показали, что длительное рентгеновское облучение в малых дозах вызывает в митохондриях головного мозга фазовые изменения в активности пируватдегидрогеназы и дегидрогеназ ЦТК.

Согласно данным А. В. Утешева [10], проникающая радиация повышает у крыс в головном мозге активность НАДФ-зависимой малат-

дегидрогеназы, в то время как α -кетоглутарат- и НАД-зависимая малатдегидрогеназная активность остаются почти без изменения. Низкая активность дегидрогеназ ЦТК обнаружена в коре головного мозга под влиянием актиномицина Д [4].

Исследования Н. Е. Глушаковой, Е. М. Мисюк и др. [3] показали, что при гипотиреозе у крыс в головном мозге несколько повышается активность пируват-, изоцитрат- и α -кетоглутаратдегидрогеназ и, наоборот, несколько понижается активность сукцинат- и малатдегидрогеназ.

На основании литературного материала можно допустить, что активность ферментов ЦТК лабильна и может легко изменяться под влиянием различных факторов.

Настоящая работа посвящена изучению активности цитратсинтазы, пируватдегидрогеназы, α -кетоглутарат- и НАД-зависимой малатдегидрогеназы в головном мозге белых крыс при отравлении хлоропре-ном.

Методика и материал исследования

Опыты ставили на белых крысах-самцах весом 150—200 г, содержащихся на обычном рационе. Исследования проводили на трех группах животных. Первая группа—интактные крысы—служили контролем; вторая группа получала внутривенно хлоропре-н в количестве 600 мкмоль на 100 г веса животного, приготовленный на 5% растворе карбоксиметилцеллюлозы (0,1 мл); третья группа совместно с хлоропре-ном получала α -токоферилцетат в количестве 2 мг на 150 г веса животного (0,5 мл) в виде тонкой эмульсии, приготовленной на 10% водном растворе твин-80 (Fegan).

Затравку производили в течение 7, 15 и 30 дней. По истечении сроков затравки крыс декапитировали, в холодных условиях извлекали головной мозг и из коры готовили 10% гомогенат на 0,1 М фосфатном буфере рН 7,4.

Активность цитратсинтазы определяли по методу Нательсона и др. [12]. Реакционная смесь включала: 5 мкмоль оксалоацетат «Sigma» (США), 0,5 мкмоль АТФ-динатриевая соль «Reanal» (ВНР), 5 мкмоль ацетат натрия и 50 мкг КоА «Fluk» (Швейцария). Общий объем реакционной смеси доводили фосфатным буфером рН 7,4 до 2,4 мл. Смесь инкубировали при 37° в течение одного часа. Измерение производили на спектрофотометре МОМ-203 (ВНР) при длине волны 430 нм.

Активность фермента выражалась в мкмоль лимонной кислоты на 1 г ткани/час.

Активность пируватдегидрогеназы (КФ 1.2.4.1), α -кетоглутаратдегидрогеназы (КФ 1.2.4.2) и малатдегидрогеназы (КФ 1.1.1.39—40) определяли по Нордману и соавт. [13] в некоторой модификации, внесенной Н. Д. Ещенко и Ф. Е. Путиловой [8].

В состав инкубационной среды входили 3,3 мкмоль АТФ-динатриевая соль «Reanal» (ВНР), 4 мкмоль $MgCl_2$ и соответствующие субстраты: 33 мкмоль пируват Na «Хемапол» (ЧССР), 166 мкмоль Na_2CO_3 , 33 мкмоль α -кетоглутаровая кислота, 166 мкмоль dl-яблочная кислота и 33 мкмоль НАД⁺ (Reanal).

После 15 мин преинкубации к пробам добавляли по 0,5 мл феназин-метосульфата (1 мг), 1,0 мл тетразолия синего (1 мг), и после перемешивания пробы инкубировали в темноте при 37° в течение одного часа. Общий объем реакционной смеси составлял 4,5 мл.

Реакцию останавливали путем помещения проб в ледяную баню. После центрифугирования надосадочную жидкость сливали, к осадку добавляли 10 мл ацетона и после повторной центрифугации определяли интенсивность окраски на спектроколориметре «Spectol» (ГДР) при длине волны 570 нм.

Активность ферментов выражали в мкг формазана, образовавшегося в пробе за 1 час инкубации в расчете на 1 г ткани.

Результаты опытов обработаны методом вариационной статистики с применением критериев Стьюдента. Расхождение между отдельными сериями опытов считали достоверными, если уровень вероятности $P < 0,05$. В большей части опытов P был $< 0,001$.

Результаты исследования и обсуждение

Как видно из данных табл. 1, у интактных крыс количество лимонной кислоты в коре головного мозга составляет в среднем $2,37 \pm 0,07$ мкмоль на 1 г ткани, что согласуется с литературными данными

Таблица 1

Активность цитратсинтазы в мозге белых крыс при хроническом хлоропреновом отравлении (активность выражена в мкмоль лимонной кислоты час/г ткани)

Ферменты	Контрольные крысы	Под влиянием хлоропрена					
		через 7 дней	% изменения	через 15 дней	% изменения	через 30 дней	% изменения
Цитратсинтаза	$2,37 \pm 0,07$ (n=14)	$3,14 \pm 0,08$ (n=14)	+32,48	$4,92 \pm 0,13$ (n=14)	+107,5	$2,68 \pm 0,06$ (n=14)	+13
P		<0,001		<0,001		<0,01	

Под влиянием хлоропрена + α -токоферилацетат

Цитратсинтаза	$2,37 \pm 0,07$	$2,95 \pm 0,1$ (n=8)	+24,4	$2,87 \pm 0,069$ (n=8)	+21,0	$2,48 \pm 0,04$ (n=7)	+4,6
P		<0,01		<0,01		>0,05	

ми. Спустя 7 дней после затравки ее количество повышается и достигает $3,14 \pm 0,08$, превышая контрольный уровень на 32,48%, что свидетельствует о повышении активности фермента. С удлинением срока

затравки до 15 дней содержание лимонной кислоты продолжает резко возрастать и составляет $4,92 \pm 0,13$ $\mu\text{кмоль}$, что по сравнению с контролем больше на 107,5%. Дальнейшее удлинение срока затравки до 30 дней приводит к резкому снижению содержания лимонной кислоты, хотя ее количество все еще остается выше контрольного уровня на 13%.

Полученные данные свидетельствуют, что при хроническом хлоропреновом отравлении активность цитратсинтазы в коре головного мозга в течение 15-дневной затравки резко возрастает и возвращается к исходному уровню к 30-му дню. Наблюдаемые изменения почти полностью совпадают со сдвигами, обнаруженными нами под влиянием перекисидированных ненасыщенных жирных кислот [7] и являются новым доказательством в пользу перекисного механизма действия хлоропрена на организм.

При совместном введении хлоропрена с α -токоферилацетатом наблюдаемые изменения в активности цитратсинтазы заметно отличаются. Как видно из данных табл. 1, изменения в содержании лимонной кислоты как на 7-, так и на 15-й день опыта находятся почти в одинаковых пределах и превышают контрольный уровень лишь на 21—24%, достигая пределов нормы на 30-й день опыта. Таким образом, при совместном действии хлоропрена и α -токоферилацетата активность цитратсинтазы в коре головного мозга подвергается сравнительно небольшим изменениям.

Влияние хлоропрена на активность пируват-, малат- и α -кетоглутаратдегидрогеназ в коре головного мозга изучалось параллельно с активностью цитратсинтазы. Полученные результаты приведены в табл. 2.

Как видно из этих данных, у контрольных крыс в коре головного мозга активность вышеуказанных ферментов хотя и несколько отличается от литературных данных, однако по убывающей активности они совпадают с литературными данными [3, 4] и распределяются в следующем порядке: пируватдегидрогеназа > малатдегидрогеназа > α -кетоглутаратдегидрогеназа.

Высокая активность пируватдегидрогеназы в головном мозге свидетельствует об относительно большей интенсивности процессов окислительного декарбоксилирования пирувата. Как известно, образование ацетил КоА из пирувата определяется активностью пируватдегидрогеназы, причем важным фактором регуляции ее активности является взаимопревращение неактивной формы в активную. Показано, что соотношение двух форм пируватдегидрогеназы определяется величиной митохондриального отношения (АТФ)/(АДФ), причем повышение величины этого отношения приводит к увеличению доли неактивной формы.

В связи с этим изучение сдвигов в активности пируватдегидрогеназы под влиянием хлоропрена представляет большой интерес для выяснения активности цикла Кребса и состояния энергетических ресурсов в коре головного мозга при хлоропреновом токсикозе.

Таблица 2

Активность пируват-, α -кетоглутарат- и малатдегидрогеназ в гомогенатах коры головного мозга крыс при хроническом хлоропреновом отравлении (активность выражена в мкг формазина/час на г ткани)

Ферменты	Контроль- ные крысы	Подопытные крысы					
		через 7 дней	% измене- ния	через 15 дней	% измене- ния	через 30 дней	% измене- ния
Пируватдегидрогеназа Р	172,06 \pm 18 (n=19)	198,97 \pm 7,19 (n=8) <0,01	+15,0	222 \pm 11,31 (n=8) <0,01	+29,0	159,8 \pm 4,22 (n=8) <0,05	-17,2
α -кетоглутаратдегидрогеназа Р	60,22 \pm 1,22 (n=17)	42,95 \pm 1,11 (n=8) <0,001	-29,0	80,9 \pm 3,16 (n=8) <0,001	+34,0	40,85 \pm 2,56 (n=8) <0,001	-32,5
Малатдегидрогеназа Р	85,95 \pm 2,02 (n=12)	48,81 \pm 1,65 (n=9) <0,001	-43,1	63,1 \pm 2,15 (n=9) <0,001	-26,6	56,45 \pm 3,38 (n=9) <0,001	-34,5

Как свидетельствуют данные, приведенные в табл. 2, спустя 7 дней после затравки хлоропреном активность пируватдегидрогеназы несколько повышается (15%) и к 15-му дню превышает контрольный уровень на 29%. Дальнейшее удлинение срока затравки до 30 дней приводит к снижению ее активности, которая отстает от контроля на 17,2%. Тенденция к повышению активности пируватдегидрогеназы, особенно на 15-й день затравки, согласуется с высоким содержанием лимонной кислоты в коре головного мозга, а также со сдвигами в содержании пирувата в мозге при хлоропреновом отравлении [1].

В отличие от пируватдегидрогеназы α -кетоглутарат- и особенно малатдегидрогеназная активность подвергаются несколько иным изменениям.

Как видно из данных табл. 2, активность α -кетоглутаратдегидрогеназы подвергается фазным изменениям. К 7-му дню опыта ее активность понижается на 29%, затем повышается к 15-му дню на 34%, и к концу 30-го дня опыта она вновь снижается на 32,5%.

Сопоставляя происходящие в коре головного мозга сдвиги в активности этих двух мультэнзимных систем, можно заключить, что α -кетоглутаратдегидрогеназа более чувствительна и легче атакуется перекисями хлоропрена, вследствие чего к концу опыта (30-й день) ее активность снижается в два раза больше, чем активность пируватдегидрогеназы.

Несколько обособленно ведет себя малатдегидрогеназная активность. Как известно, она заметно отличается своим строением от пируват- и α -кетоглутаратдегидрогеназ, и ее активность значительно зависит от содержания НАД или НАДФ. Возможно, этим следует и объяснить некоторую особенность в поведении этого фермента при хлоропреновом отравлении. Как видно из данных табл. 2, активность малатдегидрогеназы уже на 7-й день затравки хлоропреном резко снижается (43,1%), затем к 15-му дню несколько повышается, однако все еще остается ниже контроля на 26,6% и вновь значительно снижается на 30-й день опыта, уступая контрольному уровню на 34,5%.

Резкое снижение активности НАД-зависимой малатдегидрогеназы, возможно, обусловлено несколькими причинами. Так, согласно данным Вейтцеля и сотр. [14], органические перекиси резко снижают содержание НАД. Кроме того, из литературы известно, что избыточная липидная перекисидация вызывает дефицит витамина Е, что было подтверждено также в наших исследованиях при введении хлоропрена и экзогенных липидных и органических перекисей [2].

Сравнительно недавно установлено [11], что дефицит витамина Е приводит к нарушению биосинтеза гема, вследствие чего наблюдаются также изменения в активности гемсодержащих ферментов, как например, каталазы. Подобные изменения были обнаружены и в отношении активности другого гемсодержащего фермента—триптофаноксидазы при введении хлоропрена и органических перекисей.

На основании этих данных было заключено, что одной из причин низкой активности триптофанооксидазы при хлоропреновой интоксикации является нарушение биосинтеза гема. Известно, что единственным источником НАД в клетках млекопитающих в отсутствие экзогенной никотиновой кислоты и ее амида является путь превращения триптофана в никотиновую кислоту. Таким образом, угнетение НАД-зависимой малатдегидрогеназы во все сроки затравки хлоропреном представляется следующей схемой:

Хлоропрен → избыточная липидная пероксидация →
дефицит витамина Е → нарушение биосинтеза гема →
угнетение активности триптофанооксидазы → нарушение
биосинтеза НАД → угнетение активности малатдегидрогеназы

На основании полученных данных можно заключить, что хлоропрен вследствие угнетения некоторых ключевых ферментов цикла Кребса вызывает значительные изменения в энергетическом обмене в коре головного мозга.

Особого внимания заслуживают данные, полученные в опытах при сочетанном действии хлоропрена и витамина Е. Результаты этой серии опытов представлены в табл. 3. Как видно из таблицы, активность малатдегидрогеназы на 7-й день опыта снижается на 23,7% вместо 43,1% без витамина Е. В последующие сроки опыта эффект витамина Е проявляется более сильно. Так, на 15-й день опыта активность малатдегидрогеназы угнетается лишь на 8,7%, а к 30-му дню на 4,7%, в то время как в опытах без витамина Е ее активность понижена на 26,6 и 34,5% соответственно.

Несколько иначе проявляется эффект витамина Е на активность пируват- и α -кетоглутаратдегидрогеназ. Как видно из данных табл. 3, на 7- и 15-й день опыта активность α -кетоглутаратдегидрогеназы все еще заметно подавлена, между тем как на 30-й день опыта ее активность значительно повышается и отстает от контроля всего на 7%.

При сопоставлении результатов, приведенных в табл. 2 и 3, можно заметить определенную разницу в активности пируватдегидрогеназы. Так, при затравке крыс одним хлоропреном активность фермента на 7- и 15-й день опыта повышена на 15 и 29% соответственно, в то время как при этих же сроках при совместном введении хлоропрена и витамина Е ее активность снижена на 17 и 12,6% соответственно.

При удлинении сроков опыта до 30 дней эффект витамина Е на пируватдегидрогеназу заметно меняется, и ее активность к этому сроку достигает почти контрольного уровня.

Таким образом, при совместном введении хлоропрена и витамина Е активность пируват-, малат- и α -кетоглутаратдегидрогеназ в коре головного мозга угнетается намного слабее, чем без витамина Е.

На основании фактического материала можно заключить, что при хроническом хлоропреновом отравлении вследствие угнетения некото-

Таблица 3

Активность пируват-, α -кетоглутарат- и малатдегидрогеназ в гомогенатах мозга белых крыс при совместном действии хлоропрена и α -токофирилацетата (мкг формазана/час на 2 ткани)

Ферменты	Контроль- ные крысы	Подопытные крысы					
		через 7 дней	% измене- ния	через 15 дней	% измене- ния	через 30 дней	% измене- ния
Пируватдегидрогеназа Р	172,06 \pm 1,8 (n=19)	142,66 \pm 3,3 (n=7) <0,01	-17	150,34 \pm 1,53 (n=7) <0,05	-12,6	167,03 \pm 5,4 (n=7) >0,05	-2,3
α -кетоглутаратдегидрогеназа Р	60,22 \pm 1,22 (n=17)	41,51 \pm 0,8 (n=7) <0,001	-31	47,09 \pm 2,8 (n=7) <0,01	-21,8	55,94 \pm 2,36 (n=7) >0,05	-7
Малатдегидрогеназа Р	85,95 \pm 2,02 (n=12)	65,63 \pm 1,01 (n=9) <0,001	-32,7	78,24 \pm 2,29 (n=8) <0,02	-8,7	81,92 \pm 2,57 (n=8) >0,05	-4,7

рых ключевых ферментов цикла Кребса нарушается энергетический обмен в коре головного мозга.

Кафедра биохимии Ереванского медицинского института

Поступила 25/V1977 г.

Լ. Վ. ՄԽԻԹԱՐՅԱՆ, Վ. Գ. ՄԽԻԹԱՐՅԱՆ

ԱՌՆԵՏՆԵՐԻ ՔԼՈՐԱՊՐԵՆԱՅԻՆ ԹՈՒՆԱՎՈՐՄԱՆ ՊԱՅՄԱՆՆԵՐՈՒՄ
 α -ՏՈԿՈՖԵՐԻԼԱՑԵՏԱՏԻ ԱԶԴԵՑՈՒԹՅՈՒՆԸ ՈՒՂԵՂԻ ՑԻՏՐԱՏ-
 ՄԻՆԹԱԶԱՅԻ, ՊԻՐՈՒՎԱՏ-, α -ԿԵՏՈԳԼՈՒՏԱՐԱՏ- ԵՎ ՄԱԼԱՏԳԵ-
 ՀԻԴՐՈԳԵՆԱԶՆԵՐԻ ԱԶԴԵՑՈՒԹՅԱՆ ՎՐԱ

Ա մ փ ն փ ու մ

Սպիտակ առնետների մոտ ուսումնասիրվել է քլորոպրենի ազդեցությունը ուղեղի ցիտրատսինթազայի, պիրուվատ-, α -կետոգլուտարատ- և մալատդեհիդրոգենազների ակտիվության վրա: Ցույց է տրված, որ ցիտրատսինթազայի ակտիվությունը փորձի 15-րդ օրը խիստ բարձրանում է և վերադառնում է նորմայի փորձի 15-րդ օրը խիստ բարձրանում է և վերադառնում է նորմայի փորձի 30-րդ օրը:

Քլորոպրենի և α -տոկոֆերիլացետատի համատեղ ներարկումից ֆերմենտի ակտիվությունը փորձի 15-րդ օրը բարձրանում է ընդամենը 24 տոկոսով և մոտենում կոնտրոլ տվյալներին փորձի 30-րդ օրը:

Պիրուվատ և α -կետոգլուտարատդեհիդրոգենազայի ակտիվությունը փորձի նույն պայմաններում ենթարկվում է ֆազային փոփոխությունների և 30-րդ օրը լինում է ճնշված 17,2 և 32,5 տոկոսով:

Քլորապրենի և α -տոկոֆերիլացետատի համատեղ ներարկման պայմաններում վերը նշված դեհիդրոգենազների ակտիվությունը փորձի 7 և 15-րդ օրերին մի փոքր իջած է և մոտ է կոնտրոլին փորձի 30-րդ օրը:

Л И Т Е Р А Т У Р А

1. Агаджанов М. И. Автореферат канд. дисс. Ереван, 1966.
2. Агаджанов М. И., Мелик-Агаян Е. А., Мхитарян В. Г. Биологич. журнал Армении, 1974, XXVII 2, стр. 28.
3. Глушакова Н. Е., Мисюк Е. М., Таринович Г. Л. Проблемы эндокринологии, 1976, XXII, 1, стр. 50.
4. Ещенко Н. Д., Путилина Ф. Е. Сб. Нервная система. Л., 1972, II, стр. 82.
5. Мелик-Агаян Е. А. Автореферат канд. дисс., Ереван, 1975.
6. Мхитарян В. Г. Автореферат докт. дисс. Ереван, 1964.
7. Мхитарян Л. В., Геворкян Д. Н., Мхитарян В. Г. Журнал эксперим. и клинич. медицины АН Арм.ССР, 1976, XVI, 1, стр. 66.
8. Путилина Ф. Е., Ещенко Н. Д. Вестник ЛГУ, 1969, 21, 4, стр. 42.
9. Черкасова Л. С., Новик В. А., Цыхун Г. Ф. Тезисы докладов симпозиума: Биоэнергетика при лучевом поражении живых организмов. Л., 1973, стр. 62.

10. Утешев А. В. Тезисы докладов симпозиума: Биоэнергетика при лучевом поражении живых организмов. Л., 1973, стр. 57.
11. Nair P. P. Ann. of the New-York Academy of Sciences, 1972, 203, 53.
12. Natelson S., Pincus J., Lugovoy J. J. Biol. Chem., 1948, 175, 745.
13. Nordman J., Nordman R., Gauchery O. Bull. Soc. Chim. Biol. (Paris), 1951, 33, 1826.
14. Weltzel G., Buddecke E., Schneider F. Z. physiol. Chem., 1961, 323, 3/6, 211.