

УДК 612.015.1

Л. А. ЧИЛИНГАРЯН, В. Г. МХИТАРЯН

ВЛИЯНИЕ ЛИПИДНОЙ ПЕРОКСИДАЦИИ НА АКТИВНОСТЬ  
УДФ-ГЛЮКУРОНАТ: ГЛЮКУРОНИЛТРАНСФЕРАЗЫ В МОЗГЕ  
И ПЕЧЕНИ БЕЛЫХ КРЫС

Определяли активность УДФ-глюкуронат: глюкуронилтрансферазы в гомогенатах мозга и печени белых крыс после семи- и четырнадцатидневого введения им пероксидированных и непероксидированных ненасыщенных жирных кислот. Показано, что в обеих тканях активность фермента подавляется в прямой зависимости от ненасыщенности кислоты, степени ее пероксидации и срока введения.

УДФ-глюкуронат: глюкуронилтрансфераза (УДФГКТ) (К. Ф. 2.4.1. 17) на сегодняшний день является довольно хорошо изученным ферментом, выполняющим в организме ряд весьма важных функций как в синтезе мукополисахаридов, связывании билирубина, так и в метаболизме ряда чужеродных соединений, ксенобиотиков, лекарственных средств и канцерогенов, являющихся нуклеофильными субстратами.

УДФГКТ является относительно неспецифичным ферментом, связывающим имеющиеся в среде соединения с акцепторными кислотными, спиртовыми, фенольными или аминными группами, включая также гидростероиды (прегнан-3 $\alpha$ , 20 $\alpha$ -диол, андростерон, тестостерон, эстрон и т. д.). Во всех этих случаях эффект реакций конъюгации сводится к прекращению биологической активности связываемого субстрата, особенно чужеродного. Известно, что большая часть чужеродных соединений в организме претерпевает в основном два типа превращений: I—монооксигеназное окисление, восстановление, гидролиз и II—конъюгацию. При этом конъюгации может подвергаться как само чужеродное соединение, так и его метаболиты, представляющие собой электронофильные соединения, как например, эпоксиды, свободные радикалы, продукты N-окисления ароматических аминов.

УДФГКТ является микросомальным ферментом [8, 16], причем у различных животных локализация фермента в микросомах различная: так, у морских свинок молекулы энзима расположены на мембранной поверхности, тогда как у крыс большая часть активности представлена внутри самой мембраны [12]. Воск и другие [6] сумели выделить и очистить 2 формы этого фермента с различной субстратной специфичностью и индуцибельностью (3-метилхолантрен и фенобарбитал).

Работами Storey [20—22] доказана тиоловая природа фермента, причем с использованием соединений трехвалентного мышьяка дока-

зано наличие двух тиоловых групп, расположенных близко друг от друга.

УДФГКТ представлена во многих тканях: в печени, в коре почек, в слизистой желудка, в тонких отделах кишечника [13]. Об активности фермента в мозговой ткани имеются лишь отдельные работы [2].

Нами была поставлена задача изучения активности УДФГКТ в мозге и печени белых крыс при повышенной липидной пероксидации в этих тканях.

### Материал и методика

Опыты ставили на белых крысах-самцах массой 120—130 г. Одной группе животных вводили ежедневно внутривентриально по 0,1 мл ненасыщенных жирных кислот (НЖК) (олеиновую, линолевую, линоленовую) на 100 г массы животного, другой — пероксидированные НЖК в тех же количествах.

Через 7 и 14 суток от начала введения соответствующей жирной кислоты животных замораживали в жидком азоте. Активность фермента определяли по методу Dutton и Storey [9] в гомогенатах мозговой и печеночной ткани. Инкубационная смесь состояла из 0,2 мл буфера (0,5 М Tris, содержащий 0,15 М  $MgCl_2$ ) с pH 7,4, избытка сублимированного ортоаминофенола (в конечной концентрации  $1 \cdot 4 \cdot 10^{-4}$  М), УДФ-глюкуроновой кислоты (фирмы Sigma, США, конечной концентрации  $5 \cdot 10^{-4}$  М) и 1 мл гомогената. Общий объем доводили до 3 мл и инкубировали при 37° в течение 20 мин с постоянным встряхиванием. Реакцию останавливали добавлением 3 мл осадителя, состоящего из равных объемов 2 М фосфата и 2 М трихлорацетата (pH 2,1). После центрифугирования к 4 мл надосадочной жидкости с трехминутными интервалами добавляли 1 мл 0,1%  $NaNO_2$ , 1 мл 1% сульфата аммония с целью диазотирования образовавшегося о-аминофенилглюкуронида с дальнейшим сопряжением с нафтилэтилендиаминдигидрохлоридом. Интенсивность окраски определяли через 2 часа инкубации в темноте при  $\lambda = 550$  на спектрофотометре Specol (ГДР). Активность фермента выражали по количеству нмоль образовавшегося о-аминофенилглюкуронида на мг белка. Тканевой УДФ-глюкуронат исключали постановкой контрольного опыта без добавления УДФ-глюкуроновой кислоты. Белок определяли по методу Lowry и др. [17]. В качестве стандарта был использован кристаллический бычий сывороточный альбумин (Koch—Light, Англия). Полученные данные представлены в табл. 1 и 2.

### Обсуждение результатов

Как видно из таблиц, уже в первые 7 дней введения НЖК как в печени, так и в мозговой ткани наблюдается понижение активности УДФГКТ, особенно выраженное под влиянием пероксидированных НЖК. К 14-му дню это подавление активности значительно усугубля-

Таблица 1

Изменения в активности УДФГКТ в мозге белых крыс под влиянием  
пероксидированных и непероксидированных НЖК (в нмолях/мг белка)

Контроль	Олеиновая кислота		Линолевая кислота		Линоленовая кислота		Пероксидир. олеиновая кислота		Пероксидир. линолевая кислота		Пероксидир. линоленовая кислота	
	7 дней	14 дней	7 дней	14 дней	7 дней	14 дней	7 дней	14 дней	7 дней	14 дней	7 дней	14 дней
0,752±0,017	0,733±0,01	0,713±0,011	0,608±0,007	0,43±0,005	0,583±0,013	0,41±0,006	0,462±0,006	0,24±0,004	0,44±0,004	0,297±0,02	0,214±0,037	0,15±0,025
(10)	(7)	(9)	(7)	(6)	(9)	(7)	(8)	(6)	(7)	(9)	(7)	(8)
P	>0,05	>0,05	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001
%	-2,53	-5,18	-19,5	-42,4	-22,47	-45,47	-38,57	-68,1	-41,35	-60,5	-71,54	-82,5

Таблица 2

Изменения в активности УДФГКТ в печени белых крыс под влиянием  
пероксидированных и непероксидированных НЖК (в нмолях/мг белка)

Контроль	Олеиновая кислота		Линолевая кислота		Линоленовая кислота		Перокс. олеиновая кислота		Перокс. линолевая кислота		Перокс. линоленовая кислота	
	7 дней	14 дней	7 дней	14 дней	7 дней	14 дней	7 дней	14 дней	7 дней	14 дней	7 дней	14 дней
10,6±0,48	9,18±0,22	7,752±0,41	7,86±0,55	5,985±0,49	6,327±0,58	4,959±0,63	4,959±0,35	4,16±0,24	4,218±0,4	2,679±0,31	3,762±0,38	1,482±0,45
(9)	(6)	(6)	(7)	(5)	(6)	(6)	(6)	(6)	(5)	(7)	(5)	(6)
P	>0,05	<0,002	<0,002	<0,002	<0,002	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001
%	-1,33	-26,8	-25,8	-44,3	-40,3	-53,2	-53,2	-60,7	-60	-74,7	-64,5	-86

Примечание. В скобках указано количество опытов.

ется. Линолевая и линоленовая кислоты в течение 14 суток подавляют активность фермента в печени почти наполовину, тогда как олеиновая — только до 26,8% (в мозге подавление незначительное — 2—5%). Зато под влиянием перекисидированных кислот, в том числе олеиновой, наблюдается резкое уменьшение активности фермента во все сроки введения НЖК (68,1% в мозге и 61% в печени). Максимальное снижение активности фермента и в мозге (82,5%), и в печени (86%) наблюдается под влиянием перекисидированной линоленовой кислоты при ее 14-дневном введении. Эта постоянная тенденция к подавлению активности, видимо, обусловлена усилением липидной перекисидации в мембранном аппарате клетки и, в частности, в микросомах. Действительно, липидная перекисидация, во-первых, вызывает деструкцию тиоловых ферментов. Близко расположенные тиоловые группы в молекуле УДФГКТ делают ее более уязвимой, тем более что даже добавление таких тиолов, как цистеин и глутатион, не всегда ведет к реактивации фермента.

Помимо этого, установлено, что для полной энзимной активности УДФГКТ необходима соответствующая фосфолипидная среда, которая обеспечивается микросомальной мембраной [3, 4, 10, 11, 23]. Дегградация фосфолипидов или делипидизация мембран вызывает полную инактивацию фермента [10, 23]. Добавление фосфолипидов (кроме фосфатидилсерина) восстанавливает ферментную активность, что связано, видимо, с перестройкой апофермента [10].

Наши исследования производились в гомогенатах мозга и печени в условиях повышенной перекисидации, когда наблюдается резкое уменьшение двойных связей и аминного азота в липидных экстрактах [19].

Работами Bidlack [5] и М. И. Агаджанова [1] показано резкое уменьшение во фракциях фосфатидилэтанолamina и фосфатидилхолина при возрастании количества липидных перекисей в тканях, что, как уже отмечено, отражается на активности УДФГКТ.

Касаясь перекисидного окисления и мембраносвязанных ферментов микросом, естественно, нельзя обойти функционально тесно связанный с УДФГКТ фермент — цитохром Р-450 [18]. Цитохром Р-450 в процессах перекисидного окисления участвует двумя возможными механизмами: 1) образования на SH-группах апофермента радикалообразующих центров, инициирующих реакции перекисидного окисления; 2) нерадикального разложения гидроперекисей ненасыщенных жирных кислот. При этом происходит трансформация цитохрома Р-450 в высокоспиновой Р-420 [15], обладающий высокой гидропероксидазной активностью. Соответственно Р-450 перестает участвовать в процессах гидроксилирования, продукты которого сами подавляют липидную перекисидацию, с одной стороны, и являются субстратами УДФГКТ, с другой.

В целом нужно отметить, что оба фермента — УДФГКТ и цитохром Р-450 — находятся в тесной корреляции по своим условиям действия, активируются ( $Mg^{+2}$ ) и индуцируются (фенобарбитал) одними и теми же реагентами [7]. Наконец, по выполняемым функциям эти ферменты как бы дополняют друг друга: УДФГКТ конъюгирует

продукты окисления, связанного с цитохромом Р-450, обеспечивая процесс детоксикации различных ксенобиотиков, фенолов, лекарственных средств и даже канцерогенов.

Таким образом, в условиях повышенной липидной пероксидации наблюдается подавление активности УДФГКТ, что, по-видимому, обусловлено рядом причин: деструкцией тиоловых ферментов—цитохрома Р-450 и самой УДФГКТ, конверсией цитохрома Р-450 в неактивную форму Р-420 с соответственным нарушением гидроксирования и фосфолипидного состава мембран.

Кафедра биохимии Ереванского медицинского института

Поступила 3/IX 1980 г.

Լ. Ա. ՉԻԼԻՆԳԱՐԻԱՆ, Վ. Գ. ՄԽԻԹԱՐԻԱՆ

ԼԻՊԻԴԱՅԻՆ ՊԵՐՕՔՍԻԴԱՅԻՆ ԱԶԴԵՑՈՒԹՅՈՒՆԸ ՈՒԿՏ-ԳԼՅՈՒԿՈՒՐՈՆԱՏԻ ԱԿՏԻՎՈՒԹՅԱՆ ՎՐԱ. ԳԼՅՈՒԿՈՒՐՈՆԻԼ-ՏՐԱՆՍՖԵՐԱԶԱՆ ՍՊԻՏԱԿ ԱՌՆԵՏՆԵՐԻ ԼՅԱՐԴՈՒՄ

Սպիտակ առնետներին ներորովայնային եղանակով ներարկել են 7 և 14 օրվա ընթացքում չհագեցած ճարպաթթուներ (օլեինաթթու, լինոլաթթու և լինոլենաթթու) և նրանց պերօքսիդացման արգասիքները:

Հետադոստոթյունները ցույց են տվել ֆերմենտի ակտիվության անկում՝ կախված թթուների չհագեցվածությունից և նրանց ներարկման երկարատևությունից:

L. A. CHILINGARIAN, V. G. MKHITARIAN

THE INFLUENCE OF LIPID PEROXIDATION ON THE  
UDP-GLUCURONATE: GLUCURONYL-TRANSFERASE ACTIVITY  
IN THE RAT BRAIN AND LIVER

Unsaturated fatty acids and their hydroperoxides have been administered to rats.

The decrease of UDP-glucuronate, glucuronyl-transferase activity was observed proportional to the time of the fatty acids administration and the degree of their unsaturation.

Л И Т Е Р А Т У Р А

1. Агаджанов М. И., Овакимян С. С., Мхитарян В. Г., Карагезян К. Г. Укр. биохим. ж., 1979, 51, 1, 23.
2. Назарегян Э. Е. Канд. дисс. Ереван, 1973.
3. Attwood D., Graham A. B., Wood G. C. Biochem. J. 1971, 123, 875.
4. Berry C. S., Caldecourt M., Hallinan T. Biochem. J. 1976, 154, 783.
5. Bidlack W. K., Tappel A. L. Lipids, 1973, 7, 564.

6. Bock K. V., Kittel J., Josting D. In: Conjugation Reactions in Drug Biotransformation, (A. Aitio, Ed.) Amsterdam: Elsevier (North-Holland), 1978, 357.
7. Capdevila J. Morello A., Perry A., Agosin M. Biochemistry, 1973, 12, 1445.
8. Dutton G. T. and Storey I. D. E. Biochem. J., 57, 275 (1954).
9. Dutton G. T. and Storey I. D. E. Methods in Enzymology. v. 5, 1962, New York and London. Acad. Press, 10, p. 159.
10. Gorsky T. P., Kasper S. B. Biochemistry, 1978, 17, 22, 4600.
11. Graham A. B., Pechey D. T., Toogood K. C., Thomas S. B. and Wood G. C. Biochem. J. 1977, 163, 117.
12. Graham A. B., Pechey D. T., Wood G. C. Mol. Pharmacol., 1979, 15, 2, 375.
13. Hänninen O., Aitio A., Hartala K. Scand. J. Gastroenterol. 1968, 3, 5, 461.
14. Högberg J., Bergstrand A., Jacobson I. Eur. J. Biochem., 1973, 37, 51.
15. Hrycay E. G. Fed. Proc., 1974, 33, 371.
16. Isselbacher K. J. J. Recent Progr. Hormone Res., 1956, 12, 134.
17. Lowry D. H., Rosebrough N. J., Farr A. L. and Randall R. J. J. Biol. Chem., 1951, 193, 265.
18. Morello A., Repetto Y. Biochem. J. 1979, 177, 809.
19. Niehaus W. G., Samuelson B. Eur. J. Biochem. 1968, 6, 126.
20. Storey I. D. E. Biochem. J., 1964, 90, 15.
21. Storey I. D. E. Biochem. J., 1965, 95, 201.
22. Storey I. D. E. Biochem. J., 1965, 95, 209.
23. Tukey Robert H., Billings, Autor A. P., Tephty Th. R. Biochem. J. 1979, 179, 1, 59-65.