

4. Дегтярев И. А., Заиков Г. Е. Хим. фарм. журнал, 1965, 8, XIX, с. 910.
5. Дробинская И. Е., Жигачева И. В., Каплан Э. Я. Биохимия, 1982, 47, 1, с. 81.
6. Меерсон Ф. З., Малышев В. В., Петрова В. А., Лифантьев В. И. Кардиологиз, 1982, 9, с. 85.
7. Сутковой Д. А., Барабай В. А. Укр. биохим. ж., 1985, 57, 2, с. 79.
8. Храпова Н. Г. Биоксиданты в регуляции метаболизма в норме и патологии. М., 1982, с. 59.
9. Якушев В. С., Давыдов В. В. Укр. биохим. ж., 1982, 54, 4, с. 389.
10. Duggan D. E. Arch. Biochem. Biophys., 1959, 84, 116.
11. King G. E. J. Biol. Chem., 1963, 238, 9, 4037.
12. Lowry O. H., Rosebrough N. J., Farrar A. L., Randall R. J. J. Biol. Chem., 1951, 198, 265.
13. Mc Knight R. C., Hunter F. E. J. Biol. Chem., 1966, 241, 2757.
14. Schnaltman C., Erwin V. G. a Greenzwall J. W. J. Cell. Biol., 1967, 32, 719.

УДК 612.822+616.36] : 599.323

Л. А. ЧИЛИНГАРЯН, В. Г. МХИТАРЯН

ИЗМЕНЕНИЯ В АКТИВНОСТИ β -ГЛЮКУРОНИДАЗЫ В МОЗГЕ И ПЕЧЕНИ БЕЛЫХ КРЫС ПОД ВЛИЯНИЕМ ЧЕТЫРЕХХЛОРИСТОГО УГЛЕРОДА И НЕКОТОРЫХ ИСКУССТВЕННЫХ АНТИОКСИДАНТОВ

Определялась активность фермента β -глюкуронидазы под влиянием четыреххлористого углерода в различные сроки после однократного введения и через трое суток ежедневного введения. Выявлено повышение активности фермента почти во все сроки.

При совместном введении четыреххлористого углерода с антиоксидантами: фенолом-52 и фенозаком-28 активность фермента значительно снижается.

β -глюкуронидаза (КФ. 3. 2. 1. 31) — фермент с широким функциональным назначением, представленный в различных субклеточных образованиях. Он выполняет важную роль в гидролизе глюкуронидов, являющихся продуктом как расщепления углеводных биополимеров, так и конъюгации ксенобиотиков, желчных пигментов и различных чужеродных соединений, образующихся при двухферментном цикле сопряжения и десопряжения.

На сегодняшний день интерес к этому ферменту возрос, т. к. при ряде патологических процессов активность его резко возрастает, что используется в качестве вспомогательного диагностического теста [2—4, 9, 15, 16]. Необходимо указать также на различное распределение активности фермента в разных субклеточных образованиях клетки.

Известно, что β -глюкуронидаза используется нередко как маркер лизосом, хотя ее активность представлена в клетке на 40% нелизосомально. По мнению Fishman [8], β -глюкуронидаза может служить структурным белком эндоплазматического ретикулума. Значительная часть нелизосомальной активности фермента представлена в микросомальной фракции.

Что касается самого фермента, то это либо ферментная система, либо фермент с двумя независимыми центрами связывания в активном центре. В наших предыдущих работах изучалась активность β -глюкуронидазы в мозге и печени белых крыс в условиях повышенной липид-

ной перекиси, инициированной введением ненасыщенных жирных кислот и продуктами их перекисления [5].

В настоящем исследовании мы изучали влияние четыреххлористого углерода (CCl_4) на активность β -глюкуронидазы в мозге и печени белых крыс в различные сроки его введения, а также совместное влияние CCl_4 с антиоксидантами фенолового ряда, синтезированными в НИИ химполимер.

Материал и методы

Опыты были поставлены на белых крысах-самцах массой 120—130 г. Контролем служили интактные крысы. Подопытные животные были разделены на 3 основные группы: I вводили только CCl_4 в дозе 0,1 мл/100 г, II— CCl_4 совместно с фенолом-52, III— CCl_4 с фенозаном-28. Животных забивали через 1, 3 часа и 1 день после затравки. В другой серии опытов всем трем группам животных производили затравку ежедневно на протяжении трех дней, после чего животных забивали. Исследования проводили на 1% гомогенатах мозга и 0,1% гомогенатах печени по методу Koldovsky и др. [10]. Инкубационная смесь состояла из 2 мл ацетатного буфера с pH—4,0, р-нитрофенил- β -D-глюкуронида (фирмы Calbiochem) в конечной концентрации 0,5 ммоль и 1 мл гомогената. Общий объем смеси составлял 4,0 мл. Смесь помещали на 60 мин в термостат при t —37°. Реакцию останавливали добавлением 1 мл 1М K_2CO_3 с образованием желтой окраски от высвободившегося р-нитрофенола.

Интенсивность окраски определялась спектрофотометрически при 420 нм на Spectromot-203. Активность фермента выражали в μ кмоль/мл белка/60 мин. Содержание белка в гомогенатах определялось по Lowry [11] с использованием в качестве стандарта кристаллического бычьего сывороточного альбумина (Koch-Light, Англия).

Результаты и обсуждение

Результаты, полученные в наших исследованиях, отображены на рис. 1, 2. Как видно на рис. 1, в мозге белых крыс в первый же час после введения CCl_4 наблюдается повышение активности β -глюкуронидазы примерно на 50%, после чего в трехчасовом промежутке отмечается некоторое снижение с последующим резким повышением (примерно на 125% по сравнению с контролем) к однодневному сроку. При трехразовом ежедневном введении активность повышается до 222%. На рисунке эта точка для наглядности присоединена к точке суточного повышения.

Аналогичные изменения под влиянием CCl_4 наблюдаются в печени: повышение активности через час после введения CCl_4 (примерно на 70% выше контроля) с последующим снижением (приблизительно до 10%) через 3 часа с дальнейшим резким подъемом через сутки (на 175% выше контрольного уровня). При трехразовом ежедневном введении уровень активности превышает контрольный на 212% (рис. 2).

Анализ полученных данных показывает соответствие сдвигов, наблюдаемых под влиянием CCl_4 , другим биохимическим и цитологи-

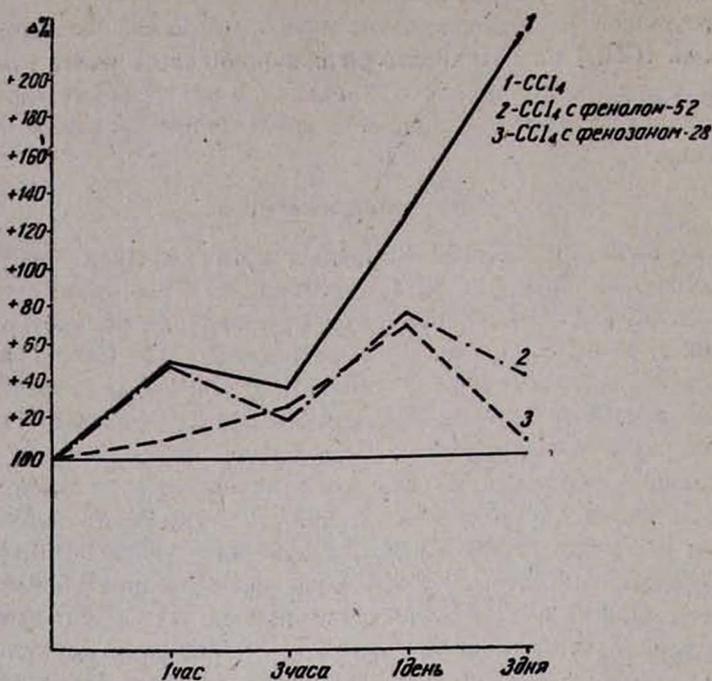


Рис. 1. Изменения в активности β-глюкуронидазы в мозге белых крыс в различные сроки введения CCl₄ и CCl₄ с антиоксидантами.

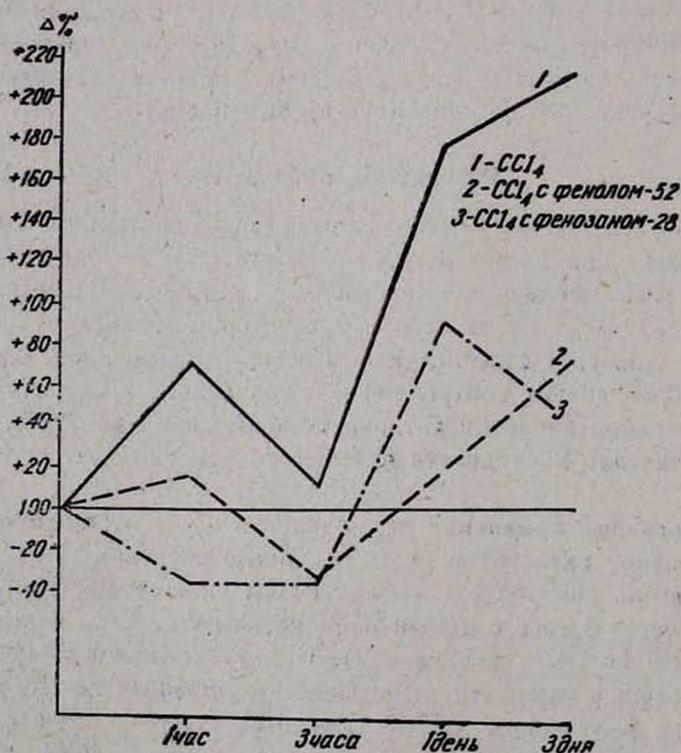


Рис. 2. Изменения в активности β-глюкуронидазы в печени белых крыс в различные сроки введения CCl₄ и CCl₄ с антиоксидантами.

ческим изменениям, описанным в литературе. А. И. Арчаковым и др. [1] показано токсическое действие CCl_4 уже в первые часы после его введения на мембраны эндоплазматического ретикулама.

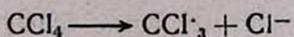
Rees и др. [13] показали, что разрыв лизосом под влиянием CCl_4 происходит только через 4 часа после введения яда. Оказывается, что на высокоочищенную фракцию лизосом CCl_4 не оказывает повреждающего действия, а действует только в случае наличия в препарате эндоплазматического ретикулама [6]. Интересно отметить также, что через несколько часов после введения CCl_4 в цитозоле клеток наблюдается резкое повышение ионов Ca^{2+} , который, в свою очередь, известен как активатор β -глюкуронидазы.

Данные, полученные в наших исследованиях, можно объяснить непосредственным токсическим действием CCl_4 в первый час его введения на нелизосомальные образования клетки, в силу чего наблюдается первичный выброс β -глюкуронидазы в первый же час после введения яда с некоторым снижением ее активности к 3-му часу после введения. С разрывом лизосом через 4 часа наблюдается не только выброс фермента из лизосом, но и активирование его ионами Ca^{2+} , с чем и связано столь резкое повышение его активности через сутки. При трехразовом ежедневном введении CCl_4 в тканях наблюдаются выраженные некротические участки, что приводит к гибели животных.

Механизм повреждающего действия CCl_4 обусловлен, по-видимому, рядом факторов. Как доказано, основным участком метаболизма CCl_4 в клетке является эндоплазматический ретикулум. Вся активность системы, метаболизирующей CCl_4 , обнаруживается во фракции микросом. Именно здесь находится и ферментная система, тесно связанная с УДФ-глюкуронилтрансглюкуронилазой, конъюгирующей продукты гидроксирования чужеродных веществ, осуществляемого с помощью цитохрома Р-450. Для метаболизма CCl_4 необходима также АДФ-специфичная цепь переноса электронов в микросомах и ее конечный акцептор электронов—цитохром Р-450.

Таким образом, начальный пусковой механизм повреждающего действия CCl_4 приходится на мембраны эндоплазматического ретикулама, где вовлекается цитохром Р-450 и сопряженная система глюкуроноидации и деглюкуроноидации.

Второй этап повреждающего действия CCl_4 обусловлен как влиянием его метаболитов, так и в основном прооксидантным действием радикалов, образующихся при гомолитическом расщеплении CCl_4 :



Метаболиты CCl_4 , образующиеся обычно в весьма небольших количествах, могут создавать локально высокие концентрации в определенных гидрофобных участках биомембран и тем самым повреждать их, менять физико-химические параметры, соответственно повышать проницаемость или способствовать их разрыву. Повышение активности β -глюкуронидазы в этих условиях можно объяснить солубилизацией фермента и его выбросом в цитоплазму. В частности, у голубей превалирует именно этот механизм повреждающего действия CCl_4 [7].

Однако у крыс решающую роль играет индукция чрезмерного перекисного окисления липидов. Образующийся в липидной фазе при гомолитическом расщеплении CCl_4 радикал CCl_3 , атакуя метиленовые мостики ненасыщенных жирных кислот с отрывом водорода, создает инертную молекулу хлороформа, попутно генерируя радикалы ненасыщенных жирных кислот.

Результаты наших ранних исследований по активности β -глюкуронидазы в условиях чрезмерной липидной перекисидации, инициируемой введением пероксидированных жирных кислот, идентичны данным, полученным под влиянием CCl_4 , что, несомненно, приводит к выводу о преимущественно прооксидантном механизме действия CCl_4 на мембранный аппарат клетки [5]. Подтверждением этого являются и литературные данные, доказавшие с помощью метода измерения дневной конъюгации интенсификацию перекисного окисления липидов уже в ранние сроки введения CCl_4 [14]. В то же время доказано защитное действие антиоксидантов (в частности витамина Е) при предварительном введении их до CCl_4 [12].

В данной работе было исследовано также воздействие антиоксидантов фенолового ряда—фенола-52 и фенозана-28 при совместном их введении с CCl_4 .

Как видно из рисунков, оба антиоксиданта имеют тенденцию к нормализации активности β -глюкуронидазы, хотя и механизм их воздействия совершенно неоднозначен. Так, фенол-52 в мозге уже с первых же часов подавляет активность фермента по сравнению с CCl_4 , тогда как фенозан-28 почти не оказывает влияния при часовом интервале после введения. В остальные сроки под действием этих антиоксидантов наблюдается примерно одинаковое подавление активности фермента. Необходимо отметить, что фенол-52 при ежедневном введении вместе с CCl_4 доводит активность фермента почти до нормы.

В печени действие антиоксидантов имеет ту же направленность, причем фенозан-28 здесь оказывается более действенным. Он за первый же час подавляет активность β -глюкуронидазы ниже контрольного уровня, поддерживая активность фермента на этом уровне до трехчасового срока. Под влиянием фенола-52 активность β -глюкуронидазы постепенно подавляется, спускаясь к 3-му часу после введения ниже контрольных цифр (до уровня подавления под влиянием фенозана-28).

К суткам активность фермента повышается выше контрольного уровня, но сравнительно с введением CCl_4 остается почти вдвое ниже под влиянием фенозана-28 и почти в восемь раз ниже под влиянием фенола-52. Данные нашей работы дают основание предполагать о более сильном антиоксидантном действии у фенола-52, чем у фенозана-28. При трехразовом ежедневном совместном введении антиоксидантов с CCl_4 активность фермента в три-четыре раза ниже, чем при введении одного CCl_4 .

Механизм действия антиоксидантов, видимо, довольно сложен. Возможно, имея гидрофобные группы, они встраиваются в структуры мембран, способствуя их уплотнению и нормальной компарментализации ферментов. Помимо этого, являясь фенолами, своей гидроксиль-

ной группой они, возможно, индуцируют активность УДФ-глюкуронил-трансглюкуронилазы, способствуя процессам глюкуронидации, одновременно подавляя сопряженные процессы деглюкуронидации.

Кафедра биологической и
биоорганической химии
Ереванского медицинского
института

Поступила 28/II 1986 г.

Լ. Ա. ՉԻԼԻՆԳԻԱՆ, Վ. Գ. ՄԽԻՏԱՐԻԱՆ

ՍՊԻՏԱԿ ԱՌԵՆՏՆԵՐԻ ՈՒՂԵՂԻ ԵՎ ԼՅԱՐԴԻ β -ԳԼՅՈՒԿՈՐՈՆԻԴԱԶԻ
ԱԿՏԻՎՈՒԹՅԱՆ ՓՈՓՈԽՈՒԹՅՈՒՆՆԵՐԸ ԱՄԽԱՄԵՆ ՏԵՏՐԱՔԼՈՐԻԻ ԵՎ
ՈՐՈՇ ԱՐՀԵՏՏԱԿԱՆ ՀԱԿԱՕՔՍԻԴԱՆՏՆԵՐԻ ԱԶԻԵՑՈՒԹՅԱՆ ՏԱԿ

Որոշվել է β -գլյուկուրոնիդազի ակտիվությունը ուղեղում և լյարդում ածխածնի տետրաքլորիդի ներարկումից 1 ժամ, 3 ժամ և 1 քր հետո: Ֆերմենտի ակտիվությունը բոլոր հետազոտված ժամկետներում, բացի եռամյա ժամկետից, բարձրանում է: 1 օրից հետո այն հասնում է 125% բարձրացման մակարդակի ուղեղում և 175%՝ լյարդում:

3 օր անընդմեջ ներարկման դեպքում ֆերմենտի ակտիվությունը բարձրանում է 222% ուղեղում և 212%՝ լյարդում:

Ֆենոլ-52 և ֆենոզան-28 հակաօքսիդանտների ներարկումը ածխածնի տետրաքլորիդի հետ միասին առաջացնում է ֆերմենտի ակտիվության զգալի անկում:

L. A. CHILINGAPIAN, V. G. MKHITARIAN

THE CHANGES IN THE ALBINO RATS BRAIN AND LIVER β -GLUCURONIDASE ACTIVITY UNDER THE INFLUENCE OF CARBON TETRACHLORIDE AND SOME ARTIFICIAL ANTIOXIDANTS

The β -glucuronidase activity was determined under the influence of carbon tetrachloride in different terms after the single injection and after 3 days of daily injection.

The rise of the enzyme activity was established almost in all investigated periods. After the combined injection of carbon tetrachloride with the antioxidants phenol-52 and phenozan-28 the considerable decrease in the enzyme activity was established.

Л И Т Е Р А Т У Р А

1. Арчаков А. И., Кирузина И. И. Успехи гепатологии, 1973, вып. IV, с. 39.
2. Бак Э., Александер П. В кн.: Основы радиобиологии (пер. с англ.). М., 1963, с. 232.
3. Зайцев В. В. Автореф. канд. дисс. М., 1974.
4. Покровский А. А., Арчаков А. И. I Всесоюзный биохимический съезд (тез.) в. II. М., 1964, с. 266.
5. Чилингарян Л. А., Мхитарян В. Г. Биол. ж. Армении, 1979, 5, с. 407.
6. Artlizu M., Pani P., Satta G., Diarzani M. U. Biochem., Biophys. Acta, 1964, 82, 3, 454.
7. Fernandez G. et al. Agents and Actions, 1984, 15, 3-4, 453.
8. Fishman W. H. Nature, 1967, 213, 5075.
9. Ho Kang-Tey Biochem. et Biophys. Acta, 1985, 827, 3, 197.
10. Koldovsky O., Palmiery M. et al. Comp. Biochem. Physiol., 1972, 43, 13, 1.

11. Lowry D. H., Rosebrough N. J., Farr All, Randell R. J. J. Biol. Chem., 1951, 193, 265.
12. Di Luzio N. R. Lab. Invest., 1966, 15, 1, 50.
13. Rees K. R., Shottlander V. L. Ann. N. Y. Acad. Sci., 1963, 104, 905.
14. Sheig R., Klatskin G. Life Sci., 1969, 8, 15, 855.
15. Shuttleworth E. C., Allen N. Neurol., 1968, 18, 534.
16. Zanten Anton P. et al. Clin. Chem. Acta, 1985, 147, 2, 127.

УДК 617—001.4—002.3—085.355 : 577.152.344.015.2 : 615.8

Х. О. НАГАПЕТАН, С. С. АМИРЯН, Л. А. МАТИНЯН, А. Г. АЛЛАВЕРДЯН,
В. С. МИРЗОЯН, С. Р. МКРТЧЯН, Ш. В. ГРИГОРЯН

ДИНАМИКА РЕПАРАЦИИ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫХ РАН ПОД ВОЗДЕЙСТВИЕМ ДИАДИНАМОФОРЕЗА ПАПАИНА

Изучено влияние диадинамофореза (ДДФ) папаина на динамику репаративных процессов поврежденных тканей у морских свинок.

Показано, что под воздействием ДДФ папаина сроки репарации экспериментальных ран значительно сокращаются, особенно при сочетанном применении с антисептиком димексидом.

С целью наилучшей репарации поврежденных тканей в настоящее время широко применяются протеолитические ферменты животного, микробного и растительного происхождения как в отдельности, так и в различных сочетаниях [1,3—10, 12—15]. Эти ферменты, обладая широкой специфичностью воздействия на различные субстраты денатурированных белков, вызывают разрушение связей в пептидах и тем самым ускоряют процессы некролиза нежизнеспособных тканей. Наилучший эффект от применения протеолитических ферментов наблюдался при их сочетании с физическими факторами [11, 15—16], в частности с диадинамическими токами (ДДТ), которые представляют собой разновидность постоянного тока, модулированного различными периодами [2]. По данным литературы [17], лекарства, введенные в организм с помощью ДДТ, депонируются в коже в течение 2—20 дней, что создает возможность для эффективного и продолжительного воздействия их на патологические процессы. Нашими предыдущими исследованиями [7—8] установлено, что папаин, в последнее время широко применяющийся в медицине, под воздействием ДДТ в течение 30-минутной экспозиции не разрушается, а его перенос через мембрану протекает более интенсивно. Показано также, что папаин при диадинамофоретическом введении легко проникает в толщу кожи и глубоко лежащие ткани (до 20 мм и более), а при сочетании с 20% димексидом его проникающая способность возрастает в 2—2,5 раза.

Приведенные данные послужили основанием для проведения экспериментальных исследований с целью изучения действия ДДФ папаина на динамику репаративных процессов поврежденных тканей. Результаты этих исследований отражены в настоящем сообщении.