

Научно-исследовательский институт биомедицинской химии имени В.Н.Ореховича

Архив журнала

## **Вопросы медицинской химии**

*ISSN 0042-8809*

1986

**Внимание!** Распознавание текста проведено в автоматическом режиме для облегчения работы поисковых систем. Будьте внимательны при копировании, возможны ошибки и неточности. Используйте сканированный графический вариант.

Archive of journal

## **Voprosy meditsinskoi khimii**

*ISSN 0042-8809*

1986

**Attention!** OCR has been performed automatically for search engines only. Be careful when copying, errors are possible. Use scanned picture as standard.

<http://pbmc.ibmc.msk.ru>

ТОМ XXXII

ВЫПУСК 2

МАРТ—АПРЕЛЬ

Двухмесячный научно-теоретический журнал

Основан в 1955 г.



МОСКВА · МЕДИЦИНА · 1986

# ВОПРОСЫ МЕДИЦИНСКОЙ ХИМИИ



## РЕДАКЦИОННАЯ КОЛЛЕГИЯ:

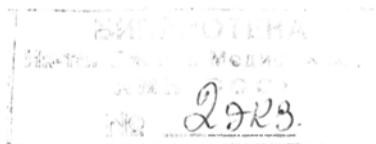
Главный редактор С. С. ДЕБОВ

В. И. МАЗУРОВ (зам. главного редактора), Т. Т. БЕРЕЗОВ, Е. Н. ГЕРАСИМОВА,  
В. З. ГОРКИН, И. Б. ЗБАРСКИЙ, А. Н. КЛИМОВ, Б. Ф. КОРОВКИН, Л. А. ЛОК-  
ШИНА, В. Н. ОРЕХОВИЧ, Л. Ф. ПАНЧЕНКО, М. Ш. ПРОМЫСЛОВ, Е. Л. РО-  
ЗЕНФЕЛЬД, Ю. А. РОМАКОВ (ответственный секретарь), В. А. САКС, С. Е. СЕ-  
ВЕРИН, В. Б. СПИРИЧЕВ

## РЕДАКЦИОННЫЙ СОВЕТ:

БАЕВ А. А. (Москва)  
БЕЛИЦЕР В. А. (Киев)  
БЫЧКОВ С. М. (Москва)  
КОНСТАНТИНОВ А. А. (Хабаровск)  
КУДРЯШОВ Б. А. (Москва)  
ЛЯХОВИЧ В. В. (Новосибирск)  
ПАСХИНА Т. С. (Москва)

ТРОИЦКИЙ Г. В. (Симферополь)  
ТУРАКУЛОВ Я. Х. (Ташкент)  
ТЯХЕПЫЛЬД Л. Я. (Тарту)  
УТЕВСКИЙ А. М. (Харьков)  
ШАПОТ В. С. (Москва)  
ЯКОВЛЕВ Н. Н. (Ленинград)  
ЯСАЙТИС А. А. (Вильнюс)



Адрес редакции журнала:

Москва, Солянка, 14

АМН СССР

Тел. 297-16-44

Зав. редакцией Л. А. Фирсова

А. Э. Краусакас, Л. В. Кравченко, И. Я. Конь, В. А. Тутельян

## АКТИВНОСТЬ ФЕРМЕНТОВ МЕТАБОЛИЗМА КСЕНОБИОТИКОВ В ПЕЧЕНИ КРЫС ПРИ НЕДОСТАТОЧНОСТИ ВИТАМИНА А И МИКОТОКСИКОЗЕ Т-2

Лаборатория энзимологии Института питания АМН СССР, Москва

В последние годы в литературе накапливаются все больше данных, свидетельствующих о значении витамина А для функционирования различных ферментных систем детоксикации ксенобиотиков [9, 16, 19]. Установлено, в частности, что недостаточность витамина А приводит к снижению содержания цитохрома Р-450 в печени и уменьшению активности ряда зависимых от цитохрома Р-450 ферментов [11], а также к изменению активности ферментов второй фазы метаболизма ксенобиотиков [16, 19]. Поскольку конечный биологический эффект чужеродных соединений, в том числе различных контаминантов пищевых продуктов, к которым относится микотоксин Т-2 [20], в значительной степени определяется состоянием упомянутых ферментных систем, представляет интерес изучение действия Т-2 токсина в условиях различной обеспеченности организма витамином А. В предыдущих исследованиях было показано, что избыточное поступление в организм крыс витамина А сопровождается резким снижением активности основных ферментов второй (конъюгационной) фазы метаболизма ксенобиотиков — UDP-глюкуронозилтрансферазы и глутатион-*о*трансферазы, сопряженным с выраженным усилением явлений микотоксикоза Т-2 [6].

Целью настоящей работы явилось исследование содержания цитохрома Р-450 и активности ферментов, катализирующих различные фазы метаболизма ксенобиотиков в печени крыс при недостаточности витамина А и ее сочетании с микотоксикозом Т-2. В качестве биохимического показателя токсического действия токсина Т-2 изучали активность  $\alpha$ -маниозидазы в печени и сыворотке крови животных.

### Методика

Исследования были проведены на 60 растущих крысах-самцах Вистар, которые были разделены на 4 группы (по 15 животных в

каждой). Животные всех групп с момента прекращения грудного вскармливания находились на полусинтетическом рационе, свободном от витамина А, причем матери этих животных с 10-го дня периода лактации получали тот же рацион. Опытный рацион включал в себя 60 % крахмала, 10 % сахарозы, 20 % казеина, очищенного от витамина А, 5 % подсолнечного масла, в котором растворяли эргокальциферол (из расчета 20 МЕ на крысу в день), 4 % солевой смеси и 1 % смеси водорастворимых витаминов. Животные 1-й и 3-й групп отличались от животных 2-й и 4-й групп получали дополнительно 1 раз в неделю через зонд в желудок по 0,2 мл раствора ретинолпальмитата в подсолнечном масле из расчета 1000 МЕ на крысу. Начиная с 20-го дня опыта крысам 3-й и 4-й групп вводили в течение 10 дней через зонд в желудок раствор Т-2 токсина (в 1 % водном этаноле) в дозе 0,54 мг на 1 кг массы тела, что соответствует  $1/7$  LD<sub>50</sub> для крыс [20]. Животным 1-й и 2-й групп вводили равное количество растворителя. Крыс декапитировали через 24 ч после последнего введения (на 30-й день от начала эксперимента).

Выделение органов, приготовление гомогенатов в получение клеточных фракций проводили в стандартных условиях [8]. В гомогенатах печени определяли содержание белка [13], витамина А без предварительного омыления [1], SH-глутатона [18], цитохрома Р-450 (НФ 1.14.14.1) [14], активность карбоксилэстеразы (НФ 3.1.1.1) [15], эноксидгидролазы (НФ 3.3.2.3) [7], UDP-глюкуронозилтрансферазы (НФ 2.4.1.17) [3] и  $\alpha$ -маниозидазы (НФ 3.2.1.24) [8]. В микросомальной фракции находили активность анилингидроксилазы [2], в цитозоле — глутатионтрансферазы (НФ 2.5.1.18) [12] с использованием в качестве субстрата 1-хлор-2,4-динитробензола.

### Результаты и обсуждение

Лишение растущих животных витамина А приводило к появлению у них типичных симптомов недостаточности этого витамина: замедлению роста, светобоязни, конъюнктивиту, нарушению шерстного покрова. К концу опыта часть животных 2-й группы погибли. А-витаминная недостаточность сопровождалась также снижением относительной массы селезенки и тимуса (табл. 1). У животных 2-й и 4-й групп в печени обнаруживали лишь следы витамина А, тогда как в печени крыс 1-й и 3-й групп его содержание составляло соответственно 22,2 и 26,7 мкг на 1 г ткани (табл. 2).

Таблица 1

Летальность, прирост массы тела и относительная масса внутренних органов крыс при авитаминозе А и микотоксикозе Т-2 ( $\bar{X} \pm S\bar{x}$ )

Группа животных	Летальность, %	Прирост массы тела, г/день	Относительная масса, %		
			печень	селезенка	тимус
1-я	0	+5,1±0,3	4,20±0,15	0,41±0,03	0,24±0,03
2-я	22	-1,7±0,9	4,06±0,27	0,30±0,05	0,17±0,06
3-я	8	+3,8±0,5	4,70±0,31	0,41±0,06	0,24±0,02
4-я	40	-1,8±0,7	4,62±0,20	0,26±0,03	0,12±0,02
$P_{2-1}$		<0,001	>0,05	>0,05	>0,05
$P_{3-1}$		<0,05	>0,05	>0,05	>0,05
$P_{2-4}$		>0,05	>0,05	>0,05	>0,05
$P_{3-4}$		<0,001	>0,05	<0,05	<0,01

Примечание. Здесь и в табл. 2 и 3 представлены средние данные 6 опытов.

Данные о содержании цитохрома Р-450 и активности ферментов в печени крыс представлены в табл. 3. Как видно из табл. 3, авитаминоз А вызывал значительное снижение содержания в печени цитохрома Р-450 (до 63 % от уровня контрольных животных) и резкое угнетение активности одной из зависимых от цитохрома Р-450 монооксигеназ, анилингидроксилазы (до 21 %). Одновременно отмечалось значительное снижение активности микросомальных гидролаз — эпоксидгидролазы (до 54 %) и карбоксилэстеразы (до 5 % от контроля). В то же время изменения активности трансфераз, участвующих во II фазе метаболизма ксенобиотиков, были менее однозначными: активность микросомальной UDP-глюкуронозилтрансферазы снижалась на 5 % от уровня у контрольных живот-

ных, тогда как активность цитоплазматической глутатионтрансферазы, напротив, проявила тенденцию к возрастанию. Одновременно была обнаружена выраженная тенденция к увеличению содержания в печени SH-глутатиона (см. табл. 2). Содержание общего белка в печени при этом не изменялось, а микросомального — превышало контрольный уровень.

Полученные результаты согласуются с литературными данными [11, 19] и свидетельствуют о глубоких изменениях активности ферментных систем различных фаз метаболизма чужеродных соединений, а также о нарушении соотношений активности отдельных звеньев этого метаболического конвейера при А-авитаминозе. Заслуживает особого внимания выявленный факт выраженного угнетения в этих усло-

Таблица 2

Изменения некоторых биохимических показателей в печени и сыворотке крови крыс при авитаминозе А и микотоксикозе С-2 ( $\bar{X} \pm S\bar{x}$ )

Группа животных	Содержание витамина А, мкг на 1 г ткани	Содержание белка, мг на 1 г ткани		Содержание SH-глутатиона, мг на 1 г ткани	Активность $\alpha$ -маннозидазы	
		общий	микросомальный		в печени, мкмоль на 1 г ткани в 1 мин	в сыворотке крови, нмоль/мин/мл
1-я	22,2±3,4	196±5,6	23,7±0,5	1,83±0,19	6,07±0,20	66,8±8,5
2-я	Следы	203±4,1	27,9±1,5	2,36±0,15	5,74±0,35	47,6±5,7
3-я	26,7±2,9	182±6,2	29,6±3,3	2,34±0,22	3,94±0,22	37,8±3,9
4-я	Следы	189±2,7	25,0±2,0	2,32±0,16	7,14±0,80	34,5±4,8
$P_{2-1}$	<0,001	>0,05	<0,05	>0,05	>0,05	>0,05
$P_{3-1}$	>0,05	>0,05	>0,05	>0,05	<0,001	<0,02
$P_{4-2}$	>0,05	<0,05	>0,05	>0,05	>0,05	>0,05
$P_{4-3}$	<0,001	>0,05	>0,05	>0,05	<0,01	>0,05

Изменения активности ферментов метаболизма ксенобиотиков в печени крыс при авитаминозе А и токсикозе Т-2 ( $\bar{X} \pm S\bar{x}$ )

Группа животных	Цитохром Р-450	Анилингидроксилаза	Эпоксидгидролаза	Карбоксилэстераза	UDP-глюкурозилтрансфераза	Глутатионтрансфераза
1-я	59,6±2,8	0,444±0,035	1,39±0,08	119,6±5,7	39,9±2,1	1,48±0,02
2-я	37,9±5,1	0,094±0,013	0,75±0,09	77,3±4,9	29,8±2,3	1,66±0,10
3-я	40,9±2,0	0,242±0,033	2,55±0,25	107,8±0,7	41,9±2,4	1,87±0,13
4-я	30,7±1,1	0,082±0,009	1,13±0,27	74,2±5,5	35,3±3,1	1,86±0,11
$P_{2-1}$	<0,01	<0,001	<0,001	<0,001	<0,01	>0,05
$P_{3-1}$	<0,001	<0,01	<0,01	>0,05	>0,05	<0,02
$P_{2-4}$	>0,05	>0,05	>0,05	>0,05	>0,05	>0,05
$P_{3-4}$	<0,001	<0,001	<0,01	<0,001	>0,05	>0,05

Примечание. Содержание цитохрома Р-450 выражено в наномолях на 1 г ткани, активность глутатионтрансферазы — в микромолях на 1 мг белка в 1 мин, остальных ферментов — в наномолях на 1 мг белка в 1 мин.

виях эпоксидгидролазы, играющей важную роль в метаболизме эпоксидсодержащих соединений, к числу которых принадлежит микотоксин Т-2 [20]. Что касается механизмов обнаруженных изменений активности ферментов, то можно предположить, что снижение содержания в печени цитохрома Р-450 и активности ферментов эндоплазматического ретикулаума в значительной мере обусловлено нарушением при авитаминозе А структурного и функционального состояния мембран, в частности их липидных компонентов [10, 21]. Повышение активности глутатионтрансферазы, выявленное при недостаточности витамина А, согласуется с выдвинутой ранее гипотезой о витамине А как отрицательном аллостерическом регуляторе активности этого фермента [6].

Во второй части эксперимента были изучены особенности микотоксикоза Т-2 в условиях А-витаминной недостаточности у крыс. У животных 3-й группы, получавших токсин на фоне полноценного питания, отмечали характерные симптомы токсикоза Т-2 — диарею, геморрагическое воспаление слизистых оболочек носоглотки, адинамию, задержку роста, некоторое увеличение уровня SH-глутатиона в печени, снижение активности  $\alpha$ -маннозидазы в печени и сыворотке крови. Гибель животных в этой группе составила 8% (см. табл. 1 и 2). Обращает на себя внимание (см. табл. 3) значительное снижение в печени крыс 3-й группы содержа-

ния цитохрома Р-450 (на 31% от уровня у контрольных животных) и активности анилингидроксилазы (на 46%). В то же время отмечалось резкое (почти в 2 раза) увеличение активности эпоксидгидролазы, а также достоверное (хотя и в меньшей степени — на 26%) возрастание активности глутатионтрансферазы. Таким образом, действие токсина Т-2 на ферменты метаболизма ксенобиотиков характеризуется подавлением активности ряда ферментов I фазы, но возрастанием активности эпоксидгидролазы и глутатионтрансферазы, которое носит, по-видимому, адаптивный характер и направлено на обезвреживание токсина Т-2 его метаболитов в организме.

У животных 4-й группы, получавших токсин Т-2 на фоне недостаточности витамина А, наблюдали незначительное усиление клинических и биохимических признаков токсикоза. Это проявлялось в усилении гибели животных и более выраженном уменьшении относительной массы тимуса и селезенки (см. табл. 1). Изучение активности ферментов в печени крыс (см. табл. 3) показало, что у животных 4-й группы большей степени, чем у крыс 2-й и 3-й групп, уменьшались содержание цитохрома Р-450 и активности анилингидроксилазы и карбоксилэстеразы, а также в меньшей степени, чем у животных 3-й группы, активировалась эпоксидгидроксилаза. Не обнаружено достоверных различий между активностью ферментов конъюгации у крыс 2, 3 и 4

групп, хотя отмечалась тенденция к увеличению активности UDP-глюкуронозилтрансферазы у животных 4-й группы по сравнению с таковой крыс 2-й группы (см. табл. 3).

Сопоставление биохимических данных с результатами изучения клинической картины микотоксикоза Т-2 у животных с недостаточностью витамина А показывает, что, несмотря на значительное снижение содержания цитохрома Р-450 и активности всех изучавшихся ферментов I фазы метаболизма ксенобiotиков при гиповитаминозе А, токсическое действие Т-2 токсина в этих условиях усиливается лишь незначительно. В то же время заслуживает внимания определенная зависимость между степенью токсического эффекта токсина Т-2 у крыс и активностью ферментов II фазы метаболизма ксенобiotиков: незначительное изменение активности ферментов конъюгации в печени животных с недостаточностью витамина А сопровождалось лишь некоторым усилением их чувствительности к токсину Т-2, тогда как резкое подавление активности глутатионтрансферазы и UDP-глюкуронозилтрансферазы в условиях избыточного поступления витамина А [6] приводило к выраженному усилению клинических проявлений микотоксикоза Т-2.

Таким образом, опираясь на результаты исследования и опубликованные ранее данные о влиянии различных модификаторов активности ферментов, метаболизирующих ксенобiotики, на токсические свойства микотоксина Т-2 [4—6] можно предположить, что этот микотоксин не подвергается метаболической активации и что реакции его деацетилирования, катализируемые микросомальной карбоксилэстеразой [17], и гидрокселирования, осуществляемые монооксигеназной системой печени [22], в незначительной степени снижают его биологическую активность. Есть все основания полагать, что в обезвреживании токсина Т-2 более существенную роль играют ферментные процессы конъюгации, в частности с SH-глутатионом и глюкуроновой кислотой. Вместе с тем обнаружение резкого возрастания активности эпоксидгидролазы в печени при введении токсина Т-2 и сохранение способности этого фермента активироваться при введении токсина Т-2 и на фоне недостаточности витамина А

позволяют рассматривать эпоксидгидролазу как возможный участник процесса детоксикации токсина Т-2 и других 12, 13-эпоксентрихотеценовых микотоксинов.

*Авторы выражают глубокую благодарность канд. хим. наук. К. И. Эллеру и В. С. Соболеву за представление токсина Т-2.*

#### ЛИТЕРАТУРА

1. *Дмитровский А. А.* — В кн.: Экспериментальная витаминология. Минск, 1979, с. 131.
2. *Карузина И. И., Арчаков А. И.* — В кн.: Современные методы в биохимии. М., 1977, с. 49—62.
3. *Кокаровцева М. Г., Якушенко В. Е., Кузьминская У. А.* — Лаб. дело, 1977, № 3, с. 179.
4. *Кравченко Л. В., Авреньева Л. И., Тутельян В. А.* — Вопр. мед. химии, 1983, № 5, с. 135—137.
5. *Кравченко Л. В., Авреньева Л. И., Тутельян В. А.* — Докл. АН СССР, 1984, т. 276, № 5, с. 1270—1273.
6. *Кравченко Л. В., Конь И. Я., Авреньева Л. И., Тутельян В. А.* — Вопр. мед. химии, 1984, № 6, с. 88—91.
7. *Кранаускас А. Э., Кравченко Л. В., Тутельян В. А.* — Там же, 1986, № 1, p. 37.
8. *Покровский А. А., Тутельян В. А.* Лизосомы. М., 1976.
9. *Adekunle A. A., Campbell T. C., Campbell S. C.* — *Experientia* (Basel), 1979, vol. 35, p. 241—242.
10. *De Luca L. M.* — *Vitam. a. Hormon.*, 1977, vol. 35, p. 1—57.
11. *Dogra S. C., Khanduja K. L., Gupta M. P., Sharma R. R.* — *Enzyme*, 1983, vol. 30, p. 99—104.
12. *Habig W. H., Pabst M. J., Jakoby W. B.* — *J. biol. Chem.*, 1974, vol. 249, p. 7130—7139.
13. *Lowry O. H., Rosebrough N. J., Farr A. L., Randall R. J.* — *Ibid.*, 1951, vol. 193, p. 265—275.
14. *Matsubara T., Koike M., Touchi A. et al.* — *Analyt. Biochem.*, 1976, vol. 75, p. 569—603.
15. *Mendoza C. E., Shields J. B., Phillips W. E. J.* — *Comp. Biochem. Physiol.*, 1971, vol. 40-B, p. 841—854.
16. *Nair C. R., Chauhan D. P., Gupta P. H. et al.* — *Digestion*, 1982, vol. 24, p. 190—194.
17. *Ohta M., Matsumoto H., Ishii K., Ueno Y.* — *J. Biochem. (Tokyo)*, 1978, vol. 84, p. 697—706.
18. *Sedlak J., Lindsay R. H.* — *Analyt. Biochem.*, 1968, vol. 25, p. 192—205.
19. *Siddik H. Z., Drew R., Litter C. I. et al.* — *Pharmacology*, 1980, vol. 21, p. 383—390.
20. *Trichothecenes: Chemical, Biological and Toxicological Aspects* / Ed. Y. Ueno. Amsterdam, 1983.
21. *Yonemoto T., Oh M.* — *J. Vitam.*, 1969, vol. 15, p. 254—260.
22. *Yoshizawa T., Sakamoto T., Okamoto K.* — *Appl. Environm. Microbiol.*, 1984, vol. 47, p. 130—134.

Поступила 24.05.85

ACTIVITY OF ENZYMES PARTICIPATING  
IN METABOLISM OF XENOBIOTICS IN  
LIVER TISSUE OF RATS DEFICIENT IN  
VITAMIN A AND IN EXPERIMENTAL T-2  
MYCOTOXICOSIS

*A. E. Kranauskas, L. V. Kravchenko,  
I. Ya. Kon, V. A. Tutel'yan*

Institute of Nutrition, Academy of Medical  
Sciences of the USSR, Moscow

Keeping male rats within a month on a  
ration deficient in vitamin A led to a distinct  
decrease in content of cytochrome P-450, in  
activities of carboxylase, epoxide hydrolase,  
aniline hydrolase and to a slight inhibition of  
UDP-glucuronosyl transferase in live tissue.

At the same time, activity of glutathione trans-  
ferase and content of reduced glutathione in  
liver tissue were increased. After administration  
of the epoxide-containing T-2 mycotoxin into  
rats within 10 days at a dose of 0.54 mg/kg  
activity of the enzymes catalyzing metabolism  
of xenobiotics was inhibited in the animals  
maintained on the complete half-synthetic ra-  
tion, except of epoxide hydrolase and gluta-  
thione transferase, activity of which was elevat-  
ed. The administration of T-2 toxin under condi-  
tions of deficiency in vitamin A caused espe-  
cially distinct inhibition of the enzymes involved  
in the I phase of xenobiotic metabolism but it  
was accompanied by only slight increase in  
T-2 toxicosis. The enzymes participating in  
conjugation of xenobiotics as well as epoxide  
hydrolase appear to play major roles in deto-  
xication of T-2 mycotoxin.

## МЕТОДЫ БИОХИМИЧЕСКИХ ИССЛЕДОВАНИЙ

УДК 612.015.3:547.963.1]-08

*Н. А. Зорин, О. А. Себелева*

### БИОСПЕЦИФИЧЕСКИЙ ЭЛЕКТРОФОРЕЗ — НОВЫЙ МЕТОД ИЗУЧЕНИЯ ГЛИКОЗАМИНОГЛИКАНОВ

Центральная научно-исследовательская лаборатория Новокузнецкого института усовершенствования врачей

Изучение гликозаминогликанов (ГАГ) и определение их концентрации в тканях представляют ряд существенных трудностей [1, 5]. Обычно определяют концентрацию одного из компонентов глицидных полисахаридных звеньев [5] или оценивают связывание красителей с фракциями ГАГ, полученными методами зонального электрофореза [2]. Широкие вариации содержания ацетиламиносахаров и гексуроновых кислот в составе различных видов ГАГ, а также возможное разрушение этих компонентов при гидролизе существенно снижают ценность первого из этих методических подходов. Недостатком второго является неодинаковая реактивность красителей с различными видами ГАГ, а также невозможность полного разделения полисахаридов даже при использовании нескольких буферных систем для электрофореза [2]. Поэтому поиск новых методов изучения ГАГ является актуальной проблемой.

Свойство ГАГ образовывать преципитирующие комплексы с определенными соединениями (цетилпиридиния хлоридом, цетилтриметиламмония бромидом, риванолом и др.) широко используется для выделения их из сложных смесей [5], но лишь недавно оно нашло применение для определения общей концентрации ГАГ в моче [6]. Принцип метода состоит в преципитации ГАГ в агаровом геле, содержащем цетилпиридиния хлорид. При этом между диаметром колец преципитации и концентрацией ГАГ наблюдается логарифмическая зависимость. К сожалению, особенности реакций цетилпиридиния хлорида с различными видами ГАГ остались неизученными, что препятствовало распространению этого метода.

Способность ГАГ образовывать преципитаты в гелевой среде, содержащей соответствующие преципитирующие агенты, послужила основой для разработки нового направления изучения