

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЕ ИЗУЧЕНИЕ ВОЗДЕЙСТВИЯ ФОРМАЛЬДЕГИДА В ПЕРИОД ЭМБРИОГЕНЕЗА НА АКТИВНОСТЬ ФЕРМЕНТНЫХ СИСТЕМ ПЕЧЕНИ КРЫС В ОНТОГЕНЕЗЕ.

Л.Ф.АСТАХОВА, Л.Х.МУХАМБЕТОВА, З.И.КОГАНОВА, С.И.ДОЛИНСКАЯ,
В.И.КАЗАЧКОВ, В.С.ЖУРКОВ.

НИИ экологии человека и гигиены окружающей среды им. А.Н.Сысина РАМН

Проведено сравнительное биохимическое исследование активности ферментных систем различной внутриклеточной локализации (митохондрии, лизосомы, эндоплазматический ретикулум, цитозоль) в печени intactных крыс и крыс, подвергавшихся воздействию формальдегида в дозе 0,5 мг/кг (1/800 Z D₅₀) в течение всего эмбриогенеза, в различные сроки онтогенетического развития (новорожденные, 2 недели, 2 месяца: самцы, самки). Показана направленность изменений активности изучаемых ферментов в печени опытных и контрольных крыс в процессе онтогенетического развития. Установлено, что энергетический обмен, измененный у опытных новорожденных и 2-х недельных крыс, восстанавливается к 2-х мес. возрасту у самцов и самок. В печени опытных самцов и самок крыс (2 мес) наблюдали сниженные уровни активности глюкозо-6-фосфатазы, нуклеотидазы, β-глюкуронидазы (самцы) и повышенные уровни активности N-ацетил-β-глюкозаминидазы (самцы), изоцитратдегидрогеназы (НАДФ+), Мх, (самки), глюкозо-6-фосфатдегидрогеназы (самки). Отмечено, что уровень активности некоторых ферментов в печени самцов крыс (2 мес) ниже, чем в печени самок крыс (2 мес) обеих групп животных.

Последствия эмбриотоксического действия химических факторов среды могут проявляться в постнатальном периоде развития [1]. Поэтому важно выявить изменения на уровне основных ферментных систем жизнеобеспечения клетки, направленных на поддержание биохимического гомеостаза организма. Деадаптация ферментных систем сопровождается нарушением функций различных органов, в частности печени — основной “биохимической лаборатории” организма [1, 2]. Формальдегид относится к распространенным загрязнителям окружающей среды, эмбриотоксичность которого установлена по ряду параметров [3, 4, 5, 6]. В то же время недостаточно экспериментальных данных, позволяющих судить о неблагоприятном влиянии этого вещества при его воздействии в период эмбриогенеза, на развитие организма в постнатальном периоде, особенно с учетом пола и возраста животных.

В настоящей работе проведено сравнительное биохимическое исследование активности ферментов различной внутриклеточной локализации (митохондрии, лизосомы, эндоплазматический ретикулум, цитозоль), характеризующих процессы энергообеспечения, детоксикации, биосинтеза и др. в печени intactных крыс и крыс, подвергавшихся воздействию формальдегида в дозе 0,5 мг/кг (1/800 Z D₅₀) в течение всего эмбриогенеза, в различные сроки онтогенетического развития.

Методика. Неинбридные крысы-самки разводки питомника “Крюково” с начальной массой 190-220 г после спаривания с intactными самцами (того же помета) и установления 1-го дня беременности (по наличию сперматозоидов в вагинальных мазках) получали ежедневно на протяжении всего периода беременности внутрижелудочно зондом водные растворы формальдегида в дозе 0,5 мг/кг массы тела. Контрольные беременные самки получали ежедневно зондом аналогичные объемы дистиллированной воды. Биохимические исследования проведены у новорожденных крысят, у 2-х недельных крыс (период окончания лактации), у 2-х месячных крыс обоего пола (период созревания); в каждой группе по 6-10 крыс. Животных забивали декапитацией. Гомогенаты печени готовили на 0,25 М сахарозы и 0,05 М трис-буфере pH = 7,4, в соотношении 1:10 (масса:объем), гомогенизатор: тефлон-стекло. В гомогенатах печени определяли активность глюкуронозилтрансферазы (КФ 2.4.1.17) [7], цитохром-с-оксидазы (КФ 1.9.3.1) [8], малатдегидрогеназы (КФ 1.1.1.37) [8], нуклеотидазы (субстрат: инозин-5-дифосфат) (КФ 3.1.3.31) [9], глюкозо-6-фосфатазы (КФ 3.1.3.9) [9], β-глюкуронидазы (КФ 3.2.1.31) [10], N-ацетил-β-глюкозаминидазы (КФ 3.2.1.30) [11], β-галактозидазы (КФ 3.2.1.23) [12]. Митохондрий печени выделяли методом дифференциального центрифугирования [13]. В них определяли активность АТФазы (КФ 3.6.1.3) [14], глутаматдегидрогеназы/НАД (Ф+)/ (КФ 1.4.1.3) [8], изоцитратдегидрогеназы (НАД+) (КФ 1.1.1.41) [15], изоцитратдегидрогеназы (НАДФ+) (КФ 1.1.1.42) [16], а в

супернатанте 12000 x g — активность изоцитратдегидрогеназы (НАДФ⁺) (КФ 1.1.1.42), фруктозо-дифосфат альдолазы (КФ 4.1.2.13) [16], глюкозо-6-фосфатдегидрогеназы (КФ 1.1.1.49) [17]. Белок определяли по методу Лоури [18]. Статистическую обработку полученных данных проводили по методу [3].

Результаты и обсуждение. Изменение активностей изучаемых ферментов в печени интактных и опытных крыс в различные периоды онтогенеза приведены на рис. 1,2. Одинаковая направленность изменений активностей ферментов в печени “формальдегидных” и контрольных крыс характерна для следующих ферментов: для изоцитратдегидрогеназы (НАДФ⁺) (митохондрии, цитозоль), изоцитратдегидрогеназы (НАД⁺), малатдегидрогеназы, цитохром-с-оксидазы, β-галактозидазы, глутаматдегидрогеназы/НАД(Ф⁺), глюкозо-6-фосфатдегидрогеназы, для содержания белка во фракции 12000 x g (рис. 1,2). Разная направленность адаптационных изменений активности ферментов опытных и интактных крыс отмечены для фруктозо-дифосфат альдолазы, АТФазы, п-ацетил-β-глюкозаминидазы, β-глюкуронидазы, нуклеотидазы, глюкозо-6-фосфатазы, глюкуронозилтрансферазы и содержания митохондриального белка.

Содержание митохондриального белка на 1 г печени новорожденных опытных и контрольных крыс одинаково: 15,08 ± 1,33 и 15,25 ± 1,52 мг/г, соответственно. В печени 2-х недельных крысят уровень митохондриального белка на 1 г ткани повышался на 25% в печени нормальных животных и на 66% в печени опытных животных по сравнению с новорожденными (и соответственно на 31% опыт-контроль). Количество митохондриального белка в печени контрольных крыс (самцы, самки) к 2-х месячному периоду развития не меняется (по сравнению с 2-х недельными крысятами). Содержание митохондриального белка в печени 2-х месячных опытных крыс (самцы, самки) снижается по сравнению с уровнем митохондриального белка в печени 2-х недельных опытных крыс, но равняется содержанию митохондриального белка в печени 2-х недельных и 2-х месячных контрольных животных (рис. 1). Можно предположить, что индукция синтеза митохондрий в печени опытных 2-х недельных крыс обусловлена значительными затратами энергии, требующейся для биосинтетических процессов и процессов восстановления нарушенных структур печени. Следовательно, то количество митохондрий на 1 г печени, которое необходимо для энергообеспечения нормально функционирующих клеток печени устанавливается у контрольных животных в 2-х недельном возрасте, у опытных животных к 2-х месячному возрасту. Количество белка, определяемого во фракции, содержащей микросомы, лизосомы, цитоплазматические белки, в печени новорожденных контрольных и опытных крысят равнялось 90,23 ± 4,62; 76,43 ± 8,75 мг/г ткани, соответственно, и изменялось однонаправленно в обеих группах в сторону повышения (новорожденные = 2 недели / 2 месяца).

Активность фруктозо-дифосфат альдолазы и АТФазы в печени опытных крыс во все сроки исследования сохраняется на одном и том же уровне (рис. 1). В печени 2-х недельных контрольных животных активность фруктозо-дифосфат альдолазы понижалась на 24%, а активность АТФазы на 31% по сравнению с новорожденными животными. При сравнении величин активностей этих 2-х ферментов в печени 2-х недельных опытных и контрольных крыс наблюдается обратная картина. Можно полагать, что изучение динамики изменений активности ферментов в различные сроки онтогенетического развития более полно проясняет события, происходящие в клетках органа животных.

Почти одинаковые уровни активности ферментов в печени новорожденных и 2-х месячных крыс отмечены в группах контрольных и опытных животных для следующих ферментов: изоцитратдегидрогеназы(НАДФ⁺) (цитозоль), фруктозо-дифосфат альдолазы, АТФазы, β-галактозидазы, цитохром-с-оксидазы; и только у контрольных животных — глюкозо-6-фосфатдегидрогеназы (самцы), глюкозо-6-фосфатазы (самцы, самки) (рис. 1,2). Следовательно, данная группа ферментов, по-видимому, функционально и структурно сформирована уже в клетках печени новорожденных крыс. Колебания активности некоторых ферментов в 2-х недельном возрасте, вероятно, обусловлены повышенной функциональной потребностью органа (изменение питания, бурный рост) [19]. Становление остальных исследуемых ферментов в печени контрольных и опытных крыс происходит в более поздние сроки развития.

Различная направленность изменений активности ферментов в печени контрольных и “формальдегидных” крыс в сочетании с количественными различиями на некоторых сроках онтогенетического развития установлена для микросомальных ферментов:

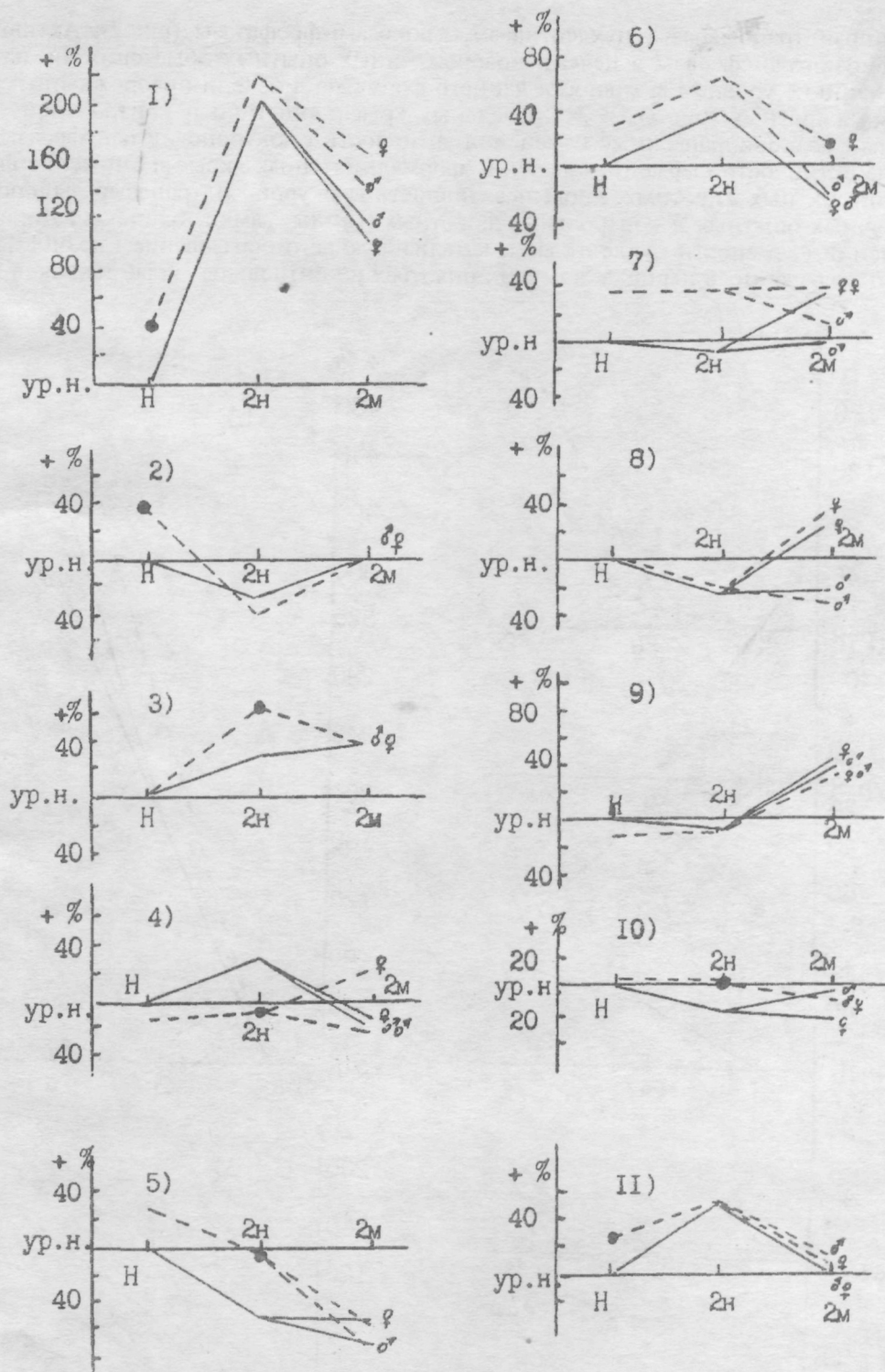


Рис. 1. Направленность изменений активности (1) малатдегидрогеназы, (2) цитохром-с-оксидазы, (3) содержания митохондриального белка, (4) активности АТФазы, (5) изоцитратдегидрогеназы, (6) изоцитратдегидрогеназы (НАДФ+) — митохондрии, (7) изоцитратдегидрогеназы (НАДФ+) — цитозоль, (8) глутаматдегидрогеназы (НАД(Ф)+), (9) содержания белка во фракции 12000 x g, (10) активности фруктозо-дифосфат альдозазы, (11) β -галактозидазы.

глюкуронозилтрансферазы, нуклеотидазы, глюкоза-6-фосфатазы (рис.2). Активность глюкуронозилтрансферазы в печени новорожденных опытных крыс снижена на 91% по сравнению с уровнем активности данного фермента в печени новорожденных контрольных животных (рис.2). У 2-х недельных крысят опытной и контрольной групп наблюдали разнонаправленные изменения активности глюкуронозилтрансферазы: повышение активности фермента в печени "формальдегидных" крыс и снижение активности у интактных животных. Уровень активности глюкуронозилтрансферазы в печени 2-х месячных опытных и контрольных животных (самцы, самки) одинаков. Динамика становлений активности нуклеотидазы, катализирующего образование инозина [10], в различные возрастные периоды в печени опытных и контрольных крыс такова: в пече-

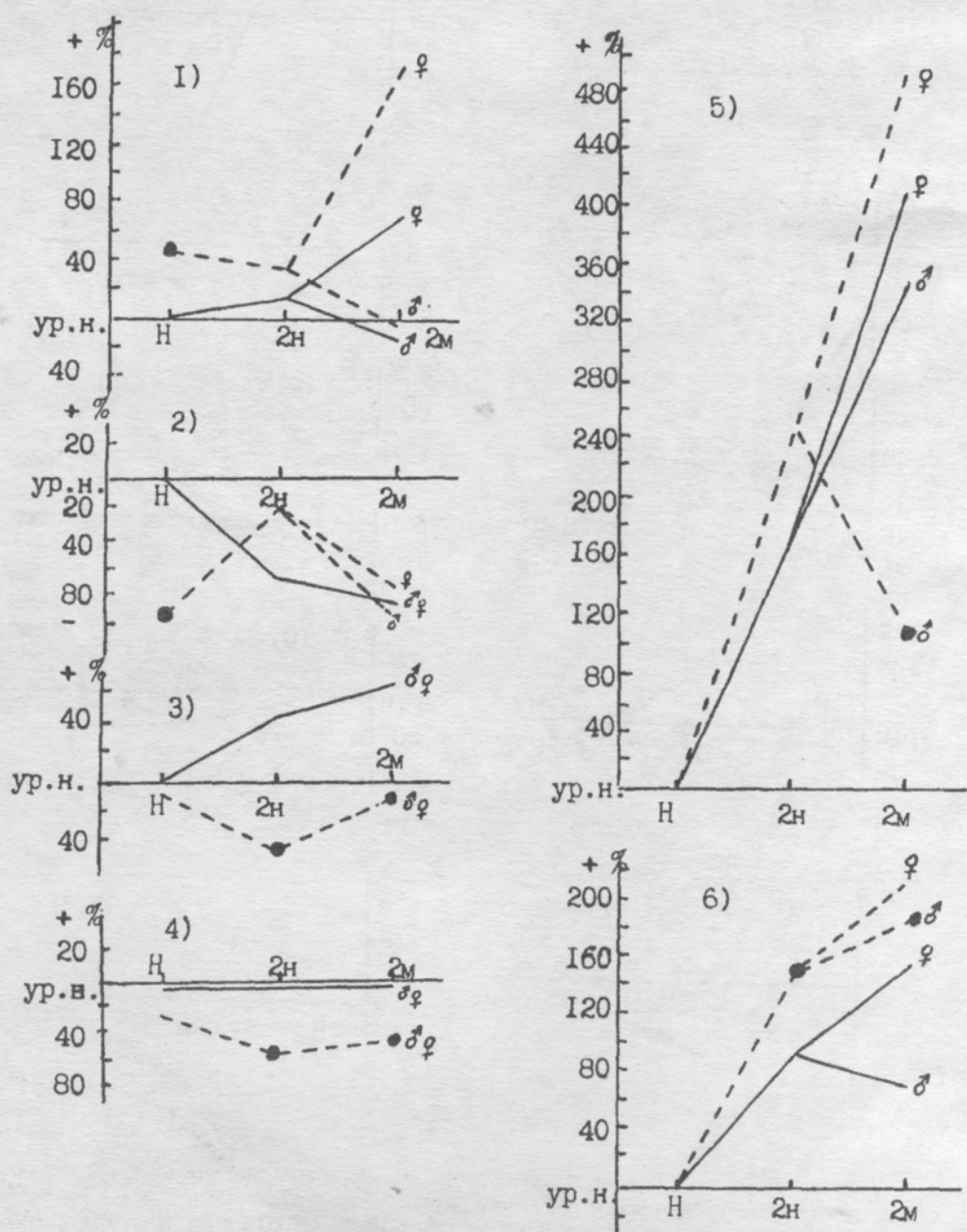


Рис. 2. Направленность изменений активности (1) глюкозо-6-фосфатдегидрогеназы, (2) глюкуронозилтрансферазы, (3) нуклеотидазы, (4) глюкозо-6-фосфатазы, (5) β-глюкуронидазы, (6) N-ацетил-β-глюкозаминидазы.

ни новорожденных крысят обеих групп активность фермента одинакова, затем активность нуклеотидазы в печени контрольных крыс увеличивалась с увеличением возраста (рис.2). В печени 2-х недельных опытных животных активность фермента снижалась на 35% по сравнению с опытными новорожденными крысятами и на 61% по сравнению с контрольными 2-х недельными крысами. У 2-х месячных "формальдегидных" животных активность нуклеотидазы поднимается до уровня активности данного фермента новорожденных опытных и контрольных крыс, однако ее активность на 50% ниже уровня активности в печени интактных 2-х месячных крыс (самцы, самки) (рис.2). Активность глюкозо-6-фосфатазы в печени контрольных крыс во все сроки исследования сохраняется на постоянном уровне: $4,84 \pm 0,42 - 4,15 \pm 0,57$ мкмоль/мин/мг. В печени опытных крыс отмечен более низкий уровень активности глюкозо-6-фосфатазы по сравнению с активностью этого фермента в печени контрольных крыс на всех исследованных сроках онтогенетического развития (рис.2).

Различия активности ферментов в печени 2-х месячных самцов и самок крыс контрольной и опытной групп выявлены для изоцитратдегидрогеназы(НАДФ⁺) (митохондрии), глутаматдегидрогеназы(НАД(Ф)⁺), N-ацетил-β-глюкозаминидазы, β-глюкуронидазы, глюкозо-6-фосфатдегидрогеназы. Активность глюкозо-6-фосфатдегидрогеназы в печени интактных 2-х месячных самцов крыс ниже на 52% (p/0,05), чем в печени интактных самок крыс того же возраста. Формальдегид не оказывал влияния на активность глюкозо-6-фосфатдегидрогеназы в печени 2-х месячных самцов крыс, но увеличивал на 59% активность данного фермента в печени самок крыс, что приводило к о/о на 66%, P<0,05 (рис.2). Активность глутаматдегидрогеназы(НАД(Ф)⁺) в печени самцов крыс ниже, чем в печени самок крыс на 3% (контроль) и на 48%, P<0,05, (опыт) (рис. 1). Уровень активности митохондриальной изоцитратдегидрогеназы (НАДФ⁺) в печени самцов и самок контрольной группы, а также самцов "формальдегидной" группы 2-х месячных крыс одинаков. У "формальдегидных" самок крыс (2 мес) активность фермента в печени повышена на 57%, P<0,05, по сравнению с контрольными самками и на 34%, P<0,05, по сравнению с опытными самцами крыс (2 мес) (рис.1). В печени самцов крыс (2 мес) активность N-ацетил-β-глюкозаминидазы на 46%, P<0,05, ниже, чем в печени контрольных самок крыс (2 мес) (рис.2). Уровень активности N-ацетил-β-глюкозаминидазы в печени самцов и самок крыс в возрасте 2 месяца почти идентичен, так как под влиянием формальдегида активность фермента повышалась на 70%, P<0,05, в печени самцов опытной группы (2 мес) и не изменялась в печени опытных самок крыс по сравнению с активностью фермента в печени контрольных самцов и самок крыс (2 мес). Активность β-глюкуронидазы в печени всех групп животных, за исключением одной группы — "формальдегидные" самцы крыс в возрасте 2 мес. — с возрастом животных возрастает (рис.2). В печени контрольной группы крыс (самцы, самки, 2 мес), а также опытной группы самок крыс (2 мес) выявлена приблизительно одинаковая активность β-глюкуронидазы, которая колебалась в пределах $0,656 \pm 0,00$ до $0,861 \pm 0,06$ мкм/мин/мг. Резкое снижение (на 53%, P<0,05) активности β-глюкуронидазы наблюдали в печени опытных крыс самцов в возрасте 2 мес. под влиянием воздействия формальдегида (рис.2). Активность β-глюкуронидазы в печени опытных самцов крыс на 645%, P/0,05, ниже, чем в печени опытных самок крыс (рис.2). Следовательно, в контрольной группе животных в возрасте 2 мес. активность глутаматдегидрогеназы(НАД(Ф)⁺), N-ацетил-β-глюкозаминидазы выше в печени самок, чем в печени самцов. В опытной группе животных в возрасте 2 мес. активность глутаматдегидрогеназы (НАД(Ф)⁺), глюкозо-6-фосфатдегидрогеназы, изоцитратдегидрогеназы(НАДФ⁺) (митохондрии), β-глюкуронидазы выше в печени самок, чем в печени самцов.

Таким образом, энергетический обмен, измененный у опытных новорожденных и 2-х недельных крыс, восстанавливается к 2-х месячному возрасту у самцов и самок. В печени опытных самцов и самок крыс (2 мес) наблюдали сниженные уровни активности глюкозо-6-фосфатазы, нуклеотидазы, а также β-глюкуронидазы (самцы) и повышенные уровни активности N-ацетил-β-глюкозаминидазы (самцы), изоцитратдегидрогеназы(НАДФ⁺), Мх, (самки), глюкозо-6-фосфатдегидрогеназы (самки). Различия в активности изучаемых ферментов печени у контрольных и опытных 2-х месячных самцов и самок крыс выявлены для глутаматдегидрогеназы(НАД(Ф)⁺) (контроль, опыт о/о), глюкозо-6-фосфатдегидрогеназы ((контроль, опыт о/о), Т-ацетил-β-глюкозаминидазы (контроль о/о), изоцитратдегидрогеназы(НАДФ⁺), Мх, (опыт о/о).

ЛИТЕРАТУРА

- 1 Принципы оценки риска для потомства в связи с воздействием химических веществ в период беременности. // ВОЗ:английский. — Женева. — 1988. — 120 С.
- 2 Разен В.Б., Матарадзе Г.Д., Смирнова О.В., Смирнов А.С. // Половая дифференцировка функций печени. — Москва. — 1991. — 330 С.
- 3 Бирюкова Р.И. // Гигиена и санитария. — 1962. — № 7. — С. 43—46.
- 4 Курчатова Г., Колпазанов И. // Гигиена и санитария. — 1975. — № 11. — С. 86-88.
- 5 Назаренко И.В. // Гигиена и санитария. — 1958. — № 1. — С.3-10.
- 6 Руденко А.А., Бирюкова Л.В. // Гигиена и санитария. — 1980. — № 2. — С. 83-85.
- 7 Кокаровцова М.Г., Якушенко В.Е., Кузьминская У.А. // Лабораторное дело. — 1977. — № 3. — С. 179-181.
- 8 Покровский А.А., Арчаков А.И., Мухамбетова Л.Х. // Цитология. — 1969. — т. 11. — С. 121-125.
- 9 Покровский А.А., Арчаков А.И., Бурмантова Н.П. // Цитология. — 1968. — т. 10. — № 11. — С. 1473-1478.
- 10 Покровский А.А., Кравченко Л.В., Тутельян В.А. // Биохимия. — 1971. — т. 36. — № 4. — С. 690-696.
10. Арчаков А.И. // Микросомальное окисление. — Москва. — 1975. — 322 С.
11. Beck C. // Biochem. Biophys. Acta. — 1968. — Р. 43. 14.
12. Покровский А.А., Пономарев Л.Т., Тутельян В.А. // Ферментативные методы анализа. — Москва. — 1969. — 473 С.
13. Поляков В.М., Ланкин В.В., Архангельская А.В., Благородов С.Г. / Биохимия. — 1977. — т. 42. — N 3. — С. 499-604.
14. Астахова Л.Ф. // Исследование функционального состояния ферментных систем митохондрий при действии химических веществ (формальдегид, пестициды, нитрозодиметиламин). — автореф. канд. дис. — 1984. — 20 С.
15. Raymond F. // Biochemistry. — 1963. — V. 2. — P. 1023-1032.
16. Детлаф Т.А., Бродская В.Я., Гаузе Г.Г. // Методы биологии развития. — Москва. — 1974. — 619 С.
17. Прохорова М.И. // Методы биохимических исследований: липидный и энергетический обмен. — Ленинград. — 1982. — С. 170-171.
18. Lowry O.H., Rosebrough N.J., Farr A.Z., Randall R.J. // J. Biol. Chem. — 1951. — V. 193. — P. 265-275.
19. Хочачка П., Сомеро Дж. // Биохимическая адаптация: английский. — Москва. — 1985. — 322 С.
20. Арчаков А.И. // Микросомальное окисление. — Москва. — 1975. — 322 С.

EXPERIMENTAL STUDY OF FORMALDEHYDE ACTION ON ENZYME SYSTEM ACTIVITY OF RAT LIVER DURING ONTOGENESIS.

L.F.Astahova, L.H.Mukhambetova, Z.I.Kaganova, S.I.Dolinskaya, V.I.Kazachkov, V.S.Zhurkov

A.N.Sysin Research Institute of Human Ecology and Environmental Health, RAMS.

The pregnant rats were treated with fofmaldehyde (0,5 mg/kg daily per os) during whole period of pregnancy. The activity of cytochrome-c-oxidase, malate dehydrogenase, nucleotidase, glucose-6-phosphatase, β -glucuronidase, N-acetyl- β -gtucosaminidase, β -gatactosidase, H^+ -ATPase, glutamate dehydrogenase, NAD- and NADP-isocitrate dehydrogenase, fructose-bisphosphate aldolase, glucose-6-phosphate dehydrogenase and content of protein in liver celts of offsprings (newborns, 2 weeks age and 2 months age) were studied. It was shown differences in development enzyme systems of control and experimental animals during ontogenesis.