

УДК 577.15.08+612.015.33+616—009.24+615.213

Н. Г. Сергиенко, Л. Д. Попова

АКТИВНОСТЬ ТРИПТОФАНПИРРОЛАЗЫ И ОСОБЕННОСТИ ЕЕ РЕГУЛЯЦИИ У КРЫС С ВЫСОКОЙ АУДИОГЕННОЙ ВОЗБУДИМОСТЬЮ

В генезе судорожных состояний важная роль принадлежит нарушениям в обмене триптофана. Так, у животных с низким судорожным порогом обнаружено снижение уровня серотонина в головном мозге [8], а у больных эпилепсией — изменения его концентрации в крови [1, 2], спинномозговой жидкости [7] и моче [12].

Одной из причин этих нарушений может быть переключение метаболизма триптофана на кинурениновый путь. На возможную роль кинуренинов в генезе повышенной судорожной готовности указывают данные литературы, согласно которым кинуренин, введенный внутрижелудочно мышам [6] или локально в гиппокамп лягушкам [3], способен вызывать судорожные эффекты. Известно также, что кинурениновый путь метаболизма триптофана лимитируется активностью триптофанпирролазы (ТП, триптофан-2,3-диоксигеназа, К.Ф.1.13.1.12).

В связи с этим целью данной работы явилось изучение активности ТП и некоторых особенностей ее регуляции у крыс с разной генетически детерминированной аудиогенной возбудимостью.

Методика

Определяли активность ТП у крыс, различающихся по уровню аудиогенной возбудимости. Опыты проведены на беспородных крысах (23 животных) и крысах линии Вистар (62 животных), тестированных по чувствительности к аудиогенному раздражителю [4, 5], и разделенных на две группы — высоковозбудимые (В) и низковозбудимые (Н), а также крысах линии Крушинского — Молодкиной (6 животных).

Активность ТП определяли в печени крыс по [10]. С целью выяснения роли факторов, возможно, принимающих участие в регуляции активности ТП у крыс линии Вистар с разной аудиогенной возбудимостью, помимо определения базальных уровней фермента, была исследована активность ТП при насыщении инкубационной среды гемом (в инкубационную среду, содержащую 1,25 мл дважды дистиллированной воды; 0,75 мл 0,2 М натрий-фосфатного буфера, рН 7,0; 0,25 мл 0,03 М раствора L-триптофана и 0,75 мл супернатанта, дополнительно вносили 0,01 мл 2 мМ раствора гематина) т. е. полная активность фермента. Предположив, что никотинамид (НА, один из конечных продуктов кинуренинового пути метаболизма триптофана) и никотинамидадениндинуклеотид (НАД, производное НА) могут влиять на активность ТП по принципу обратной связи, мы изучали активность энзима у животных линии Вистар групп Н и В, находившихся в течение 2 нед на диете с повышенным содержанием НА (75 мг/кг массы тела / 24 ч) или НАД (124 мг/кг массы тела / 24 ч). Кроме того, изучали влияние НА и НАД на активность фермента *in vitro*. С этой целью в среду инкубации вносили физиологические концентрации указанных веществ (0,165 мкмоль НА и 0,106 мкмоль НАД).

Поскольку по литературным данным, кортикостерониды, в частности гидрокортизон [11], могут повышать синтез ТП, мы изучали уровень суммарных 11-оксикортикостеронидов в плазме крови крыс линии Вистар с разной аудиогенной возбудимостью. Концентрацию суммарных 11-оксикортикостеронидов в плазме крови исследовали методом флуоресцентного анализа при длине волны возбуждающего света 475 нм с максимумом флуоресценции в области 520 нм [9]. Полученные результаты подвергали статистической обработке с применением критерия Стьюдента.

Исследование
вышена у высоково
стар), а также у
нию с низково
ски одинаков как
Вистар (1, 7). Та
лена одна и та же
соковозбудимых жи

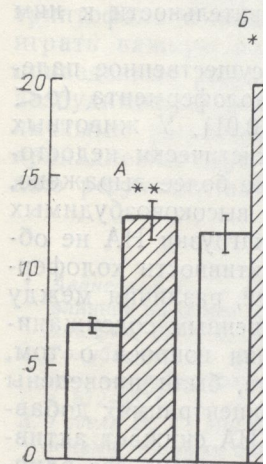


Рис. 1. Активность три

По вертикали — активность
родные крысы, Б — линии В
возбудимые — заштрихованы

Рис. 2. Влияние физиолог
и никотинамидадениндин
крыс с высок

По горизонтали: А — высок
Б — при добавлении в сред

Относительно в
тивности ТП у живо
положения: 1) поск
можно, у животных
степень насыщения
оказывают влияние
ложить, что у крыс
ме крови; 3) возмо
конечных продуктов

С целью провер
лофермента, были ис
в среду инкубации 0
лофермента к полно
пени насыщения апо
бавление в инкубаци
повышению активнос
вышение более выра
стью (на 62 %). По
фермента гемом у ж
($p > 0,05$). Это дает
фермента в клетках
повышена степень на
тивность энзима при

Результаты и их обсуждение

Исследование активности ТП показало, что она существенно повышена у высоковозбудимых крыс (как беспородных, так и линии Вистар), а также у крыс линии Крушинского — Молодкиной по сравнению с низковозбудимыми (рис. 1). Коэффициент повышения практически одинаков как для беспородных крыс (1, 8), так и для крыс линии Вистар (1, 7). Таким образом, для всех изученных линий крыс выявлена одна и та же направленность в изменении активности ТП: у высоковозбудимых животных активность фермента повышена.

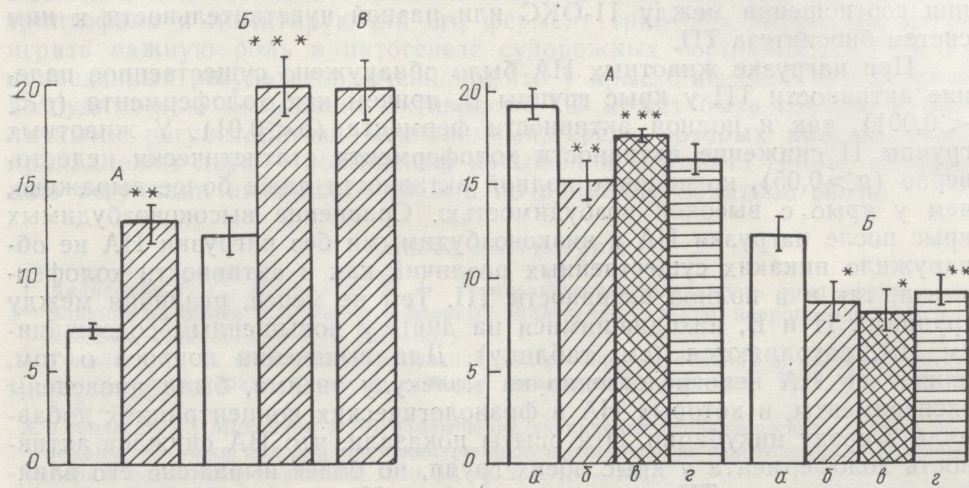


Рис. 1. Активность триптофанпирролазы в печени крыс с разной аудиогенной возбудимостью.

По вертикали — активность в нмоль кинуренина/мг белка за 60 мин; по горизонтали: А — беспородные крысы, В — линии Вистар, В — линии Крушинского — Молодкиной. Белые столбики — низковозбудимые — заштрихованные — высоковозбудимые к аудиогенному раздражителю крысы. ** — $p < 0,01$; *** — $p < 0,01$.

Рис. 2. Влияние физиологических доз никотиновой кислоты (НК), никотинамида (НА) и никотинамидадениндинуклеотида (НАД) на активность триптофанпирролазы *in vitro* у крыс с высокой (В) и низкой (Н) аудиогенной возбудимостью.

По горизонтали: А — высоковозбудимые, В — низковозбудимые крысы. а — исходная активность, б — при добавлении в среду инкубации НК, в — при добавлении НАД, г — при добавлении НА. * — $p < 0,05$. Остальные обозначения см. рис. 1.

Относительно возможных причин, приводящих к повышению активности ТП у животных группы В, можно высказать следующие предположения: 1) поскольку ТП является гемсодержащим белком, возможно, у животных с разной аудиогенной возбудимостью неодинакова степень насыщения апофермента гемом; 2) поскольку кортикостероиды оказывают влияние на синтез апофермента ТП [11], можно предположить, что у крыс группы В может быть изменен их уровень в плазме крови; 3) возможно, изменена регуляция активности ТП одним из конечных продуктов кинуренинового пути метаболизма триптофана.

С целью проверки первого предположения, кроме активности холофермента, были исследована полная активность ТП (при добавлении в среду инкубации 0,01 мл 2 мМ гематина). Отношение активности холофермента к полной активности ТП дает возможность судить о степени насыщения апофермента гемом. Эксперименты показали, что добавление в инкубационную среду гематина приводит к существенному повышению активности ТП, причем у крыс с низкой возбудимостью повышение более выражено (на 82 %), чем у крыс с высокой возбудимостью (на 62 %). Полная активность ТП в условиях насыщения апофермента гемом у животных групп Н и В фактически не отличается ($p > 0,05$). Это дает возможность предположить, что количество апофермента в клетках печени высоковозбудимых крыс не изменено, но повышена степень насыщения фермента гемом. Так, если полную активность энзима принять за 100 %, то у животных с высокой аудиоген-

ной возбудимостью в виде холофермента выявляется 68 % его активности, а у крыс с низкой возбудимостью — только 39 %.

Эксперименты, в которых изучали уровень 11-оксикортикостероидов (11-ОКС) в плазме крови крыс, не выявили существенного различия между группами животных с разной аудиогенной возбудимостью (группа Н — 1,091 мкмоль/л, группа В — 1,056 мкмоль/л, $p > 0,05$). Эти результаты согласуются с изложенными выше данными, свидетельствующими об одинаковом количестве апофермента ТП у крыс групп Н и В. Одинаковое содержание суммарных 11-ОКС в плазме крови животных с разной аудиогенной возбудимостью не исключает изменения соотношения между 11-ОКС или разной чувствительности к ним систем биосинтеза ТП.

При нагрузке животных НА было обнаружено существенное падение активности ТП у крыс группы В, причем как холофермента ($p < 0,001$), так и полной активности фермента ($p < 0,01$). У животных группы Н снижение активности холофермента статистически недостоверно ($p > 0,05$), но падение полной активности даже более выражено, чем у крыс с высокой возбудимостью. Сравнение высоковозбудимых крыс после нагрузки НА с низковозбудимыми без нагрузки НА не обнаружило никаких существенных различий как в активности холофермента, так и в полной активности ТП. Тем не менее, различия между группами Н и В, находившимися на диете с повышенным содержанием НА, сохраняются (см. таблицу). Для выяснения вопроса о том, влияет ли НА непосредственно на молекулу энзима, были проведены эксперименты, в которых НА в физиологических концентрациях добавляли в среду инкубации. Эти опыты показали, что НА снижает активность холофермента у крыс обеих групп, но более выражено его влияние на активность ТП у животных группы Н (рис. 2). Таким образом, опыты *in vitro* и *in vivo*, в которых изучали влияние НА на активность ТП, дают основание предполагать, что у животных с высокой аудиогенной возбудимостью ослаблены механизмы регуляции активности фермента, реализуемые через НА.

Влияние насыщения среды инкубации гемом, а также диеты, обогащенной никотинамидом (НА) и никотинамидадениндинуклеотидом (НАД), на активность триптофанпирролазы у крыс с высокой (В) и низкой (Н) аудиогенной возбудимостью

Характер диеты	Активность фермента					
	Холофермент			Полная активность фермента		
	Группа животных		$P_{Н-В}$	Группа животных		$P_{Н-В}$
	Н	В		Н	В	
Обычная диета (I)	12,06±1,05 (n=16)	20,74±1,89 (n=18)	<0,001	31,08±4,13 (n=15)	33,64±2,16 (n=14)	>0,05
Диета с добавлением НА (II)	11,05±0,74 (n=6)	13,10±0,38 (n=6)	<0,01	15,46±0,60 (n=6)	22,88±1,80 (n=6)	<0,01
Диета с добавлением НАД (III)	8,62±0,99 (n=6)	7,68±0,38 (n=7)	>0,05	12,09±1,05 (n=6)	15,42±0,99 (n=7)	>0,05
P_{II-I}	>0,05	<0,01		<0,01	<0,01	
P_{III-I}	<0,05	<0,001		<0,001	<0,001	

Примечание. Активность фермента выражена в нМоль кинуренина/мг белка/60 мин; n—количество животных в группе, P—достоверность различия данных между соответствующими группами.

В экспериментах, в которых исследовали влияние диеты, обогащенной НАД, на активность ТП, также обнаружено резкое падение активности этого фермента у животных обеих групп. При этом различия между группами полностью нивелировались (см. таблицу). В опытах *in vitro* с добавлением физиологических доз НАД в среду инкубации

были получены результаты, аналогичные тем, что

Результаты экспериментов, в которых изучали влияние НА на активность ТП, могут оказывать влияние на молекулу фермента, вызывая разрушение энзима.

Полученные данные свидетельствуют о том, что пути метаболизма триптофана и лимонной кислоты играют важную роль в регуляции активности ТП. Приведенные результаты подтверждают, что возбудимость по отношению к различным регуляторам принадлежит двум типам регуляции ак

1. Аванесова Т. С., влияние на обмен веществ, 1980, № 1, с. 872—874.
2. Голубков О. З. О обмене веществ, с. 872—874.
3. Гусель В. А., Мухоморов В. А., покампе лягушки перим. биологии и физиологии, 1980, № 1, с. 872—874.
4. Елкин В. И. Генетика, 1980, № 1, с. 872—874.
5. Захария Е. А. Прозрение, 1974, № 20, с. 872—874.
6. Лапин И. П., Никитин В. П., обмен ГЛМК под влиянием НАД, 1981, 27, вып. 1, с. 872—874.
7. Макаров А. Ю., Клепшицкий В. А., лепсии.— Журн. непереносимости, 1980, № 1, с. 872—874.
8. Сергиенко Н. Г. Физиология и биохимия, 80-летие со дня рождения, 1980, № 1, с. 872—874.
9. Усватова И. Я., Пирроидов в плазме крови, мононов в биологическом, 1980, № 1, с. 872—874.
10. Badawy A. B., E. activity of rat liver, 1980, № 1, с. 872—874.
11. Schimke R. T., S. the control of rat, 1980, № 1, с. 872—874.
12. Sergienko N. G., G. de 5-hydroxitriptamine, 1977, 5, N 22, с. 872—874.

Харьков. мед. ин-т

УДК 612.135+612.115.32

СОСТОЯНИЕ И АКТИВНОСТЬ СВЕРТЫВАНИЯ

Функциональные свойства от многих факторов активности, состоящая из различных характеристик