

УДК. 612.014.32

ВЛИЯНИЕ МОЛЕКУЛ СРЕДНЕЙ МАССЫ НА АЛЬДЕГИДДЕГИДРОГЕНАЗНУЮ СИСТЕМУ ПЕЧЕНИ И ЭРИТРОЦИТОВ В ЭКСПЕРИМЕНТЕ

Кирпичева А.Г., Зимин Ю.В.

НИИ травматологии и ортопедии, Нижний Новгород

Изучено влияние молекул средней массы, выделенных из обожженной *in vitro* печени на каталитические и кинетические свойства альдегиддегидрогеназы. Показано, что молекулы средней массы выступают в роли ингибиторов активности исследуемого фермента в эритроцитах и цитозоле печени. Отмечена корреляция уменьшения активности эритроцитарной и цитоплазматической альдегиддегидрогеназы под влиянием молекул средней массы.

Одним из ведущих симптомов термического поражения является интоксикация, наступающая с первых минут после травмы и продолжающаяся в течение всех фаз ожоговой болезни. Несомненно, что важными звеньями в патогенезе ожоговой токсемии являются нарушения функций внутренних органов, прежде всего печени [7]. Так Р.М. Гланц и Б.Т. Билынский [1] установили в эксперименте, что сразу после термической травмы печень становится подвержена влиянию токсических продуктов на фоне резко сниженной ее антитоксической функции. Б.Е. Мовшев и Р.В. Недошивина в своих работах [5,6] констатируют резко выраженную токсичность экстрактов, приготовленных из термически поврежденных органов.

Настоящее исследование посвящено изучению токсических свойств экстрактов обожженной *in vitro* печени на каталитические и кинетические свойства одного из ключевых ферментов биотрансформации – альдегиддегидрогеназу (АлДГ) (КФ 1.2.1.3).

Материал и методы исследования

В опытах использовали печень нормальных беспородных крыс. Термическую обработку печени *in vitro* проводили обжигом печени в спирте в течение 45 секунд. Через 1 час готовили гомогенат в среде, содержащей 0,25 М раствор сахарозы, 0,01М Трис-НСI буфер (рН = 7,5). Из гомогената получали фракцию молекул средней массы (МСМ) по М.Я.Малаховой [3]. Полученный раствор МСМ нейтрализовали 1М раствором K_2CO_3 . Контроль представлен фракцией МСМ, выделенной аналогично из нормальной печени крыс. Токсический эффект МСМ оценивали по изменению активности АлДГ. Полученные экстракты МСМ (ожог и контроль) вводили интактным крысам внутрибрюшинно. Через час после введения животные

забывались путем декапитации. Готовили 10% гомогенат печени на основе среды выделения митохондрий. Цитоплазматическую фракцию печени получали методом дифференциального центрифугирования гомогената [4]. Кровь забирали из шейной артерии в пробирки, содержащие 3,8% раствор цитрата натрия. Затем кровь центрифугировали при 3000 об/мин, плазму удаляли. Эритроциты промывали дважды в физиологическом растворе. Промытые эритроциты гемолизировали добавлением 4 объемов бидистиллированной воды. Активность альдегиддегидрогеназы в гемолизате эритроцитов и цитоплазматической фракции печени крыс определяли по Б. М. Кершенгольцу и Е. М. Серкиной [2], в качестве субстрата использовали 18 мМ ацетальдегид.

Из первичных экспериментальных данных полной кинетической кривой зависимости (V от t), используя математический метод, рассчитывали кинетические параметры ферментативной реакции: K_t – время полупревращения субстрата для ферментативной реакции (мин); V_{max} – максимальную скорость накопления продукта реакции при полном расходе субстрата (мкмоль/мин); V_{max}/K_t – коэффициент каталитической эффективности ферментативной реакции (мкмоль/мин²) [8].

Концентрацию белка определяли по методу Лоури [9]. Полученные результаты обработаны статистически с оценкой достоверности различий между средними величинами по критерию Стьюдента.

Результаты и их обсуждение

Введение экстракта МСМ, приготовленного из обожженной *in vitro* печени, оказывает влияние на активность АлДГ как клеток крови, так и цитоплазматической фракции печени крыс. Активность АлДГ достоверно снижена в

гемолизате эритроцитов (табл.1), и цитоплазме (табл.2) соответственно на 87% и 45% по сравнению с введением раствора “МСМ-контроль”. По сравнению с нормой раствор “МСМ-ожог”

приводит к снижению активности АлДГ в гемолизате на 84%, в цитоплазматической фракции гепатоцитов – на 32%.

Таблица 1. Изменение каталитических и кинетических параметров альдегиддегидрогеназной реакции в эритроцитах крови под влиянием МСМ

Показатель	N	Кмсм	Омсм
A	12,31±1,46 n = 20	15,37±1,34 n = 5	1,99±0,03 */** n = 5
Kt	6,03±1,19	3,21±0,73	3,39±0,25
Vmax	8,37±1,56	1,29±0,25	0,73±0,05*/**
Vmax/Kt	1,53±0,12	0,42±0,02	0,22±0,03*/**

Примечания: N – норма, Кмсм – “МСМ-контроль”, Омсм – “МСМ-ожог”, n – количество животных, * - различия достоверны между группами “МСМ-контроль” и “МСМ-ожог” (p<0,05), ** - различия достоверны по сравнению с нормой, A – активность (нмоль/мин на мг белка).

Таблица 2. Изменение каталитических и кинетических свойств цитоплазматической АлДГ печени крыс под влиянием МСМ

Показатель	N	Кмсм	Омсм
A	76,70±4,81 n=20	94,73±4,39 n=5	52,17±3,17 * n=5
Kt	3,16±0,66	4,59±0,73	10,63±1,90 */**
Vmax	12,74±1,61	5,73±0,68	8,50±1,80
Vmax/Kt	5,02±0,30	1,32±0,12	0,75±0,06*/**

Примечания: N – норма, Кмсм – “МСМ-контроль”, Омсм – “МСМ-ожог”, n – количество животных, * - различия достоверны между группами “МСМ-контроль” и “МСМ-ожог” (p<0,05), ** - различия достоверны по сравнению с нормой, A – активность (нмоль/мин на мг белка).

Таким образом, мы наблюдаем одностороннее снижение активности АлДГ в крови и печени под влиянием ожоговых МСМ и по сравнению с раствором “МСМ -контроль”, и по сравнению с нормой. Наибольшее падение активности фермента в эритроцитах по сравнению с гепатоцитами обусловлено, вероятно, тем, что кровь является той тканью, которая в первую очередь подвергается действию токсических веществ, возникших в очаге поражения.

Контролем для оценки токсичности раствора МСМ, полученных из обожженной *in vitro* печени, служили показатели изменения активности АлДГ под влиянием раствора, приготовленного из печени нормальной крысы. Введение крысам внутривенно раствора “МСМ - контроль” приводит к увеличению активности АлДГ в цитоплазматической фракции печени крыс на 24% с 76,70±4,81 до 94,73±4,39 нмоль/мин на мг белка. Активность АлДГ в гемолизате практически не изменяется и остается в пределах нормы.

Таким образом МСМ, выделенные из обожженной *in vitro* печени, обладают явно выраженными токсическими свойствами, вызывая уменьшение активности АлДГ, что не наблюдалось при введении крысам раствора “МСМ - контроль”.

Снижение активности АлДГ в гемолизате под влиянием раствора “МСМ - ожог” по сравнению со “МСМ - контроль” обусловлено достоверным снижением максимальной скорости накопления продукта реакции при полном расходовании субстрата на 43% и уменьшением коэффициента каталитической эффективности ферментативной реакции на 48%. Теми же причинами обусловлено снижение активности АлДГ при введении “ожоговых МСМ” по сравнению с нормой: Vmax уменьшается на 91%, Vmax/Kt – уменьшается на 86%.

Падение активности АлДГ в цитоплазматической фракции печени крыс под влиянием раствора обожженных МСМ по сравнению со “МСМ-контроль” обусловлено достоверным возрастанием времени полупревращения субстрата более чем на 100% и снижением коэффициента каталитической эффективности ферментативной реакции на 43%.

Снижение активности цитоплазматической АлДГ под влиянием “ожоговых” МСМ по сравнению с нормой связано с увеличением времени полупревращения субстрата для ферментативной реакции более чем на 100%, уменьшением Vmax на 33% и снижением коэффициента каталитической эффективности ферментативной реакции на 85%.

Таким образом, МСМ, выделенные из обожженной *in vitro* печени выступают в роли ингибиторов активности АлДГ в эритроцитах и цитозоле печени. Кинетический механизм ингибирования фермента разный. Раствор “МСМ-ожог” снижает активность фермента в гемолизате эритроцитов по типу “чистого неконкурентного” ингибирования: K_t не изменяется, V_{max} и V_{max}/K_t уменьшаются (табл.1), а в цитозоле – по типу “конкурентного” ингибирования, когда увеличивается K_t , уменьшается V_{max}/K_t , остается без изменения величина V_{max} .

Проведенные исследования свидетельствуют об отчетливой корреляции изменения активности фермента в цитозоле печени и эритроцитах под влиянием МСМ, полученных из обожженной *in vitro* печени.

Таким образом можно заключить, что фракция МСМ, выделенных из обожженной *in vitro* печени, обладает токсическими свойствами, приводя к достоверному снижению активности АлДГ в гемолизате и цитоплазматической фракции печени крыс, связанному с изменением кинетических свойств альдегиддегидрогеназы при термической травме.

Литература

1. Гланц Р.М., Билынский Б.Т. Роль функционального состояния печени в патогенезе ожоговой болезни. – В кн.: Ожоговая болезнь. Киев, 1975. С.28-33.
2. Кершенгольц Б.М., Серкина Е.В. Некоторые методические подходы к изучению метаболизма этанола // Лабораторное дело. 1981. №2.С.126.
3. Малахова М.Я. Метод регистрации эндогенной интоксикации (пособие для врачей). СПб., 1995. 34с.
4. Методы биохимических исследований /Под ред. М.И.Прохоровой. Л.,1982.С.29-33.
5. Мовшев Б.Е., Недошивина Р.В. Токсичность экстрактов обожженной кожи в зависимости от способа их приготовления и хранения // Патологическая физиология и экспериментальная терапия. 1973. №6. С. 59 – 61.
6. Мовшев Б.Е., Недошивина Р.В. Влияние температуры и рН среды на токсические свойства экстрактов обожженной и нормальной кожи // Патологическая физиология и экспериментальная терапия. 1974. №4. С. 38 – 41.
7. Федоров Н.А., Мовшев Б.Е., Недошивина Р.В., Корякина И.К. Ожоговая аутоинтоксикация. Пути иммунологического преодоления. М., 1985.С.27.
8. Kostir J. Prime stanoveni michaelisovy konstanty // Chemicke Listy. 1985. V. 79, № 9. P.989 – 991.
9. Lowry O.U., Rosebrough N.J., Forr A.L., Rondall R.J. Protein measurement with the Folin Phenol reagent // Journal of Biological Chemistry. 1951. №193. P.265-275.

Influence of molecules of average weight on aldehyde dehydro-genase system of liver and erythrocytes in experiment

Kirpicheva A.G., Zimin Yu.V.

Research Institute of Traumatology and Orthopedic, Nizhny Novgorod

The influence of molecules of average weight received from burn liver *in vitro* on catalytic and kinetic properties of aldehyde dehydrogenase has been studied. It has been shown that molecules of average weight are as inhibitors of activity of enzyme researched in erythrocytes and liver cytoplasm. The correlation of decrease of activity of erythrocytic and cytoplasmic aldehyde dehydrogenase under the influence of molecules of average weight.