

УДК: 616.36-036.11-099:612.128:547.979-733

© Коллектив авторов

ИЗМЕНЕНИЕ АКТИВНОСТИ ФЕРМЕНТОВ СИНТЕЗА И РАСПАДА ГЕМА И СОДЕРЖАНИЕ МИКРОСОМАЛЬНЫХ ГЕМОПРОТЕИНОВ ПРИ ОСТРОМ ПОРАЖЕНИИ ПЕЧЕНИ ТИОАЦЕТАМИДОМ

Х.Я.КАРИМОВ, Ф.Х.ИНОЯТОВА, М.А.ДОЛИМОВА

Второй Ташкентский Медицинский Институт
700109, ул. Фараби 2, главный учебный корпус 2-ТашГосМИ
тел: + (998-712) 46-83-11, 46-95-52,
факс: +(998-71) 144-2603, 3183, 289-0046

В работе приводятся данные изменения активности ферментов синтеза (δ -аминолевулинатсинтаза, дегидратазааминолевулиновой кислоты и гемсинтетаза) и распада (гемоксидаза) гема печени крыс с экспериментальным токсическим гепатитом, вызванным тиацетамидом. Установлено повышение активности ферментов АЛК-синтазы и Д-АЛК, что приводило к накоплению свободных порфиринов в печени. Наряду с этим выявлено повышение активности гем-оксигеназы. Уменьшение синтеза гема коррелировало со снижением содержания цитохрома *P450* и *b₅* в микросомальной фракции печени экспериментальных животных. В целях коррекции микросомальных гемопротеинов целесообразно применение препаратов, индуцирующих синтез гема и снижающих его распад.

Ключевые слова: гем, аминолевулинат-синтаза, аминолевулинат-дегидрогеназа, гемсинтетаза, гем-оксидаза, острое токсическое поражение печени.

ВВЕДЕНИЕ. В последние годы возрос интерес гепатологов к изучению порфиринов. Это связано с нарушением функционирования гемсодержащих ферментных комплексов при острых и хронических поражениях печени. Снижение содержания митохондриальных и микросомальных гемопротеинов при поражениях печени приводило к уменьшению энергетического потенциала клеток, изменению процессов биотрансформации экзо- и эндобиотиков, обуславливая снижение пластических процессов в организме и развитие эндотоксемии [1-3].

Известно, что синтезированный протопорфирин в печени расходуется на синтез гема. Скорость образования гема с одной стороны зависит от активности ключевого фермента синтеза гема – δ -аминолевулинатсинтазы (синтетаза δ -аминолевулиновой кислоты), а с другой - накопление свободного гема в ткани

определяется также скоростью его разрушения гемоксигеназой [4]. Уровень активности ключевых ферментов метаболизма гема определяет его содержание в печени и последующую утилизацию его для синтеза гемопroteинов [5]. На основании данных ряда работ [5,6] сформировалось представление, что активность ферментов наиболее тесно связана с содержанием и активностью гемопroteинов, таких как микросомальные цитохромы P450 и b_5 , митохондриальные цитохромы, ферменты каталаза и др. Несмотря на важность изучения нарушений обмена порфиринов при заболеваниях печени, в литературе эти вопросы недостаточно освещены [7].

Цель настоящей работы – изучение активности ферментов синтеза и распада гема при остром токсическом поражении печени.

МЕТОДИКА. Исследования проводились на 45 половозрелых белых крысах-самцах, с исходной массой тела 140-180 г. Острое токсическое поражение печени воспроизводили однократным введением тиоацетамида в дозе 20 мг/100 [3]. К концу эксперимента летальность составила 15,5 %. О развитии гепатита судили по морфологическим данным и развитию гиперферментемии. Исследования проводили через 1, 4, 7 и 10 суток от начала опыта. Субклеточные структуры выделяли дифференциальным центрифугированием гомогената печени. В митохондриальной фракции определяли активность δ -аминолевулинат-синтазы (АЛК-синтаза) [8] и гемсинтетазы [9], а в микросомально-цитозольной фракции – активность дегидратазы аминокислоты (Д-АЛК) [10] и гемоксигеназы [4]. Содержание цитохромов P450 и b_5 в микросомальной фракции определяли дифференциальной спектрофотометрией на спектрофотометре «Specord M-40» [11]. Содержание белка в пробах определяли микробиуретовым методом. Полученные результаты были обработаны методом вариационной статистики на IBM-486 с применением специального пакета программ.

В работе использовали следующие реактивы: гемин, АЛК-гидрохлорид, протопорфирин IX («Sigma», США), реактив Эрлиха («Агат», Россия).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ. Как видно из данных, представленных в таблице 1, активность АЛК-синтазы в печени максимальна через 1-сутки после введения гепатотоксина и постепенно снижается, приближаясь к значению интактной группы крыс на 10-сутки. В отличие от АЛК-синтазы, Д-АЛК существенно не изменялась на 1-4-сутки, а в дальнейшем возрастала, превышая статистически значимо значения нормы в 3,63 и 3,87 раза через 7 и 10 суток опыта, соответственно. Активность фермента гемсинтетазы возрастала через сутки опыта в 3,13 раза ($p < 0,05$), затем постепенно снижалась по сравнению с предыдущим сроком. Гемоксигеназа во все сроки исследования имела тенденцию к увеличению.

Согласно данным литературы [4-6], синтез гема в печени осуществляется в митохондриях (АЛК-синтаза и гемсинтетаза) и в микросомально-цитозольной фракциях (Д-АЛК). Наблюдаемое нами существенное увеличение активности АЛК-синтазы в митохондриях через сутки после введения гепатотоксина может быть связано с интенсивным расходом сукцината для синтеза гема, что уменьшает его использование дыхательной цепью митохондрий печени экспериментальных животных. Действительно, ранее проведенные исследования [2,3] показали подавление эндогенного дыхания в результате уменьшения фонда эндогенных субстратов в митохондриях и, как следствие, развитие низкоэнергетического сдвига. Однако, через 4 суток наблюдалась активация

окислительных процессов в митохондриях и развитие высокоэнергетического сдвига, вследствие монополизации дыхательной цепи янтарной кислотой что, на наш взгляд, связано со значительным образованием янтарной кислоты из других соединений [12] и уменьшением оттока сукцината для синтеза гема, что совпадает со снижением активности АЛК-синтазы в наших опытах. В последующие сроки, вследствие развития мелкоочаговых некрозов в печени, функционирование митохондрий ослабляется.

Таблица 1. Показатели синтеза и распада гема в печени в динамике ее острого токсического поражения.

Группы	Активность ферментов			
	АЛК-синтаза, нмоль АЛК /ч на мг белка	Д-АЛК, мкмоль/ с на мг белка	Гемсинтетаза, мкмоль протопорфирина/мин на мг белка	Гемоксигеназа, нмоль билирубина/ мин на мг белка
Интактная (n=8)	0,254±0,006	0,112±0,005	0,014±0,001	1,440±0,053
Острый токсический гепатит				
1 сутки после отравления (n=7)	0,492±0,039*	0,145±0,011	0,050±0,037*	1,591±0,066
4 суток после отравления (n=8)	0,335±0,011*	0,106±0,024	0,028±0,003*	1,900±0,036
7 суток после отравления (n=8)	0,310±0,005*	0,408±0,014*	0,015±0,004	1,976±0,093
10 суток после отравления (n=7)	0,259±0,024	0,434±0,062*	0,013±0,0023*	1,950±0,030*

Примечание: *-достоверность различий по сравнению с показателями интактной группы крыс ($p < 0,05$)

Несмотря на активацию АЛК-синтазы и Д-АЛК, повышенный в 1-4 сутки опыта синтез гема постепенно снижается, что свидетельствует об использовании и образовании свободных предшественников порфиринов [9] и замедлении синтеза гема в печени экспериментальных животных. Наряду с этим усиливается и распад гема, вследствие активации гем-оксигеназы и снижение содержания гемопротеинов в клетке.

Действительно, исследование содержания микросомальных гемопротеинов показало их снижение (табл.2). Причем, если содержание цитохрома b_5 снижается через 1,4 и 7 суток от начала эксперимента в 1,37; 1,95 и 2,50 раза по отношению к значениям нормы, то цитохрома P450 в 3,18; 4,94 и 8,08 раза, соответственно.

Согласно данным литературы [4,6,8] корреляция между повышением активности АЛК-синтазы – фермента, лимитирующего скорость синтеза гема, и содержанием микросомального цитохрома P450 наблюдается только в том случае, если образующийся гем не разрушается гемоксигеназой, и если одновременно индуцируется синтез соответствующего апоцитохрома. При высокой активности гемоксигеназы АЛК-синтаза не может обеспечить накопление свободного гема в ткани, и содержание цитохромов, особенно имеющих сравнительно короткий период полураспада, снижается либо остается на таком уровне, как у контрольных животных [4].

Видимо, этим можно объяснить резкое снижение уровня цитохрома P450 в наших опытах. Так, цитохром P450 сравнительно короткоживущий фермент. Его

период полужизни составляет 1-2 дня и он использует большую часть фонда гема в клетке [6]. Другие цитохромы – долгоживущие, они используют меньше свободного гема при обновлении, и создаваемый в конкретных экспериментальных условиях кратковременный дефицит гема не может оказать

Таблица 2. Содержание микросомальных гемопротеидов в печени экспериментальных животных

Группы	Содержание цитохромов, нмоль/мг белка	
	P450	b ₅
Интактная (n=8)	0,889±0,063	0,287±0,012
Острый токсический гепатит через:		
Через 1 сутки (n=7)	0,279±0,030*	0,209±0,017
Через 4 суток (n=8)	0,180±0,015*	0,147±0,010*
Через 7 суток (n=8)	0,110±0,024*	0,115±0,026*

Примечание: * - достоверность различий по сравнению с показателями интактных животных достоверны (p<0,05).

существенного влияния на их уровень. Когда в клетке снижается уровень свободного гема, включаются механизмы стимуляции его синтеза путем повышения активности АЛК-синтазы. Напротив, при введении животным веществ, повышающих уровень свободного гема, увеличивается активность гем-оксигеназы, что сопровождается разрушением избытка гема. В этих условиях включаются механизмы длительной регуляции активности ключевых ферментов метаболизма гема, ведущие к синтезу их *de novo*. Указанные механизмы препятствуют созданию на длительный период апопротеинов дефицита гема в клетке, а замедление деградации соответствующих апопротеинов способствует поддержанию постоянного уровня митохондриальных цитохромов.

Таким образом, при остром токсическом поражении печени наблюдаются значительные изменения в активности ферментов синтеза и распада гема. Начальная активация ферментов синтеза гема постепенно снижается на фоне усиления метаболизма гема, что совпадает с уменьшением содержания микросомальных гемопротеинов в печени экспериментальных животных.

Работа выполнена согласно НИР 2-ТашГосМИ

ЛИТЕРАТУРА.

1. Иноятлова Ф.Х., Хакимов З.З., (1995) Узбекский биологический журнал, №6, 7-10.
2. Каримов Х.Я., Иноятлова Ф.Х., Иноятлов Ф.Ш., Нарзиев Ш.С., (1996) Центральнo-Азиатский медицинский журнал, № 4-5, 41-45.
3. Inoyatova F.H. (1996) Exp. Toxicol. Pathol. Supplement II. 49.-№12, 183-188.
4. Калиман П.А., Падалко В.И. (1981) Биохимия, 46, 1482-1486.
5. Калиман П.А., Никитченко И.В. (1989) Украинский биохимический журнал, 61, 75-78.

6. Калиман П.А., Беловецкая И.В., Падалко В.И., Пиеничкова Г., Рязанцев В.В., Соболева И.А. (1983) В кн.: Физиология и биохимия онтогенеза.-Киев: Наукова думка, с. 56-61,
7. Макаревич Я.А., Штрина А.П. (1986) Тер. архив, №9, 61-65.
8. Калиман П.А., Беловецкая И.В. (1986) Биохимия, **51**, 1302-1307.
9. Идельсон Л.И. (1969) В кн.:Нарушения порфиринового обмена в клинике внутренних болезней, Москва, с. 52-55.
10. Семёнова Л.С. (1985) Лаб. дело, №11, 687-688.
11. Otsura T., Sato R. (1964) J.Biol.Chem., **230**, 2370-2373.
12. Кондрашова М.Н. (1989) В кн.: Фармакологическая коррекция гипоксических состояний. Москва, с. 51-66.
13. Kiruchi G. (1982) Asian. Med. J, **25**, №7, 469-518.
14. Kiruchi G., Yoshida T. (1983) Mol. and Cell. Biochem., №1, 163-183.
15. Кондрашова М.Н. (1991) Биохимия, **56**, 388-405.

Поступила 03.05 2000 г.

EFFECT OF ACUTE THIOACETAMIDE- INDUCED HEPATITIS ON THE ACTIVITY OF HEME-METABOLISING ENZYMES AND CONTENT OF MICROSOMAL HEMOPROTEINS

KH.YA.KARIMOV, F.H.INOYATOVA, M.A.DOLIMOVA

Second Tashkent state Medical Institute
700109, 2 Farabi street, Main Training building 2nd TashMI
Phone: +(998-712) 46-83-11, 46-95-52
Fax: +(998-71) 144-2603, 144-3183, 289-0046

Thioacetamide administration to rats (20 mg/100 g) caused the development of toxic hepatitis which was accompanied by the increase of hepatic ALA -synthase and D-ALA that led to accumulating free porphyrines in the liver. At the same time an increase in activity of heme oxygenase was also found. A decrease in heme synthesis correlated with a decrease in content of cytochrome P450 and b5 in microsomal hepatic fraction of experimental animals.

Key words: heme, aminolevulinate-synthase, aminolevulinate-dehydrogenase, heme synthetase, heme oxidase, acute toxic damage of the liver.