

УДК 577.15:616.36-002-099.3:616-003.96

© Коллектив авторов

МОЛЕКУЛЯРНЫЕ МЕХАНИЗМЫ МЕТАБОЛИЧЕСКОЙ АДАПТАЦИИ ПАТОЛОГИЧЕСКИ ИЗМЕНЁННОЙ ПЕЧЕНИ ПРИ ТОКСИЧЕСКОМ ГЕПАТИТЕ

Ю.В. ЗИМИН¹, С.П. СЯТКИН², Т.Т. БЕРЕЗОВ²

¹ ННИИТО, группа молекулярной патологии, 603000 Н.Новгород, Верхне
Волжская наб., 18; телефон (8312) 36-25-31; Факс (8312) 36-05-91,
эл. почта: yuzimin@mail.ru

² РУДН, кафедра биохимии, 117198, Москва, тел./факс: (095) 434-04-12
эл. почта: berez@med.pfu.edu.ru

Проводилось изучение возможных молекулярных механизмов изменения каталитических свойств алкогольдегидрогеназы и лактатдегидрогеназы при токсическом гепатите. Установлено, что при поражении печени существенно падает активность данных оксидоредуктаз в субклеточных фракциях. Кинетические свойства ферментов так же изменяются. В итоге это может приводить к увеличению содержания ацетальдегида и лактата в клетках, что способствует развитию цирроза печени.

Ключевые слова: гепатит, лактатдегидрогеназа, алкогольдегидрогеназа

ВВЕДЕНИЕ. Проблема изучения молекулярных механизмов регуляции метаболической адаптации патологически изменённой печени остаётся важным направлением современной экспериментальной и клинической медицины, в частности гепатологии. Особенно это важно в современных условиях, когда значительно увеличивается количество больных с поражением печени. До сих пор неизвестны молекулярные механизмы, приводящие к существенным изменениям ферментативных систем гепатоцитов при токсическом воздействии. Это имеет важное значение с одной стороны для выявления энзиматических поломок (энзимопатий) и установления характера метаболического блока, развивающегося при токсическом гепатите.

Целью настоящего исследования явилось изучение возможных молекулярных механизмов изменения адсорбционных и кинетических свойств алкогольдегидрогеназы и лактатдегидрогеназы патологически изменённой печени в условиях экспериментального моделирования токсического гепатита.

МЕТОДИКА. Исследования проводили на белых беспородных крысах - самцах массой 180 - 200 г.

Модель экспериментального токсического гепатита создавали подкожным введением 66% раствора четырёххлористого углерода в растительном масле в дозе 0,3 мл 4 раза в неделю в течение трёх месяцев. После прекращения инъекций все экспериментальные животные были разделены на две группы:

- 1 группа - животные с экспериментальной патологией (токсический гепатит).
- 2 группа - контрольная (интактные животные).

Митохондриальную и цитозольные фракции печени крыс получали методом дифференциального центрифугирования [1,2].

Электростатическое взаимодействие ферментов с внешней мембраной митохондрий изучали по методу [3], путём суспендирования митохондрий в 0,15 М NaCl, pH 6,0. После 20-минутной преинкубации на холоду, митохондрии осаждали центрифугированием при 14000g в течение 15 минут. Процедуру проводили однократно. Активность ЛДГ и АДГ определяли в митохондриях до и после воздействия NaCl. В субклеточных фракциях печени проводилось определение активности ЛДГ и АДГ в прямой и обратной реакциях [4-6]. Активность ферментов выражали в нмоль НАДН за 1 мин на 1 мг белка.

Для определения кинетических констант ЛДГ, АДГ реакций нами использовалась вся кривая накопления продуктов реакции (зависимость скорости накопления продуктов от времени от начала реакции до полного расходования субстрата). Из первичных экспериментальных данных полной кинетической кривой зависимости (P от t), используя математический метод, рассчитывали кинетические параметры ферментативной реакции (K_t , P_{\max} , P_{\max}/K_t) [7].

- K_t - время полупревращения субстрата для ферментативной реакции (мин).

- P_{\max} - максимальная скорость накопления продукта реакции при полном расходе субстрата (мкмоль/мин). Расчёт кинетических показателей ЛДГ и АДГ проводили, используя первичные экспериментальные данные при определении активности ферментов. P_{\max}/K_t - коэффициент каталитической эффективности ферментативной реакции (мкмоль / мин²).

- H - коэффициент направленности метаболических изменений:

$$H = [(P_{\max}/K_{t\text{ЛДГпр}}) + (P_{\max}/K_{t\text{АДГобр}})] / [(P_{\max}/K_{t\text{АДГпр}}) + (P_{\max}/K_{t\text{ЛДГобр}})].$$

Концентрацию белка в субклеточных фракциях определяли по методу Лоури в модификации [8].

Полученные экспериментальные данные обработаны методом вариационной статистики на ЭВМ IBM.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ. В соответствии с задачей работы нами были изучены каталитические свойства ЛДГ, АДГ печени крыс, определение которых вносит новые представления в оценку роли энзимологических механизмов регуляции метаболической адаптации печени при экспериментальной патологии печени. Проведённые ранее исследования показали преимущественное протекание в субклеточных фракциях печени интактных животных обратной реакции ЛДГ и АДГ по сравнению с прямой. Это в первую очередь обусловлено значительно более высоким сродством ферментов к субстратам обратной реакции [9,10]. Убедительно показано, что максимальная скорость ЛДГ и АДГ реакции выше у растворимых ферментов, чем у связанных с мембранами субклеточных органелл. Так, при взаимодействии с мембранами

митохондрий и микросом активность этих окислительных ферментов существенно снижается [11].

Основываясь на представлениях о том, что оксидоредуктазы способны образовывать фермент - ферментные комплексы [12,13], нам представляется возможным предположить, что в условиях внутриклеточного окружения ЛДГ и АДГ могут быть связаны в надмолекулярный структурно-функциональный комплекс, где алкогольдегидрогеназа выполняет роль регуляторного энзима. Данное предположение включает следующие допущения, которые основаны на теоретических положениях, представленных в многочисленных публикациях: 1. В образовании фермент-ферментного комплекса принимают участие преимущественно электростатические силы. 2. Один из ферментов комплекса может гидрофобно взаимодействовать с мембранами, выступая в роли "якорного белка". 3. Адсорбция комплекса с мембранными структурами обратима и регулируется клеточными метаболитами [14].

С целью изменения сил электростатического взаимодействия ферментативного комплекса нами был использован 0,15 М NaCl при pH 6,0, когда солубилизирующий эффект мембраносвязанных ферментов минимален. Применение данного реагента позволило выявить увеличение активности АДГ пр и ЛДГ пр в митохондриальной фракции печени интактных животных, что свидетельствует о достаточно высокой лабильности связи белок - белкового взаимодействия и её регуляторной подвижности. При этом сохраняется связь ферментов с внешней мембраной митохондрий, что может указывать на важное значение гидрофобного взаимодействия комплекса энзимов с мембраной. Для его разрушения и солубилизации ЛДГ, АДГ необходимо применение растворов с высокой ионной силой (0,5 - 1,2 М NaCl), а также Тритона X-100, действующего на гидрофобные связи.

Разработанный нами методический подход кинетического анализа ферментов, входящих в состав сложной гетерогенной системы (мультиэнзимный комплекс), позволил оценить направленность метаболических изменений в субклеточных фракциях печени, связанных с каталитическими свойствами ЛДГ, АДГ, при метаболической адаптации данного органа к факторам среды [15,16]. Установлено, что у интактных животных энзиматические механизмы взаимодействия обмена лактат - пируват и этанол - ацетальдегид направлены в сторону увеличения содержания эндогенного пирувата и этанола в клетке. Это создаёт условия эффективного использования пирувата митохондриями в условиях аэробного синтеза АТФ [17]. В то же время поддержание оптимальной концентрации ацетальдегида играет важную роль в регуляции работы дыхательной цепи митохондрий [18,19]. При моделировании токсического гепатита обращает на себя внимание сохранение достаточно высокой активности ЛДГ в прямой реакции и падение активности ЛДГ обр и АДГ в субклеточных фракциях печени относительно интактных животных. Изменения активности ЛДГ и АДГ в гомогенате печени крыс при токсическом гепатите представлены в табл. 1. Из данных табл. видно, что общая тканевая активность ЛДГ и АДГ в гомогенате печени при токсическом гепатите претерпевает существенные изменения. Активность ЛДГ обр снижается на 56,9%, АДГ пр на 94,3%, а АДГ обр на 98,7% относительно интактных животных. Значительно падает отношение ЛДГ обр/ЛДГ пр до 0,5 (в контроле 1,3) и АДГ обр/ АДГ пр - 1,1 (в контроле 5,4). Данные энзиматические изменения характерны для ткани гепатом, когда происходит увеличение относительного содержания Н субъединиц ЛДГ,

что можно охарактеризовать как сдвиг в сторону приобретения сходства по данному признаку с эмбриональной печенью [20]. Возможно, что падение активности ферментов в печени при токсическом гепатите связано с увеличением скорости их деградации в результате протеолиза. Показано, что при введении извне алкогольдегидрогеназы и лактатдегидрогеназы M_4 обнаружен короткий период полужизни, а для ЛДГ H_4 длительный [21]. характ

Таблица 1. Активность ЛДГ, АДГ в гомогенате печени здоровых крыс и при токсическом гепатите (нмоль НАДН/ мин на мг белка)

Условия эксперимента	ЛДГ пр	ЛДГ обр	АДГ пр	АДГобр
Интактные животные (n=40)	603,7 ± 49,2	769,8±61,6	38,67 ± 4,23	206,6 ± 20,8
Токсический гепатит (n=18)	740,0 ± 5,5	331,1±6, 0*	2,21±0,07*	2,50 ± 0,07*

Примечание: Здесь и в последующих таблицах звездочкой указаны достоверные изменения относительно интактных животных - * $p < 0,05$, а в скобках - количество животных.

Образование мембранных дефектов опережает развитие ультраструктурных изменений в гепатоцитах, характерных для воздействия CCl_4 , что приводит к изменению взаимодействия ферментов с мембранами [22]. При воздействии на митохондрии 0,15 М NaCl происходит активация АДГобр и ингибирование ЛДГпр, что указывает на сохранение функциональной связи между ферментами. После солюбилизации активность окислительных ферментов в митохондриальной фракции при токсическом гепатите имеет различный характер изменения по сравнению с интактными животными (табл. 2). Из таблицы 2 видно, что после солюбилизации в митохондриальной фракции печени при токсическом гепатите значительно увеличивается активность только АДГобр на 83,2%, активность ЛДГобр падает на 10,5%; АДГпр на 16,4%, а ЛДГпр на 41,9% (рис. 1).

Таблица 2. Активность ЛДГ, АДГ в митохондриальной фракции печени здоровых крыс и при токсическом гепатите до и после солюбилизации 0,15 М NaCl (мкмоль НАДН/мин на г ткани)

Ферменты	Активность до солюбилизации	Активность после солюбилизации
Интактные животные (n=40)		
ЛДГпр	11,29±0,73	15,07±0,60*
ЛДГобр	15,69±0,68	18,65±0,64
АДГпр	0,89±0,07	1,30±0,06*
АДГобр	6,81±0,61	7,79±0,27
Токсический гепатит (n=18)		
ЛДГпр	3,72±0,10	2,16±0,11*
ЛДГобр	2,86±0,05	2,56±0,09
АДГпр	1,22±0,10	1,02±0,08
АДГобр	0,70±0,10	4,17±0,12*

И. Интактные животные

Цитоплазматическая фракция	Митохондриальная фракция
Пируват \rightleftharpoons Лактат	Лактат \rightleftharpoons Пируват
<i>ЛДГ_{пр}</i>	<i>ЛДГ_{пр}</i>
НАДН \rightleftharpoons НАД	НАД \rightleftharpoons НАДН
<i>N=1,7</i>	<i>N=2,5</i>
НАДН \rightleftharpoons НАД	НАД \rightleftharpoons НАДН
<i>АДГ_{обр}</i>	<i>АДГ_{обр}</i>
Ацетальдегид \rightleftharpoons Этанол	Этанол \rightleftharpoons Ацетальдегид

II. Токсический гепатит

Цит. фракция	Мит. фракция
Пируват \rightleftharpoons Лактат	Лактат \rightleftharpoons Пируват
<i>ЛДГ_{пр}</i>	<i>ЛДГ_{обр}</i>
НАДН \rightleftharpoons НАД	НАД \rightleftharpoons НАДН
<i>N=1,0</i>	<i>N=1,1</i>
НАДН \rightleftharpoons НАД	НАД \rightleftharpoons НАДН
<i>АДГ_{обр}</i>	<i>АДГ_{пр}</i>
Ацетальдегид \rightleftharpoons Этанол	Этанол \rightleftharpoons Ацетальдегид

Рисунок 1.

Энзиматические механизмы взаимодействия ЛДГ и АДГ печени крыс при токсическом гепатите (N - коэффициент направленности метаболических изменений).

ЛДГ_{пр} - прямая реакция лактатдегидрогеназы; ЛДГ_{обр} - обратная реакция лактатдегидрогеназы; АДГ_{пр} - прямая реакция алкогольдегидрогеназы
АДГ_{обр} - обратная реакция алкогольдегидрогеназы

Однако в количественном отношении ферментов крайне недостаточно, что отражается в снижении уровня метаболической адаптации. Значения R_{max}/K_t , полученные для цитоплазматической и митохондриальной ЛДГ и АДГ печени крыс при токсическом гепатите представлены в таблице 3.

Таблица 3. Кинетические показатели ЛДГ, АДГ в субклеточных фракциях печени здоровых крыс и при токсическом гепатите ($K_{эф}$ - R_{max}/K_t - мкмоль НАДН/ мин²)

Фермент	Цитозольная фракция	Митохондриальная фракция
Интактные животные (n=40)		
	<i>K_{эф}</i>	<i>K_{эф}</i>
ЛДГ _{пр}	15,78	7,50
ЛДГ _{обр}	19,24	9,21
АДГ _{пр}	0,64	0,49
АДГ _{обр}	17,11	16,45
Токсический гепатит (n=18)		
ЛДГ _{пр}	0,86	1,80
ЛДГ _{обр}	2,96	1,91
АДГ _{пр}	0,17	0,36
АДГ _{обр}	2,35	0,31

Направленность метаболических изменений обмена лактат/пируват и этанол/ацетальдегид в митохондриальной и цитозольной фракциях печени крыс при токсическом гепатите представлена на рис. 1. Обращает на себя внимание, что при токсическом гепатите значение коэффициента H в цитозольной фракции снижается на 37,6%, а в митохондриальной - на 55,9% по сравнению с интактной группой. При этом направленность метаболических изменений в субклеточных фракциях практически одинакова ($H \approx 1$) (рис. 1).

Таким образом при токсическом гепатите имеет место существенное снижение активности ЛДГ и АДГ в обратной реакции, как в гомогенате, так и в субклеточных фракциях печени. Предварительная солюбилизация митохондрий оказывает активирующее действие только на АДГобр в митохондриальной фракции, ингибируя все другие формы ферментов. Кинетические исследования показали сходные данные в цитозольной и митохондриальной фракциях печени при токсическом гепатите, когда направленность изменений обмена лактат/пируват и этанол/ацетальдегид практически одинакова ($H \approx 1$). В итоге это приводит к увеличению содержания ацетальдегида и лактата, которые могут стимулировать синтез коллагена фибробластами, что в свою очередь приводит к накоплению соединительной ткани в печени и развитию цирроза, а на его основе опухолевого роста и возникновение гепатом [23-25].

ЛИТЕРАТУРА

1. Ещенко Н.Д. (1982). Методы биохим. исслед. - Л.: ЛГУ, с. 29 - 33.
2. Фундлей Дж., Эванз У (1990) Биологические мембраны. Методы. М.: Мир.
3. Sagrista M.L., Bozal J (1987) Biochimie, **69**, 205 - 214.
4. Кочетов Г.А. (1980) Практическое руководство по энзимологии. - М.: Высшая школа.
5. Keung W.M., Ho Y.W., Fong W.P. (1989) Comp. Biochem. and Physiol. B, **93**, 169 - 173.
6. Koivusalo M., Baumann M., Votila L. (1989) FEBS Lett., **257**, 105 - 109.
7. Kostir J. (1985) Chemicke Listy., **79**, 989 - 991.
8. Dawson J.M., Heatlic P.L (1984). Anal. Biochem., **140**, 391 - 393.
9. LaRean R.D., Anderson V.E. (1992) Biochemistry, **31**, 4174 - 4180.
10. Черникович И.П., Дорофеев Б.Ф., Мойсеев А.Г. (1993). Вopr. мед. химии. **39**, 38 - 40.
11. Есакова Т.В., Иванов М.В. (1994). Биохимия, **59**, 543 - 550.
12. Fahien L.A., Teller J.K. (1992). J. Biol. Chem. **267**, 10411 - 10422.
13. Ашмарина Л.И., Муронец В.И., Наградова Н.К. (1994) Биохимия, **59**, 873-88.
14. Любарев А.Е., Курганов Б.И. (1995). Биохимия, **60**, 75 - 87.
15. Зимин Ю.В. (1993). Рук. деп. в ВИНТИ РАН. N 315. - 6 с.
16. Зимин Ю.В. (1993). Рук. деп. в ВИНТИ РАН. N 1541. - 6 с.
17. Островский Ю.М., Островский С.Ю. (1995). Аминокислоты в патогенезе, диагностике и лечении алкоголизма. - Минск, Наука и техника.
18. Корнеев А.А., Комиссарова И.А. (1994). Успехи соврм. биол., **114**, 212 - 221.
19. Корнеев А.А., Комиссарова И.А. (1994). Успехи соврем. биол., **114**, 467 - 474.
20. Ходосова И.А. (1988). Ферменты опухолевых клеток. - Л.: Наука.

21. *Короленко Т.А.* (1990). Катаболизм белка в лизосомах. - Новосибирск: Наука.
22. *Подобед О.В., Фёдорова Л.М., Якушева И.В.* (1995). *Вопр. мед. химии.*, **41**, 13 - 16.
23. *Маянский Д.Н., Зубахин А.А.* (1998). *Росс. журн. гастроэнт. гепатол. колопрокт.*, **6**, 6 - 13
24. *Березов Т.Т., Федорончук Т.В.* (1997). *Вопр. мед. химии.* **43**, 280-289
25. *Brenner D.A., Waterboer T., Choi S.K.* (2000). *J.Hepatol.*, **32**, 32 - 38.

Поступила 01.02.01

MOLECULAR MECHANISMS OF METABOLIC ADAPTATION IN LIVER TO PATOLOGICAL CHANGES AT TOXIC HEPATITIS

Yu. V. ZIMIN¹, S.P.SYATKIN², T.T. BEREZOV²

¹Molecular Pathology Group, Research Institute of Traumatology and Orthopedics,
Verkhne – Volzhskaya nab.18, Nizhniy Novgorod 603155, Russia;
tel: (8312) – 362-531, fax: (8312) – 360-591. E-mail: yuzimin@mail.ru

²Department of Biochemistry, Schooll of Medicine, Russian Peoples' Friendship University.
Mikluho-Maklay St. 8, Moscow 117198, Russia.
tel/fax: (095) 434-04-12; E-mail: berez@med.pfu.edu.ru

Possible molecular mechanisms underlying changes in catalytical properties of alcohol dehydrogenase (ADH) and lactate dehydrogenase (LDH) were studied at toxic hepatitis. The development of toxic hepatitis is accomanied by significant changes in the activity of ADH and LDH assayed in subcellular fractions and kinetic characteristics of these enzymes. This can result in an increase cellular level of acetylaldehyde and lactate which promotes the development of liver cirrosis.

Key words: hepatitis, lactate dehydrogenase, alcohol dehydrogrenase