

УДК 577.15:612.015.1

©Коллектив авторов

РОЛЬ ГИПЕРЛАКТАТДЕГИДРОГЕНАЗЕМИИ В ИНДУКЦИИ МЕТАБОЛИЧЕСКИХ НАРУШЕНИЙ В ОРГАНИЗМЕ

**Ф.Н.ГИЛЬМИЯРОВА, В.М.РАДОМСКАЯ, Г.М.БАИШЕВА, И.Г.КРЕТОВА,
М.С.КЛЕЙМАН, Ю.В.ПЕРВОВА**

Кафедра фундаментальной и клинической биохимии с лабораторной
диагностикой Самарского Государственного Медицинского Университета

В условиях эксперимента проведена оценка метаболического эффекта лактатдегидрогеназы, введенной внутривенно в дозе 5000 Е/кг в организм животных. Установлено, что через 48 часов гиперферментемия сопровождается усилением интенсивности гликолитических процессов в печени, сердечной, скелетных мышцах. Выявлены нарушения в фондах субстратов и продуктов лактатдегидрогеназной, малатдегидрогеназной, глутаматдегидрогеназной систем. Происходит изменение активности цитоплазматических и внутримитохондриальных ферментов.

Проведенные эксперименты с введением меченой тритием лактатдегидрогеназы показали, что при гиперферментемии лактатдегидрогеназа поступает в ткани и органы, где накапливается к исходу вторых суток. Это раскрывает реальность участия фермента в метаболических процессах за счет каталитической функции, межмолекулярного взаимодействия, изменения фонда субстратов и коферментов.

Ключевые слова: гиперферментемия, меченая тритием лактатдегидрогеназа, метаболический ответ.

ВВЕДЕНИЕ. В настоящее время известно более 600 типов наследственных энзимопатий человека, характеризующихся отсутствием или понижением активности определенных ферментов [1-3]. Степень увеличения или уменьшения активности фермента при энзимопатиях весьма вариабельна и не всегда коррелирует с тяжестью заболевания [3]. Сложность и многообразие клинической симптоматики, преимущественную органную локализацию патологического процесса трудно объяснить только каталитической функцией и нарушением участия в обменных процессах соответствующего дефектного белка.

Вклад в понимание функций ферментов в норме и патологии вносят представления о роли пространственной структуры, ионного рельефа

макромолекулы белка в реализации межмолекулярных взаимодействий, в регуляции метаболических путей за счет их динамического взаимодействия [4-6].

Известно, что приобретенные энзимопатии служат звеном в формировании нарушений при самых различных заболеваниях и в ряде случаев являются их диагностическими и прогностическими критериями.

Поскольку набор гликолитических ферментов представлен практически во всех тканях, гиперферментемии, обусловленные поступлением лактатдегидрогеназы, являются типичным проявлением патологических процессов с различной топографией, сопровождающихся нарушением проницаемости и целостности структур либо энергетическим истощением.

В соответствии с современными представлениями участие лактатдегидрогеназы в метаболизме не исчерпывается взаимопревращением лактата в пируват, реокислением НАДН. Неканонические функции фермента состоят в автофосфорилировании и осуществлении, таким образом, трансферазной реакции, а также в проявлении АТФазной активности. С учетом высокого содержания гликолитических ферментов в клетке реализация такой активности оказывает влияние на обмен адениловых нуклеотидов. Протеинкиназное и в первую очередь Ca^{2+} /кальмодулинзависимое фосфорилирование лактатдегидрогеназы служит регулятором, в частности, энергетического метаболизма. Изменение заряда дегидрогеназы, обусловленное фосфорилированием апофермента, определяет характер межбелкового, белок-липидного и белок-нуклеинового взаимодействия [7].

Накопленные сведения раскрывают широкий спектр участия лактатдегидрогеназы в процессах жизнедеятельности. В дополнение к этому фермент может взаимодействовать с клеточными структурами и биомолекулами. В частности, лактатдегидрогеназа способна обратимо ассоциироваться с мембранами митохондрий, рибосомами, эндоплазматической сетью, F-актином, тропонином [8, 9]. Таким образом создаются фонды свободного и связанного ферментов, характеризующихся различными параметрами [10-12] и регуляторным потенциалом.

Приведенные данные служат предпосылкой для выяснения роли гиперферментемии лактатдегидрогеназы в индукции метаболических сдвигов в организме и механизма их формирования.

МЕТОДИКА. В условиях эксперимента беспородным кроликам массой 2,5-3,0 кг внутривенно вводили лактатдегидрогеназу в дозе 5000 Е/кг. Содержание метаболитов и активность ферментов белкового и углеводного метаболизма исследовали в крови животных через 20, 60 минут и в тканях (печени, миокарде и скелетных мышцах) через 1 час после введения лактатдегидрогеназы. Определяли активность следующих ферментов: малатдегидрогеназы [13], лактатдегидрогеназы [14], глюкозо-6-фосфатдегидрогеназы [15], глутаматдегидрогеназы [16], альдолазы [17]. Активность аспаратаминотрансферазы и аланинаминотрансферазы измеряли с использованием наборов Био-Lachema-Тест. Содержание метаболитов (малата, оксалоацетата, лактата, пирувата, глицерофосфата, глутамата и 2-оксоглутарата) оценивали спектрофотометрически специфическими ферментативными методами [18, 19]. Определение белка проводили по методу Лоури [20].

Гомогенную лактатдегидрогеназу выделяли из скелетных мышц кроликов по ранее разработанной методике [21]. Меченый фермент получали методом

высокотемпературного твердофазного каталитического изотопного обмена с газообразным тритием [22, 23]. Дегидрогеназную активность контролировали спектрофотометрически до и после обработки тритием. Активность полученных образцов составляла 30 мкКи/мл при концентрации белка 40 мкг/мл. Меченый тритием фермент вводили в хвостовую вену крыс в дозе 7,5 мкКи на кг массы животного. Животных забивали через 1 и 48 час. В щелочных гидролизатах крови, сердца, головного мозга, скелетных мышц, печени, почек, селезенки проводили подсчет количества импульсов с последующим пересчетом на грамм ткани [24].

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ. Гиперферментемия, обусловленная введением лактатдегидрогеназы, сопровождается определенными сдвигами в показателях метаболизма в крови (табл. 1). В сердечной, скелетных мышцах и в печени отмечается усиление гликолитических процессов: возрастает активность альдолазы, лактатдегидрогеназы. Лактат накапливается в скелетных мышцах, его содержание увеличивается и в печени (табл.2). В печени создаются метаболические предпосылки для усиления глюконеогенеза из α -глицерофосфата, пирувата, лактата. По полученным нами данным, содержание глюкозы в печени и ее концентрация в крови действительно превышает уровень величин у животных контрольной группы (табл. 1,3).

Таблица 1. Содержание метаболитов (мкмоль/мл) и активность ферментов (Е/мг) в крови кроликов после введения лактатдегидрогеназы.

Показатели	До введения	Через 20 мин	Через 60 мин
Пируват	0,147 \pm 0,007	0,117 \pm 0,005*	0,090 \pm 0,009*
Лактат	4,091 \pm 0,176	3,51 \pm 0,181	3,396 \pm 0,143
Лактатдегидрогеназа	0,016 \pm 0,001	0,060 \pm 0,004**	0,073 \pm 0,005**
Малат	0,462 \pm 0,041	0,311 \pm 0,039*	0,286 \pm 0,027*
Оксалоацетат	0,208 \pm 0,015	0,242 \pm 0,016	0,141 \pm 0,013*
Малатдегидрогеназа	0,025 \pm 0,002	0,028 \pm 0,001	0,032 \pm 0,002*
Глюкоза	4,024 \pm 0,188	4,82 \pm 0,282	6,28 \pm 0,394*
Диоксиацетонфосфат	0,156 \pm 0,062	0,140 \pm 0,011	0,118 \pm 0,004
α -Глицерофосфат	0,584 \pm 0,022	0,570 \pm 0,031	0,692 \pm 0,041
Альдолаза	0,002 \pm 0,0001	0,003 \pm 0,0002*	0,005 \pm 0,0002*
2-Оксоглутарат	0,086 \pm 0,006	0,075 \pm 0,004	0,044 \pm 0,005*
Глутамат	0,106 \pm 0,007	0,153 \pm 0,004*	0,158 \pm 0,004*
Мочевина	4,79 \pm 0,26	5,13 \pm 0,15	4,99 \pm 0,18
Аспаратаминотрансфераза (мккат/л)	0,112 \pm 0,032	0,121 \pm 0,083	0,108 \pm 0,078
Аланинаминотрансфераза (мккат/л)	0,120 \pm 0,022	0,135 \pm 0,004	0,165 \pm 0,008*

* - $p < 0,05$; ** - $p < 0,01$ по сравнению с исходными значениями

В лактатдегидрогеназной, малатдегидрогеназной, глицерофосфатдегидрогеназной и в глутаматдегидрогеназной редокс-системах гиперферментемия лактатдегидрогеназы индуцирует существенные нарушения в соотношении концентрации окисленных и восстановленных метаболитов. Нарушение постоянства содержания в фонде гидроксид- и оксопроизводных карбоновых кислот, обладающих высоким потенциалом физико-химической активности,

Таблица 2. Активность ферментов (Е/мг) в тканях кроликов после введения лактатдегидрогеназы

Фермент	Миокард				Печень				Скелетные мышцы	
	Контроль		Опыт		Контроль		Опыт			
	Супернатант	Мит охондрии	Супернатант	Митохондрии	Супернатант	Митохондрии	Супернатант	Митохондрии	Контроль	Опыт
Альдолаза	0,120± 0,004	0,112± 0,0007	0,146± 0,006*	0,116± 0,0005*	0,039± 0,002	0,011± 0,001	0,068± 0,004*	0,012± 0,001	0,188± 0,012	0,445± 0,014*
Лактат-дегидро-геназа	1,923± 0,134	0,098± 0,0018	3,262± 0,167*	0,148± 0,002*	0,380± 0,041	0,033± 0,006	0,480± 0,053	0,082± 0,007**	1,807± 0,164	4,252± 0,245*
Малатдегидрогеназа	5,529± 0,336	0,722± 0,041	4,24± 0,13*	0,587± 0,031	1,017± 0,068	0,454± 0,028	1,232± 0,092	0,547± 0,041	3,91± 0,213	4,63± 0,37
Аспартатаминотрансфераза (мккат/л)	1,711± 0,053	3,111± 0,098	1,594± 0,066	3,418± 0,085	2,052± 0,007	3,499± 0,179	2,045± 0,082	2,516± 0,104*	0,919± 0,075	1,168± 0,181
Аланин-амино-трансфераза (мккат/л)	2,032± 0,099	3,548± 0,169	1,821± 0,073	3,951± 0,232	2,149± 0,095	3,139± 0,138	1,801± 0,085	3,386± 0,098	0,549± 0,061	0,874± 0,088*
Глутаматдегидро-геназа		0,084± 0,004		0,059± 0,003*		1,278± 0,038		1,398± 0,044		
α-Глицеро-фосфат-дегидро-геназа					0,295± 0,011	0,251± 0,009	0,256± 0,023	0,205± 0,004	0,255± 0,019	0,390± 0,006*

* - $p < 0,05$; ** - $p < 0,01$ по сравнению с исходными значениями

может служить фактором дальнейшей дестабилизации метаболизма за счет нарушения ионного гомеостаза.

С учетом существования известной взаимосвязи между отдельными метаболитами [25], выявленные изменения в содержании интермедиатов углеводно-липидного обмена могут повлечь за собой изменения и в других системах.

Таблица 3. Содержание метаболитов (мкмоль/г) в тканях кроликов после введения лактатдегидрогеназы.

Показатель	Миокард		Печень		Скелетная мышца	
	Контроль	Опыт	Контроль	Опыт	Контроль	Опыт
α-Глицерофосфат	1,08± 0,024	1,304± 0,015	1,624± 0,076	2,14± 0,053	1,315± 0,080	1,338± 0,076
Диоксиацетон-фосфат	0,430± 0,0085	0,304± 0,017	0,380± 0,027	0,232± 0,018*	0,414± 0,022	0,351± 0,034
Глутамат	0,385± 0,041	0,532± 0,032*	1,278± 0,038	1,398± 0,041	0,247± 0,018	0,571± 0,059**
2-Оксоглутарат	0,122± 0,0054	0,095± 0,0051	0,142± 0,009	0,093± 0,005*	0,120± 0,016	0,106± 0,021
Мочевина	2,527± 0,245	3,565± 0,453*	2,377± 0,159	3,133± 0,416		
Лактат	5,77± 0,216	4,659± 0,291	2,471± 0,138	5,230± 0,433**	1,847± 0,124	9,956± 0,857**
Пируват	0,152± 0,008	0,134± 0,01	0,075± 0,009	0,089± 0,012	0,053± 0,004	0,076± 0,006
Глюкоза	3,34± 0,182	3,04± 0,217	4,53± 0,31	5,876± 0,388*	2,118± 0,042	1,817± 0,085
Малат	0,54± 0,039	0,865± 0,053*	2,45± 0,20	1,230± 0,212	1,51± 0,146	2,71± 0,16*
Оксалоацетат	0,049± 0,009	0,052± 0,011	0,146± 0,06	0,018± 0,003	0,082± 0,005	0,051± 0,008*

* - $p < 0,05$; ** - $p < 0,01$ по сравнению с исходными значениями

Повышение содержания лактатдегидрогеназы в крови вызывает изменения активности не только цитоплазматических ферментов, но и митохондриальных ферментов в изучаемых тканях.

Вполне возможно, что эти эффекты опосредованы физико-химическими сдвигами, обусловленными нарушением содержания различных субстратных пар в крови, а также межмолекулярными взаимодействиями. В тоже время возникает вопрос о возможности поступления лактатдегидрогеназы из кровотока в ткани и индукции за счет этого в них различных обменных нарушений. Внутривенное введение лактатдегидрогеназы, меченой тритием, выявило динамику распределения его между кровью и тканями, временные характеристики этого процесса (табл. 4). В течение 1 часа максимум радиоактивности сконцентрирован в крови. Через 48 часов содержание фермента в ней снижается в 9 раз. 93% от общего количества введенной лактатдегидрогеназы удерживается в тканях животного-реципиента. Характерной закономерностью является увеличение радиоактивности лактатдегидрогеназы через 48 часов во всех изученных тканях в

несколько раз, по сравнению с данными, полученными через 1 час после введения фермента.

Таблица 4. Распределение введенной меченой лактатдегидрогеназы в организме животного-реципиента (в % от общей введенной радиоактивности дегидрогеназы)

Органы и ткани	Через 1 час	Через 48 час
Кровь	56,2±7,9	6,9±0,77
Печень	5,9±0,68	16,0±2,1
Миокард	0,4±0,032	1,0±0,018
Скелетные мышцы	31,2±2,8	61,1±4,76
Головной мозг	0,2±0,009	0,4±0,051
Селезенка	0,1±0,002	2,0±0,17
Почки	1,0±0,021	7,6±0,66

На основании полученных результатов с учетом принципа соответствия [25], действующего в биосистемах, механизм формирования нарушений при гиперферментемиях представляется следующим образом.

Можно предположить, что при воспалительных, деструктивных процессах в тканях и органах ферменты с различными физико-химическими, структурными и функциональными свойствами поступают в систему кровотока, где создают новую метаболическую ситуацию. Степень трансформированности среды определяется количеством поступившего каталитического белка, его качественными параметрами: зарядом, массой, гидрофобностью, реакционно-способностью функциональных групп, макромолекулярного рельефа. Можно в связи с этим прогнозировать риск изменения физико-химических параметров плазмы крови и влияния этих сдвигов на функциональные характеристики мембран клеток крови. Это можно расценить как первичный эффект. Следствием ферментативного действия поступивших из тканей биокатализаторов является изменение в фондах субстратов. Суммарно этот результат проявляется изменением сродства, скорости и прочности межмолекулярных взаимодействий, в том числе межбелковых и фермент-ферментных, что обуславливает новую направленность метаболических процессов, их устойчивость. Так, на нижнем уровне, не включающем многозвеньевую систему гормональной и нервной регуляции, формируется патологический тип обмена регуляторной иерархии. При этом создаются предпосылки для усиления неферментативных, т.е. параметаболических процессов, обусловленных повышением концентрации различных интермедиатов, их химической активности и образованием новых соединений с различным потенциалом биологической активности, тропностью к органам и тканям.

Циркуляция фермента из поврежденного органа в кровь и далее в интактные органы и ткани сопровождается индукцией в них вторичных нарушений, которые инициируются метаболитами и другими биологически активными веществами, могут интраорганно и через кровь влиять на параметры метаболизма, модулировать регуляторные ответы. Это, возможно, является одним из механизмов, обуславливающим вовлечение в патологический процесс всего организма при наличии очага в отдельном органе.

Работа выполнена при финансовой поддержке ISSEP № p98-894, p 98-895.

ЛИТЕРАТУРА.

1. Маккьюсик В.А. (1986) Наследственные признаки человека. М.
2. Видершайн Г.Я. (1980) Биохимические основы гликозидозов. М.
3. Бочков Н.П., Захаров А.Ф., Иванов В.И. (1984) Медицинская генетика. М.
4. Языкова М.Ю., Петухов С.П., Муронец В.И. (2000) Биохимия, **65**, 10, 1409-1414.
5. Курганов Б.И., Любарев А.Е. (1991) Биохимия, **56**, № 1, 19-33.
6. Srere P. (1985) Cell regulation and malignant growth: Lipman Symp. - Tokyo: Berlin, 148-154.
7. Sirover M.A. (1999) Biochim. Biophys. Acta, **1432**, 159-184.
8. Есакова Т.В., Иванов М.В. (1992) Биохимия, **57**, в. 2, 253-267.
9. Языкова М.Ю., Петухов С.П., Муронец В.И. (2000) Биохимия, **65**, № 10, 1409-1414.
10. Walsh D.A., Parkins J.P., Krebs E. (1968) J. Biol. Chem., **243**, 3763-3765.
11. Beeckmans S., Kanasek E. (1996) Organ Cell Metabolism: Proc. NATO Adv. Res. Work-Shop, Henstheils. - New York -London, 199-208.
12. Луцак В.И. (1991) Биохимия, **56**, № 12, 2173-2180.
13. Ochoa S. (1955) Methods in Enzymology, **1**, 735-739.
14. Kornberg A. (1955) Methods in Enzymology, **1**, 441-445.
15. Прохорова М.И. (1982) Методы биохимических исследований. Л., 168-171.
16. Chee P.Y., Dahl J.L., Pahien L.A. (1979) J. Neurochem., **33**, N 1, 53-60.
17. Horecker B.L., Tsolas O., Lai C.Y. (1972) The Enzymes. - New-York. **7**, 213.
18. Bergmeyer H. (1962) Methoden der enzymatischen analyse. - Weinheiru.
19. Гильмиярова Ф.Н., Радомская В.М., Виноградова Л.Н. (1986) Инструкция по применению унифицированных клинических лабораторных методов исследования. М.
20. Lowy O.H., Rosebrough N., Farr A., Randal R. (1951) J. Biol. Chem., **193** , 265-275.
21. Гильмиярова Ф.Н., Радомская В.М., Виноградова Л.Н. и др. (1984) Авторское свидетельство № 356234 «Способ получения ферментов»
22. Kurganov B.I. (1984) J. Theoret. Biol., **3**, N 4, 707-723.
23. Zolotarev Yu.A., Zaitsev D.A., Tatur V.Yu. Patent USA N 5026909 from 06.25.1991.
24. Остерман Л.А. (1983) Исследование биологических макромолекул электрофокусированием, иммуноэлектрофорезом и радиоизотопными методами. М.
25. Малыгин А.Г. (1999) Метаболизм карбоновых кислот (периодическая система). М.

Поступила 23.03.01.

ROLE OF HYPER LACTATE DEHYDROGENAZEMIA IN INDUCTION OF METABOLIC DISTURBANCE IN ORGANISM

**F.N.GILMIYAROVA, V.M. RADOMSKAYA, G.M.BAISHEVA, I.G.KRETOVA,
M.S.KLEIMAN, YU.V.PERVOVA**

Department of Fundamental and Clinical Biochemistry with
Laboratory Diagnostic of Samara State Medical University
E-mail: kleiman@smr.ru

The effect of intravenous administration of lactate dehydrogenase (5000 E/kg) on some metabolic parameters was investigated. The hyperenzymemia was accompanied by changes of metabolite content (glutamate, 2-oxoglutarate, lactate, dihydroxyacetone phosphate) and enzyme activities (aldolase, lactate dehydrogenase, transaminase) in heart, liver and skeletal muscles.

Intraveously administered tritiated lactate dehydrogenase was preferentially found in skeletal muscles, liver, kidneys and some other organs.

Keywords: hyperenzymemia, tritium-labelled lactate dehydrogenase, metabolic response.