

УДК 615.919:591

**ИЗМЕНЕНИЕ АКТИВНОСТИ ЛАКТАТДЕГИДРОГЕНАЗЫ ПЕЧЕНИ КРЫС
ПРИ ДЕЙСТВИИ ГЕПАРИНА В УСЛОВИЯХ IN VITRO**

© 2008 г.

*А.В. Бочкарева*¹, *Ю.В. Зимин*², *А.Е. Хомутов*¹¹ Нижегородский госуниверситет им. Н.И. Лобачевского² ННИИТО Росмедтехнологий

vestnik@unn.ru

Поступила в редакцию 03.07.2008

В экспериментах по исследованию влияния гепарина на активность лактатдегидрогеназы печени крыс показано, что гепарин во всех исследуемых концентрациях повышал активность фермента в условиях *in vitro*. Также было изучено действие протамина сульфата и комплекса гепарин – протамин сульфат в аналогичных условиях.

Ключевые слова: гепарин, лактатдегидрогеназа, протамин сульфат.

Введение

Лактатдегидрогеназа (ЛДГ) является одним из ключевых ферментов метаболизма и оказывает существенное влияние на окислительно-восстановительный потенциал клетки. При поражении печени существенно падает активность данного фермента в субклеточных фракциях. В итоге это может приводить к увеличению содержания лактата в клетках, что способствует развитию различной патологии печени. Поэтому исследование активности ЛДГ является важным лабораторным тестом, позволяющим выявить нарушения в работе фермента на ранних стадиях заболеваний.

Известно, что гепарин, помимо антикоагулянтной активности, обладает уникальной способностью к комплексообразованию, в результате чего он способен модифицировать действие различных эндогенных биологически активных веществ, в том числе энзимов. В литературе имеются данные о влиянии гепарина на работу ферментов, в основном связанных с липидным обменом. Влияние его на работу энергетических ферментов, к которым относится лактатдегидрогеназа, практически не исследовалось.

В связи с этим целью настоящей работы было выявление особенностей изменения активности ЛДГ в модельном эксперименте при действии различных концентраций гепарина в условиях *in vitro*. Также было изучено действие протамина сульфата (антагониста гепарина) как одного, так и в комплексе с гепарином для максимально мягкого варьирования эффектов последнего в экспериментах.

Материал и методы

В исследовании использовали экстракт печени белых лабораторных крыс-самцов линии Wistar массой 180–200 г. Навеску из 1 г печеночной ткани измельчали ножницами и гомогенизировали в 10 мл дистиллированной воды, центрифугировали в течение 15 мин при 6000 об./мин. Осадок отбрасывали, активность лактатдегидрогеназы определяли в надосадочной жидкости спектрометрически по методу Г.А. Кочетова (1980) [1]. Активность ЛДГ оценивали по скорости окисления НАДН, которое регистрируется спектрофотометрически по убыли величины оптической плотности при длине волны 340 нм. В спектрофотометрическую кювету помещали 2.7 мл 100 мМ фосфатного буфера (рН 7,4); 0.1 мл раствора, содержащего фермент; 0.1 мл 23 мМ пирувата натрия; 0.1 мл 5 мМ раствора НАДН. Содержимое кюветы быстро перемешивали и измеряли увеличение оптической плотности при 340 нм через каждые 15 секунд в течение 3 минут. Расчет активности фермента проводили по формуле:

$$\text{Активность} = (\Delta E \cdot v) / (\varepsilon \cdot T \cdot L),$$

где ΔE – изменение экстинкции в течение 1 минуты; v – объем проб, равный 3 мл; ε – молярный коэффициент экстинкции НАДН, равный $6.22 \cdot 10^6$ (при 340 нм); T – время исследования реакции (1 мин); L – толщина слоя исследуемого раствора (1 см). Активность ЛДГ выражали в нмоль НАДН за 1 мин на 1 мг белка.

В экспериментах использовали гепарин в концентрациях 5, 50, 500 МЕ; протамин сульфат в концентрациях 0.01%, 0.05%, 0.1%; комплекс ге-

парин – протамина сульфат, образованный следующими концентрациями компонентов соответственно: 5 МЕ + 0.01%, 50 МЕ + 0.05%, 500 МЕ + 0.1%. Статистическая обработка полученных данных производилась с применением программы Primer of Biostatistics Version 4.03 by Stanton A. Glantz.

Результаты и их обсуждение

Исходя из полученных первичных данных были рассчитаны показатели каталитической

активности ферментативной реакции. Установлено, что гепарин во всех исследуемых концентрациях достоверно повышает показатели активности лактатдегидрогеназы (рис. 1). При введении 5 МЕ гепарина они возрастают в 2.1 раза с 98.65 ± 8.97 в контроле до 211.10 ± 7.42 нмоль/мин·мг белка; при введении 50 МЕ гепарина – в 3.2 раза до 315.00 ± 22.73 нмоль/мин·мг белка; при введении 500 МЕ гепарина – в 1.5 раза до 150.70 ± 19.71 нмоль/мин·мг белка.

При введении протамина сульфата в концентрации 0.01% показатели активности ЛДГ дос-

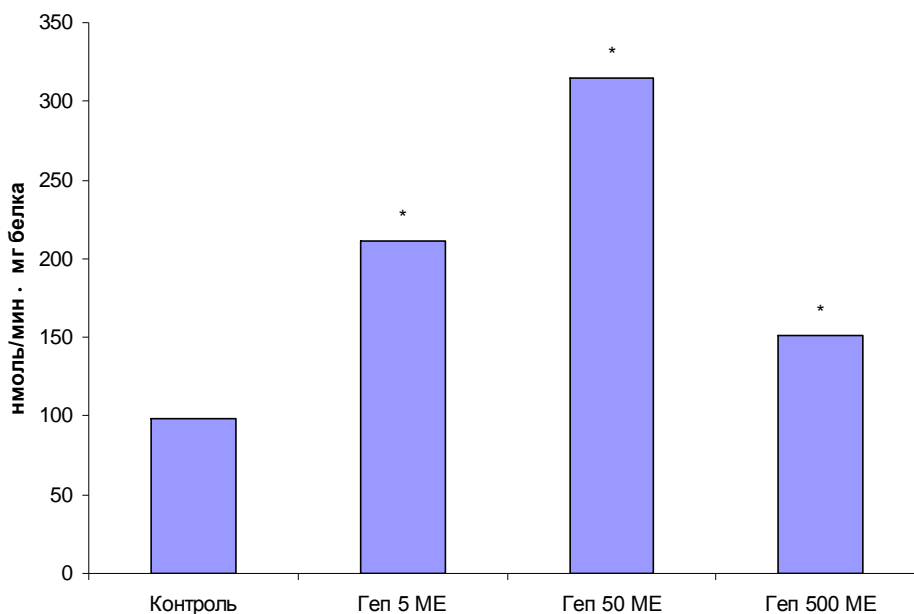


Рис. 1. Изменение активности лактатдегидрогеназы при действии различных концентраций гепарина: * – достоверные отличия от контрольной группы, $p < 0.05$

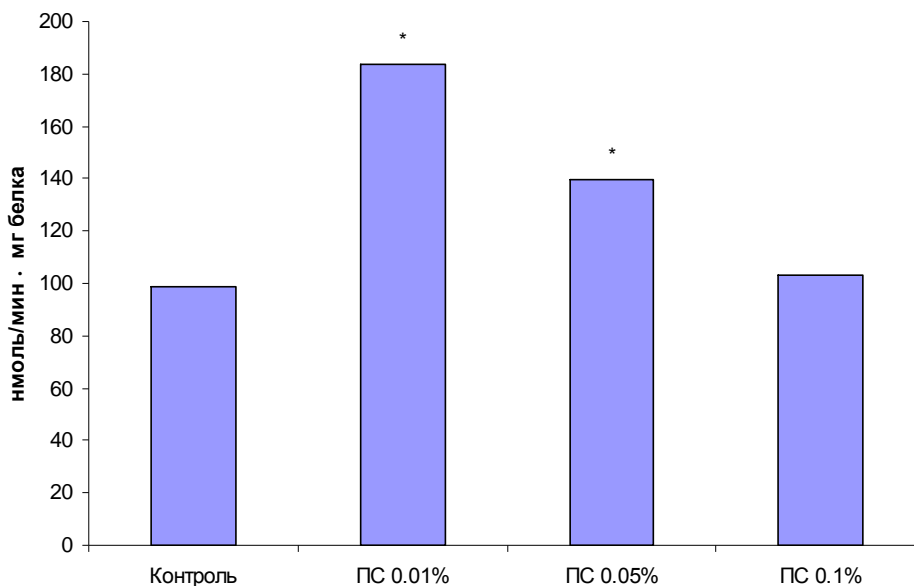


Рис. 2. Изменение активности лактатдегидрогеназы при действии различных концентраций протамина сульфата (ПС): * – достоверные отличия от контрольной группы, $p < 0.05$

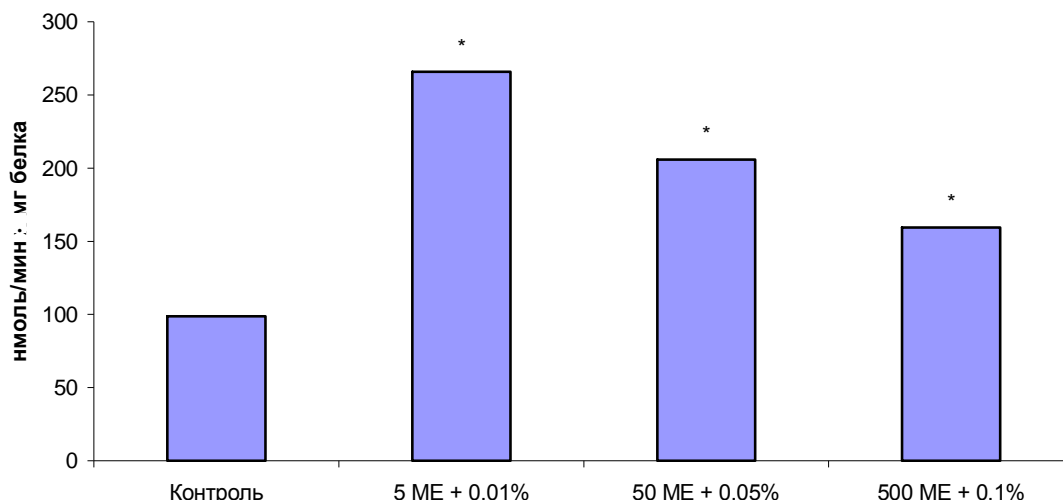


Рис. 3. Изменение активности лактатдегидрогеназы при действии комплекса гепарин – протамин сульфат: * – достоверные отличия от контрольной группы, $p < 0.05$

товерно возрастают в 1.8 раза с 98.65 ± 8.97 в контроле до 183.80 ± 1.00 нмоль/мин·мг белка; при введении протамин сульфата в концентрации 0.05% – в 1.4 раза до 139.60 ± 11.30 нмоль/мин·мг белка (рис. 2). Достоверные отличия от контрольных показателей при введении протамин сульфата в концентрации 0.1% не наблюдаются (показатели активности ЛДГ составляют 103.10 ± 6.55).

Введение комплекса гепарин – протамин сульфат во всех исследуемых концентрациях достоверно повышает активность лактатдегидрогеназы (рис. 3). При введении комплекса с концентрацией его компонентов 5 ME + 0.01% показатели активности возрастают в 2.7 раза с 98.65 ± 8.97 в контроле до 265.70 ± 36.65 нмоль/мин·мг белка; при введении комплекса с концентрацией его компонентов 50 ME + 0.05% – в 2.1 раза до 205.80 ± 61.99 нмоль/мин·мг белка; при введении комплекса с концентрацией его компонентов 500 ME + 0.1% – в 1.6 раза до 159.30 ± 22.17 нмоль/мин·мг белка.

С учетом вышесказанного наиболее вероятным типом активации является двухпараметрически рассогласованная активация [2]. При данном типе активации ферментов происходит увеличение максимальной скорости реакции при ослаблении связывания фермента с суб-

стратом. При этом, вероятно, гепарин затрудняет образование фермент-субстратного комплекса, но оказывает влияние на образование продуктов реакции, активируя процесс.

Заключение

В результате проведенных экспериментальных исследований установлено, что гепарин и протамин сульфат существенно изменяют активность лактатдегидрогеназы. С практической точки зрения в лабораторной практике необходимо учитывать, что гепарин существенно изменяет показания активности ферментов крови, в частности применительно к определению активности ЛДГ. Максимальные показатели активности лактатдегидрогеназной реакции наблюдаются при введении комплекса гепарин – протамин сульфат с концентрацией его компонентов 5 ME + 0.01%, минимальные – при введении протамин сульфата в концентрации 0.05%.

Список литературы

1. Кочетов Г.А. Практическое руководство по энзимологии. М.: Высшая школа, 1980. 272 с.
2. Крупянко В.И. Векторный метод представления ферментативных реакций. М.: Наука, 1990. 144 с.

CHANGES OF RAT LIVER LACTATE DEHYDROGENASE ACTIVITY UNDER HEPARIN ACTION IN VITRO

A.V. Bochkareva, Yu.V. Zimin, A.E. Khomutov

It has been shown in the experiments aimed at the investigation of heparin action on the rat liver lactate dehydrogenase activity that heparin increases the enzyme activity in vitro for all of the studied concentrations. The action of protamine sulfate and heparin – protamine sulfate complex has also been studied under similar conditions.