

БИОЛОГИЯ

УДК 612.57

ВЛИЯНИЕ ЭТАНОЛА, ГЕПАРИНА И ПРОТАМИН СУЛЬФАТА НА АКТИВНОСТЬ АЛАНИН- И АСПАРТАТАМИНОТРАНСФЕРАЗЫ

© 2011 г. *В.Н. Крылов*¹, *С.Л. Малиновская*², *В.С. Слободянюк*¹, *Д.С. Малиновский*¹

¹Нижегородский госуниверситет им. Н.И. Лобачевского

²Нижегородская государственная медицинская академия

kfg@bio.unn.ru

Поступила в редакцию 14.02.2011

В опытах на лабораторных крысах показано, что этанол (12%, 0.5 мл/крыса) и гепарин в дозе 1000–5000 МЕ/кг повышают активность аланин- и аспартатаминотрансферазы. При введении этанола на фоне инъекции гепарина активность исследованных аминотрансфераз зависит от дозы предварительно введённого гепарина. При предварительном введении гепарина в дозе 2500 МЕ/кг их активность не отличается от контрольных величин.

Ключевые слова: гепарин, этанол, протамин сульфат, аланин- и аспартатаминотрансфераза.

Введение

Аминотрансферазы – ферменты класса трансфераз, катализирующие обратимые реакции трансаминирования, т.е. перенос аминогруппы (-NH₂) и водорода от одной молекулы субстрата к другой без промежуточного образования аммиака. Аминотрансферазы участвуют в азотистом обмене, особенно в обмене аминокислот. Определение аланиновой и аспарагиновой аминотрансфераз в сыворотке крови человека используют в диагностике заболеваний печени и сердца.

Важное клинико-диагностическое значение имеет определение активности двух аминотрансфераз: аспартатаминотрансферазы (АСТ) и аланинаминотрансферазы (АЛТ). Различия в наименовании аминотрансфераз определяются названием той аминокислоты, от которой отделяется аминокруппа.

Наибольшее содержание АСТ обнаружено в сердечной мышце, затем последовательно в убывающем количестве в печени, скелетной мускулатуре, головном мозге, почках, семенниках. Активность АСТ в сердечной мышце почти в 10000 раз выше, чем в сыворотке. В эритроцитах АСТ содержится в 10 раз больше, чем в сыворотке. Поэтому при определении аминотрансфераз в сыворотке крови последняя не должна иметь даже следов гемолиза.

Фермент, катализирующий обратимый перенос аминокруппы с аланина на α-кетоглу-

таровую кислоту, получил название аланинаминотрансферазы. Наиболее высокая активность АЛТ обнаруживается в печени, поджелудочной железе, сердце и скелетной мускулатуре. В печени активность АЛТ в несколько тысяч раз выше, чем в сыворотке крови.

Повышение активности аминотрансфераз в сыворотке крови отмечено при целом ряде заболеваний и особенно при поражении органов и тканей, богатых данными ферментами (печень, миокард и др.). Наиболее резкие изменения в активности АСТ наблюдаются при поражении сердечной мышцы. При инфаркте миокарда активность АСТ в сыворотке крови может увеличиваться в 2–20 раз.

При заболеваниях печени в первую очередь и наиболее значительно по сравнению с АСТ изменяется активность АЛТ. Установлено, что повреждение всего лишь одной печеночной доли достаточно для значительного увеличения активности сывороточной АЛТ [1].

Материалы и методы

Опыты были проведены на 108 белых беспородных половозрелых крысах (самках) массой 180±20 г. Содержание соответствовало правилам по устройству, оборудованию и содержанию экспериментально-биологических клиник (вивариев). Кормили животных натуральными и брикетированными кормами в соответствии с утвержденными нормами (СП №1045-73 «Са-

нитарные правила по устройству, оборудованию и содержанию экспериментально-биологических клиник (вивариев)»).

Определение активности аланин- и аспаратаминотрансфераз производилось колориметрическим методом по Умбрайт и Равайя (1957), принцип которого основан на переаминировании аспарагиновой и альфа-кетоглутаровой кислот. В результате переаминирования образуется щавелевоуксусная кислота, которая в присутствии анилинового цитрата распадается на пировиноградную кислоту и углекислый газ. Пировиноградная кислота, реагируя с 2,4-динитрофенилгидразином, образует соединение – динитрофенилгидразон, легко экстрагируемое из раствора толуолом. При обработке динитрофенилгидразона спиртовым раствором щёлочи он превращается в окрашенное в красный цвет соединение. Интенсивность окрашивания пропорциональна количеству образовавшейся пировиноградной кислоты.

Статистическая обработка экспериментальных данных была выполнена с помощью программы «Биостат». Для сравнения нескольких групп использовали однофакторный дисперсионный анализ и критерий Стьюдента [2].

Результаты и обсуждение

Выбор аланинаминотрансферазы (АлАТ) и аспаратаминотрансферазы (АсАТ) в качестве индикаторов влияния гепарина на токсические свойства этанола был обусловлен тем, что эти два фермента являются информативным клиническим тестом при заболеваниях сердца и печени. Хорошо известно, что этанол обладает ярко выраженным кардиотропным и гепатотропным действием, а значит можно гипотетически полагать, что он будет влиять на активность данных ферментов. С другой стороны, печень является одним из основных депо эндогенного гепарина, который, возможно, также влияет на активность АлАТ и АсАТ.

У интактных животных активность АлАТ и АсАТ равна 0.156 ± 0.064 и 0.103 ± 0.025 мкМ/мл соответственно. Введение физиологического раствора в объёме 1 мл снижает активность АлАТ (0.061 ± 0.030) и более чем в два раза активность АсАТ (0.051 ± 0.013) относительно интактных животных. В связи с тем, что исследуемые вещества мы разводили в физиологическом растворе, в качестве контроля для статистической обработки были взяты именно эти данные.

При введении гепарина в дозах от 1000 до 5000 МЕ/кг активность АлАТ повышается и

достигает при введении гепарина 5000 МЕ/кг 0.405 ± 0.048 мкМ/мл. При оценке активности АсАТ установлено, что его активность возрастает в тех же пределах, за исключением введения гепарина в дозе 5000 МЕ/кг (0.081 ± 0.065 мкМ/мл).

Этанол (12%, 0.5 мл/200 г) повышает активность АлАТ и АсАТ, однако 20%-ный этанол в объёме 0.5 мл/200 г снижает активность АлАТ до 0.185 ± 0.022 мкМ/мл, АсАТ – до 0.022 ± 0.017 мкМ/мл, сравнимых с контрольными величинами (рис. 1, 2).

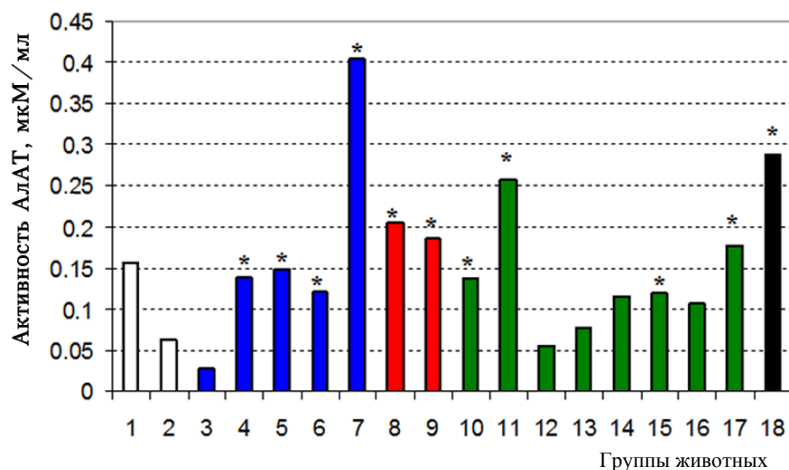
Совместное применение гепарина и этанола в различных вариантах введения не выявило каких-либо общих закономерностей и тенденций влияния на активность АлАТ и АсАТ. Правда следует отметить, что этанол (12%, 0.5 мл/200 г) на фоне предварительного введения гепарина (1000 МЕ/кг) увеличивает активность АлАТ до 0.257 ± 0.021 мкМ/мл, а активность АсАТ – до 0.558 ± 0.205 мкМ/мл. Аналогичное повышение активности АсАТ регистрировалось при введении гепарина (2500 МЕ/кг) и этанола (20%, 0.5 мл/200 г) в виде смеси (рис. 1, 2).

Таким образом, 12%-ный этанол в объёме 0.5 мл/200 г достоверно повышает активность АлАТ и АсАТ. При использовании 20%-ного спирта в том же объёме активность АлАТ остаётся достоверно высокой, а активность АсАТ резко уменьшается и достоверно не отличается от контрольных величин.

Этанол на фоне введения гепарина повышает активность АлАТ и АсАТ, однако следует сказать, что активность АсАТ при введении высокой дозы (5000 МЕ/кг) гепарина резко снижается. Гепарин, вероятно, воздействует на состояние дисферментемии применительно к АсАТ, что, возможно, связано с влиянием гепарина на конститутивный или индуктивный синтез АсАТ в печени или других органах и тканях, а также с образованием биокомплекса гепарин + трансаминаза [3].

Известно, что гепарин образует с этанолом нестойкие соединения, распадающиеся при небольшом изменении условий, особенно *in vivo*. Видимо поэтому активность трансаминаз при различных сочетаниях введения этанола с гепарином не даёт четкой картины протекторного действия гепарина в отношении этанола.

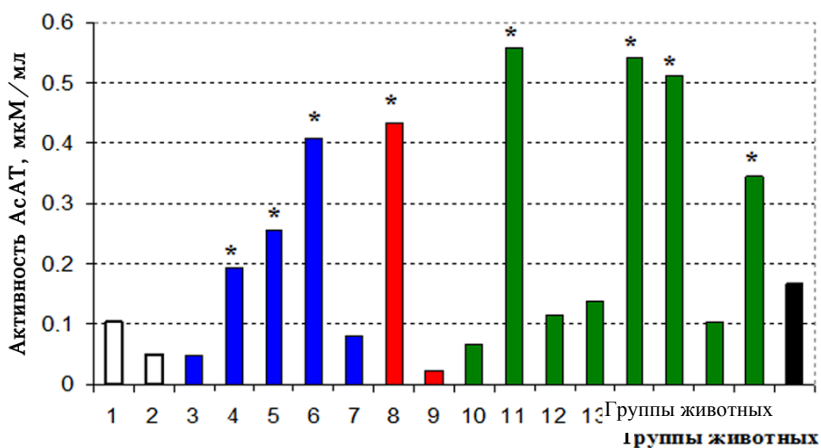
Предварительное введение классического блокатора гепарина – протамина сульфата – повышает активность АлАТ, в то время как активность АсАТ достоверно не отличается от контрольных величин.



* Различия между контрольными и экспериментальными группами статически значимы ($p < 0.05$).

Рис. 1. Влияние гепарина, этанола и протамин сульфата на активность аланинаминотрансферазы в периферической крови крыс.

1 – Интактная группа; 2 – контрольная группа (физ. раствор); 3 – гепарин (500 МЕ/кг); 4 – гепарин (1000 МЕ/кг); 5 – гепарин (2500 МЕ/кг); 6 – гепарин (3000 МЕ/кг); 7 – гепарин (5000 МЕ/кг); 8 – этанол (12%, 0.5 мл/200 г); 9 – этанол (20%, 0.5 мл/200 г); 10 – гепарин (500 МЕ/кг) → этанол (12%, 0.5 мл/200 г); 11 – гепарин (1000 МЕ/кг) → этанол (12%, 0.5 мл/200 г); 12 – гепарин (2500 МЕ/кг) → этанол (12%, 0.5 мл/200 г); 13 – гепарин (2500 МЕ/кг) → этанол (20%, 0.5 мл/200 г); 14 – гепарин (2500 МЕ/кг) + этанол (20%, 0.5 мл/200 г); 15 – гепарин (5000 МЕ/кг) → этанол (12%, 0.5 мл/200 г); 16 – этанол (12%, 0.5 мл/200 г) → гепарин (500 МЕ/кг); 17 – этанол (12%, 0.5 мл/200 г) → гепарин (2500 МЕ/кг); 18 – протамин сульфат (1 мг/кг) → этанол (12%, 0.5 мл/200 г)



* Различия между контрольными и экспериментальными группами статически значимы ($p < 0.05$).

Рис. 2. Влияние гепарина, этанола и протамин сульфата на активность аспаратаминотрансферазы в периферической крови крыс.

1 – Интактная группа; 2 – контрольная группа (физ. раствор); 3 – гепарин (500 МЕ/кг); 4 – гепарин (1000 МЕ/кг); 5 – гепарин (2500 МЕ/кг); 6 – гепарин (3000 МЕ/кг); 7 – гепарин (5000 МЕ/кг); 8 – этанол (12%, 0.5 мл/200 г); 9 – этанол (20%, 0.5 мл/200 г); 10 – гепарин (500 МЕ/кг) → этанол (12%, 0.5 мл/200 г); 11 – гепарин (1000 МЕ/кг) → этанол (12%, 0.5 мл/200 г); 12 – гепарин (2500 МЕ/кг) → этанол (12%, 0.5 мл/200 г); 13 – гепарин (2500 МЕ/кг) → этанол (20%, 0.5 мл/200 г); 14 – гепарин (2500 МЕ/кг) + этанол (20%, 0.5 мл/200 г); 15 – гепарин (5000 МЕ/кг) → этанол (12%, 0.5 мл/200 г); 16 – этанол (12%, 0.5 мл/200 г) → гепарин (500 МЕ/кг); 17 – этанол (12%, 0.5 мл/200 г) → гепарин (2500 МЕ/кг); 18 – протамин сульфат (1 мг/кг) → этанол (12%, 0.5 мл/200 г)

Таким образом, гепарин в дозах 1000–5000 МЕ/кг повышают уровень активности АлАТ и АсАТ. Этанол повышает активность АлАТ, активность АсАт повышается при введении 12% этанола и снижается при введении 20% этанола. При введении этанола на фоне инъекции гепарина активность АлАТ и АсАт зависит от дозы предварительно введённого гепарина. При предварительном введении гепарина в дозе 2500 МЕ/кг активность АлАТ и АсАТ не отличается от контрольных величин.

Список литературы

1. Комаров Ф.И., Коровкин Б.Ф., Меньшиков В.В. Биохимические исследования в клинике. Элиста: АПП «Джангар», 2001. 216 с.
2. Гланц С. Медико-биологическая статистика. М.: Практика, 1999. 459 с.
3. Федянин Ю.П., Патеюк В.Г. Влияние гепарина на некоторые ферменты переаминирования в сыворотке крови больных эпидемическим гепатитом // Тез. докл. III Всесоюзной конф. «Гепарин. Физиология, биохимия, фармакология и клиническое применение». М., 1973. С. 312–314.

**THE EFFECT OF ETHANOL, HEPARIN AND PROTAMINE SULFATE
ON THE ACTIVITY OF ALANINE AND ASPARTATE AMINOTRANSFERASE**

V.N. Krylov, S.L. Malinovskaya, V.S. Slobodyanyuk, D.S. Malinovsky

It has been shown in the experiments on laboratory rats that ethanol (12%, 0.5 ml/rat) and 1000–5000 IU/kg heparin dose increase the activity of ALT and AST. When ethanol is introduced on the background of heparin injection, the ALT and AST activities depend on the preliminary injected heparin dose. With the heparin dose of 2500 IU/kg, ALT and AST activities do not differ from the control values.

Keywords: heparin, ethanol, protamine sulfate, alanine and aspartate aminotransferase.