

MATERIÁLY IX MEZINÁRODNÍ VĚDECKO – PRAKTICKÁ KON-
FERENCE «VĚDECKÝ POKROK NA PŘELOMU TYSYACHALETY –
2013»

27 května – 05 června 2013 roku

Díl 32

Biologické vědy

Praha

К.б.н. Колб А.В., д.м.н. Кухта В.К., к.м.н. Бутвиловский В.Э.

Белорусский государственный медицинский университет, Беларусь

**ИЗМЕНЕНИЕ АКТИВНОСТИ КРЕАТИНКИНАЗЫ, АДЕНИЛАТКИНАЗЫ И ИХ
ИЗОФЕРМЕНТОВ В МИОКАРДЕ ПРИ ТЕТРАДЕ ФАЛЛО**

Тетрада Фалло – один из наиболее часто встречающихся пороков сердца. Для этого порока характерны: сужение пути оттока крови из правого желудочка; дефект межжелудочковой перегородки; смещение аорты вправо; гипертрофия миокарда правого желудочка. Поэтому миокард больных с тетрадой Фалло со временем не только гипертрофируется (адаптация к постоянному воздействию повышенной нагрузки), но и испытывает хроническую гипоксию. Это приводит к изменению активности ферментов и изоферментов в сердечной мышце.

Сведения об особенностях метаболизма в миокарде при врожденных пороках сердца крайне малочисленны.

Целью настоящей работы было изучение ферментных и изоферментных изменений в мышечных клетках миокарда больных с тетрадой Фалло [3]. Для исследования избраны креатинкиназа (КК), ее изоферменты: МВ- и митохондриальный (КК-МВ и КК мит. соответственно) и аденилаткиназа (АК) и ее митохондриальная форма (АК мит.) [2].

Материалы и методы. Материалом для исследования послужила ткань гипертрофированного миокарда правого желудочка, полученная во время операции по поводу радикальной коррекции порока у 31-го больного с тетрадой Фалло (средний возраст больных – $11,5 \pm 1$ год). Полученные образцы ткани содержались при температуре 0°C не более 30 мин, а затем переносились в пластмассовые пробирки и хранились при температуре -40°C от 1 до 15 дней.

В качестве контроля были использованы участки миокарда правого желудочка 9-ти человек, погибших в результате несчастного случая и имевших практически здоровое сердце (средний возраст $25,5 \pm 2$ года). Аутопсийные образцы получали через 3-8 часов после смерти, сразу же помещали в жидкий азот и хранили в течение 3 месяцев.

Для проведения исследований брали кусочек миокарда массой 50-100 мг, измельчали ножницами и гомогенизировали в течение 2 мин и 30 с в стеклянном гомогенизаторе с тефлоновым пестиком при 800 об/мин в среде выделения, содержащей фосфат натрия (0,1 моль/л, рН 7,3) и тритон X-100 (1 г/л). Гомогенат центрифугировали при 10 000 г в течение 20 мин, а супернатант отбирали и проводили в нем необходимые измерения.

Для разделения изоферментов КК использовали метод ионообменной хроматографии, предложенный Mercer в модификации А.Н. Козина [1]. Первая хроматографическая фракция содержала смесь КК-ММ и КК мит., вторая – КК-МВ с незначительной (около 1 %) примесью КК-ВВ. Для того чтобы судить об активности КК мит., в первой хроматографической фракции ингибировали антисывороткой против М субъединиц ММ-изофермент КК, а при определении активности КК-МВ не принимали в расчет содержание КК-ВВ. Общую активность КК, активность КК-МВ и КК мит. определяли методом Oliver-Rosalki в модификации Szasz [1].

Изоферменты АК разделяли при помощи ионообменной хроматографии по методу, предложенному Walker-Dow [4]. В первой хроматографической фракции содержался цитоплазматический изофермент АК, а во второй – АК мит. Общую активность АК и активность АК мит. определяли по методу Oliver в модификации В.В. Куприянова [1]. Тестирование активностей ферментов и изоферментов осуществляли на анализаторе скоростей реакций «ЛКВ» при температуре 37°C.

Результаты измерений выражали в международных единицах активности ферментов (Е), соответствующих количеству энзима, катализирующего превращение 1 мкмоль субстрата в продукт за 1 мин в стандартных условиях.

Концентрацию креатина определяли диацетильным методом. Креатин был выбран в качестве критерия мышечной массы в связи с тем, что он содержится только в мышечных клетках, а

его концентрация в них линейно коррелирует с содержанием мышечных белков. Полученные результаты обработаны методами описательной статистики, достоверность различий определена по критерию Стьюдента.

Полученные результаты. Результаты исследований активностей ферментов и их изоэнзимов представлены в таблице.

Из данных таблицы следует, что в миокарде больных с тетрадой Фалло по сравнению с контрольной группой при расчете на 1 г массы сырой ткани снижены активности АК, КК и ее КК мит. и КК-МВ изоферментов, а активность АК мит. и содержание креатина повышены. Общая активность АК у больных с тетрадой Фалло в расчете на 1 г массы сырой ткани снижена достоверно, однако при перерасчете на 1 мг креатина это снижение еще более выражено (в 2,1 раза против 1,7). Снижение общей активности КК и ее митохондриального изофермента может быть объяснено замедлением энергопродуцирующих процессов в митохондриях, вызванным дефицитом кислорода. Повышение активности АК мит. можно объяснить тем, что АК мит. располагается в межмембранном пространстве митохондрий и ее функция тесно связана с функцией ацил-КоА-синтетазы – фермента, осуществляющего активацию жирных кислот, при окислении которых обеспечивается 65-70 % потребности миокарда в энергии. Ацил-КоА-синтетаза требует для своей деятельности АТФ и высвобождает АМФ, который ее ингибирует. В митохондриях при достаточном количестве кислорода АК мит. предотвращает накопление избытка АМФ, но при дефиците кислорода АДФ аккумулируется между мембранами митохондрий, что стимулирует АК мит. к продукции в больших количествах АМФ, ингибируя таким образом окисление жирных кислот, но зато сохраняя АТФ для нужд ишемизированного миокарда [4]. Несмотря на повышение активности АК мит., вследствие уменьшения активности всей креатинкиназной системы и КК мит., в частности, перенос энергии через креатинкиназную реакцию замедляется.

Таким образом, проведенные исследования показали, что в миокарде больных с тетрадой

Активность ферментов (Е) в расчете на 1 г массы сырой ткани и 1 мг креатина, изоферментов (% от общей активности ферментов) и содержание креатина (мг/г ткани) в контрольном миокарде и миокарде больных с тетрадой Фалло ($X \pm Sx$).

Исследованные показатели	Неизмененный миокард (контроль)		Миокард больных с тетрадой Фалло	
	на 1 г ткани	на 1 мг креатина	на 1 г ткани	на 1 мг креатина
КК	1375 ±99	759 ±67	1210±45	539± 16**
АК	162±6,7	89,0±5,3	97,0±4,2***	43,1 ±1,8***
КК-МВ	19,3±2,0		14,2± 1,0*	
КК мит.	22,7±1,8		19,8±1,6	
АК мит.	13,9±0,8		17,6±0,9**	
Креатин	1,86±0,12		2,28±0,07***	

Примечание: *— P<0,05; **— P<0,01; ***— P<0,001.

Фалло по сравнению с контрольной группой активность аденилаткиназы, креатинкиназы и МВ-изофермента креатинкиназы достоверно снижена, а активность митохондриального изофермента аденилаткиназы и содержание креатина – повышены.

Литература

1. Камышников В.С. Справочник по клинико-биохимической лабораторной диагностике: В 2 т. Т.2. – Мн.: Беларусь, 2000. – 463 с.: ил.
2. Липская Т.Ю. Физиологическая роль креатинкиназной системы: эволюция представлений. Биохимия, 2001, том 66, в 2, с. 149-166
3. Сапрыгин Д.Б. «Биомаркеры при сердечно-сосудистых заболеваниях: клиническая значимость в диагностике и стратификации риска». Материалы научно-практической конференции «Современная лабораторная медицина: инновационные технологии лабораторного анализа и диапазон клинического применения». Иркутск, 2011, с. 26-32
4. Walker E. J., Dow J. W. Location and properties of two isoenzymes of cardiac adenylyate kinase. – Biochem. J., 1982, 203, 2, 361-369.