

# СТАН МЕТАБОЛІЗМУ ГЕМУ ПРИ ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНОМУ ПОРУШЕННІ ПОРФІРИНОВОГО ОБМІНУ

**С.І.Крижна**

Національний фармацевтичний університет

*Ключові слова:* гем; амінолевулінатсинтаза; гемсинтетаза; гемоксидаза; порфірини

*Наведені результати зміни активності ферментів синтезу (амінолевулінатсинтази, дегідратази амінолевулінової кислоти і гемсинтетази) і розпаду (гемоксидази) гему печінки щурів внаслідок експериментально порушеного порфіринового обміну. Встановлено підвищення активності ферментів АЛК-синтази і АЛК-дегідратази, що приводило до накопичення вільних порфіринів у печінці. Поряд з цим виявлено підвищення активності гемоксигенази. Зменшення синтезу гему корелювало зі зниженням вмісту цитохрому P<sub>450</sub> і b5 в мікросомальній фракції печінки експериментальних тварин. Перебіг зазначених змін повністю відображає стан метаболізму гему в умовах експериментально порушеного порфіринового обміну, що характеризується початковою активацією ферментів синтезу та поступовим зниженням їх активності на тлі посилення метаболізму гему.*

Підвищення інтересу клініцистів до вивчення порфіринів пов'язано з порушенням функціонування гемвмісних ферментних комплексів при різних видах інтоксикації організму (лікарськими засобами, солями важких металів, пестицидами) і ураженні печінки. Зниження вмісту мітохондріальних і мікросомальних гемопротейнів при цьому зменшує енергетичний потенціал клітин, змінює процеси біотрансформації продуктів метаболізму, обумовлюючи зниження пластичних процесів в організмі і розвиток ендотоксемії [1, 3, 11]. Відомо, що синтезований протопорфірин у печінці витрачається на синтез гему. Швидкість утворення гему, з одного боку, залежить від активності ключового ферменту синтезу гему – 5-амінолевулінатсинтази, а з іншого – накопичення вільного гему в тканині визначається також швидкістю його руйнування гемоксигеназою [2]. Рівень активності ключових ферментів метаболізму гему визначає його вміст у печінці і подальшу утилізацію його для синтезу гемопротейнів [4]. На підставі даних ряду робіт [7, 9] сформувалося уяв-

лення, що активність ферментів найбільш тісно пов'язана з рівнем активності гемопротейнів, таких як мікросомальні цитохроми P<sub>450</sub> і b5, мітохондріальні цитохроми, ферменти каталаза та ін. Незважаючи на важливість вивчення порушень обміну порфіринів при захворюваннях печінки, в літературі ці питання висвітлені недостатньо [4, 12]. У зв'язку з викладеним метою цієї роботи було вивчення активності ферментів синтезу і розпаду гему при порушенні порфіринового обміну, викликаного бензолною інтоксикацією.

Робота виконана у рамках науково-дослідної програми Національного фармацевтичного університету «Фармакологічні дослідження біологічно активних речовин і лікарських засобів синтетичного та природного походження, їх застосування у медичній практиці» (№ держ. реєстр. 010300909418).

## Матеріали та методи

Дослідження проведені на 48 нелінійних білих щурах-самцях з масою тіла 140-150 г. Порушення порфіринового обміну викликали підшкірними ін'єк-

ціями бензолу [6] дозами з розрахунку 0,5 мл на 1 кг маси тварин 2 рази на тиждень протягом 3 місяців. До кінця експерименту летальність склала 17%. Дослідження проводили через 1, 7, 10 і 30 діб від початку дослідження. Субклітинні структури виділяли диференційним центрифугуванням гомогенату печінки. В мітохондріальній фракції визначали активність 5-амінолевулінат-синтази [5] і гемсинтетази [8], а в мікросомально-цитозольній фракції – активність дегідратази амінолевулінової кислоти (Д-АЛК) [5] і гемоксигенази [7]. Вміст цитохромів P<sub>450</sub> і b5 в мікросомальній фракції визначали диференціальною спектрофотометрією на спектрофотометрі «Spectord M-40» [5]. Вміст білка в пробах визначали мікробіуретовим методом. Статистичну обробку проводили з використанням статистичного аналізу електронних таблиць Excel. Розраховували середні значення показників і стандартну помилку (Sx). Достовірність між середніми величинами визначали за t-критерієм Стьюдента (p < 0,05) [6].

## Результати та їх обговорення

Результати експериментів представлені в табл. 1 і 2. Ак-

Таблиця 1

**Динаміка показників синтезу і розпаду гему в печінці  
при порушенні порфіринового обміну, n=40**

Групи	Активність ферментів			
	АЛК-синтаза, нмоль АЛК / г на мг білка	Д-АЛК, мкмоль / с на мг білка	гемсинтетаза, мкмоль протопорфірину / хв на мг білка	гемоксигеназа, нмоль білірубину / хв на мг білка
Інтактні тварини	0,252±0,005	0,111±0,006	0,015±0,002	1,442±0,051
1 доба інтоксикації бензолом	0,494±0,041*	0,145±0,014	0,053±0,034*	1,594±0,064
7 діб інтоксикації бензолом	0,334±0,013*	0,106±0,029	0,029±0,004*	1,905±0,031
10 діб інтоксикації бензолом	0,312±0,004*	0,409±0,017*	0,017±0,003	1,977±0,091
30 діб інтоксикації бензолом	0,257±0,027	0,439±0,058*	0,014±0,0022*	1,952±0,033*

Примітка: \* —  $p < 0,05$  по відношенню до показників інтактної групи щурів.

тивність АЛК-синтази в печінці максимальна через 1-добу після введення бензолу і поступово знижується, наближаючись до значення інтактної групи щурів на 10-добу і особливо на 30-у. На відміну від АЛК-синтази, Д-АЛК істотно не змінювалася на 1-7 добу, а в подальшому зростала, перевищуючи статистично значимі значення норми в 3,63 і 3,87 рази через 10 і 30 діб дослідження, відповідно. Активність ферменту гемсинтетази зростала через добу в 3,13 рази ( $p < 0,05$ ), потім поступово знижувалася в порівнянні з попереднім терміном. Активність гемоксигенази у всі терміни дослідження мала тенденцію до збільшення. Згідно з даними літератури [4, 10] синтез гему в печінці здійснюється в мітохондріях (АЛК-синтаза і гемсинтетаза) і в мікосомально-цитозольній фракції (Д-АЛК). Спостережуване нами істотне збільшення активності АЛК-синтази в мітохондріях через добу після введення бензолу може бути пов'язане з інтенсивним витрачанням сукцинату для синтезу гему, що зменшує його використання дихальним ланцюгом мітохондрій печінки тварин. Дослідження [2, 3] показали пригнічення ендогенного дихання в результаті

зменшення фонду ендогенних субстратів у мітохондріях і, як наслідок, розвиток низькоенергетичного стану. Однак через 7 діб спостерігалася активація окиснювальних процесів у мітохондріях і розвиток високоенергетичного стану внаслідок монополізації дихального ланцюга бурштиновою кислотою, що, на наш погляд, пов'язано з її значним утворенням з інших сполук [12] і зменшенням відтоку сукцинату для синтезу гему, що збігається зі зниженням активності АЛК-синтази в наших експериментах. Надалі через розвиток некрозів у печінці функціонування мітохондрій послаблюється. Незважаючи на активацію АЛК-синтази і Д-АЛК, підвищений на 1-7 добу дослідження синтез гему поступово знижується, що свідчить про використання та утворення вільних попередників порфіринів [9] і уповільнення синтезу гему в печінці експериментальних тварин. Поряд з цим посилюється і розпад гему внаслідок активації гемоксигенази і зниження вмісту гемопротеїнів у клітині. При дослідженні вмісту мікосомальних гемопротеїнів встановлено їх зниження (табл. 2). Причому, якщо вміст цитохрому b5 знижується через 1, 7 і 10 діб від початку експе-

рименту в 1,37; 1,95 і 2,50 рази по відношенню до значень норми, то цитохрому P<sub>450</sub> – в 3,18; 4,94 і 8,08 рази, відповідно.

Згідно з даними літератури [4, 7] кореляція між підвищенням активності АЛК-синтази – ферменту, що лімітує швидкість синтезу гему, і вмістом мікосомального цитохрому P<sub>450</sub> спостерігається тільки в тому випадку, якщо гем, що утворився, не руйнується гемоксигеназою, і якщо одночасно індукується синтез відповідного апоцитохрому. При високій активності гемоксигенази АЛК-синтаза не може забезпечити накопичення вільного гему в тканині, і вміст цитохромів, що мають порівняно короткий період напіврозпаду, знижується або залишається на такому рівні, як і у контрольних тварин [3]. Мабуть, цим можна пояснити різке зниження рівня цитохрому P<sub>450</sub> в наших експериментах. Так, цитохром P<sub>450</sub> – це фермент, який порівняно недовго живе з періодом напіввиведення 1-2 дні, який використовує велику частину фонду гему в клітині [2]. Інші цитохроми – довгоіснуючі і вони використовують менше вільного гему при оновленні, але створений в конкретних експериментальних умовах коротко-

часний дефіцит гемму істотно не впливає на їх рівень. Коли в клітині знижується рівень вільного гемму, включаються механізми стимуляції його синтезу шляхом підвищення активності АЛК-синтази. І навпаки, при введенні тваринам речовин, які підвищують рівень вільного гемму, збільшується активність геммоксигенази, що супроводжується руйнуванням надлишку гемму. В цих умовах включаються механізми тривалої регуляції активності ключових ферментів метаболізму гемму, що ведуть до синтезу їх *de novo*. Зазначені механізми перешкоджають створенню на тривалий період апопротеїнів дефіциту гемму в клітині, а уповільнення деградації відповідних апопротеїнів сприяє під-

Таблиця 2

### Вміст мікросомальних гемопротеїнів у печінці експериментальних тварин, n=32

Групи	Рівень цитохромів, нмоль/мг білка	
	P <sub>450</sub>	b5
Інтактна	0,889±0,063	0,287±0,012
Експериментальна група з бен-зольною інтоксикацією через 1 добу	0,279±0,030*	0,209±0,017
через 4 доби	0,180±0,015*	0,147±0,010*
через 7 діб	0,110±0,024*	0,115±0,026*

Примітка: \* —  $p < 0,05$  по відношенню до показників інтактної групи щурів.

тримці постійного рівня мітохондріальних цитохромів.

#### ВИСНОВКИ

1. При порушенні порфіринового обміну в печінці розвиваються виражені зміни в активності ферментів синтезу і розпаду гемму.

2. Початкова активація ферментів синтезу гемму поступово знижується на тлі посилення метаболізму гемму, що збігається зі зменшенням вмісту мікросомальних гемопротеїнів у печінці експериментальних тварин.

#### ЛІТЕРАТУРА

1. Идельсон Л.И. / В кн.: *Нарушения порфиринового обмена в клинике внутренних болезней*. – М., 1969. – С. 52-55.
2. Калиман П.А., Нікітченко І.В. // *Медична хімія*. – 2001. – Т. 3, №1. – С. 5-11.
3. Калиман П.А., Стрельченко К.В., Бараннік Т.В., Нікітченко І.В. // *Фізіол. журн.* – 2003. – Т. 49, №2. – С. 66-71.
4. Калиман П.А., Бараннік Т.В. // *Укр. біохим. журн.* – 2001. – Т. 73, №1. – С. 5-15.
5. Камышиников В.С. *Справочник по клинико-биохимической и лабораторной диагностике*. – М., 2004. – 834 с.
6. Лапач С.Н., Чубенко А.В., Бабич П.Н. *Статистические методы в медико-биологических исследованиях с использованием Excel*. – К.: Морион, 2000. – 320 с.
7. Петренко А.Ю., Ковалев Г.А., Грищенко В.И. // *Проблемы криобиол.* – 2005. – Т. 5, №1. – С. 71-78.
8. *Руководство по клинической лабораторной диагностике. Ч. 3. Клиническая биохимия: Учеб. пособие* / М.А.Базарнова, З.П.Гетте, Л.И.Кальнова и др.; Под ред. проф. М.А.Базарновой, проф. В.Т.Морозовой. – 2-е изд., перераб. и доп. – К.: Вища шк., 2000. – 319 с.
9. Fujii, Dale G.L., Beutler E. // *Blood*. – 1998. – Vol. 34, №10. – P. 1632-1644.
10. Leusui S.F., Tomaro M.L. // *Ibid.* – 1994. – Vol. 1223, №1. – P. 9-14.
11. Maines M.D. *Heme Oxygenase: Clinical Applications and Functions*. – Fl: Inc. Boca Ration, Press CRC, 1992. – P. 266.
12. Peng J., Jonnes G.L., Watson K. // *Free Radic. Biol. Med.* – 2000. – Vol. 28, №11. – P. 1598-1606.

Адреса для листування: 61002, м. Харків,  
вул. Мельникова, 12. Тел. (57) 706-30-66.  
Національний фармацевтичний університет

Надійшла до редакції 01.03.2012 р.