
На правах рукописи

СЕЙФАДДИНОВА МАРИЯ СЕЙФАДДИНОВНА

**ОБМЕН АДЕНИЛОВЫХ НУКЛЕОТИДОВ
В ПЕЧЕНИ КРЫС ПРИ ДЕЙСТВИИ ГАЗОВОГО
КОНДЕНСАТА**

03.00.04 – биохимия

**АВТОРЕФЕРАТ
диссертации на соискание ученой степени
кандидата биологических наук**

Махачкала - 2005

Работа выполнена на кафедре медицинской и клинической биохимии Дагестанской государственной медицинской академии Министерства здравоохранения и социального развития Российской Федерации.

Научный руководитель: доктор медицинских наук,
профессор Нагиев Э.Р.

Официальные оппоненты: доктор биологических наук, профессор
Исмаилов Эльдер Шефиевич

кандидат биологических наук, доцент
Халилов Рустам Абдуразакович

Ведущая организация: Ростовский государственный
педагогический университет

Защита диссертации состоится «31¹198» 2005 г. в «14⁰⁰» часов на заседании диссертационного совета К 212.053.12 по присуждению ученой степени кандидата биологических наук при Дагестанском государственном университете по адресу 367000, г. Махачкала, Батырая, 4, Дагестанский государственный университет, биологический факультет.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке Дагестанского государственного университета (367000, г. Махачкала, ул. Батырая, 1)

Автореферат разослан «28» апреля 2005 г.

Ваш отзыв, заверенный печатью, просим направить по адресу: Дагестан, 367025, г. Махачкала, ул. М. Гаджиева, 43а, биологический факультет, e-mail - vinita @ Rambler.ru.

Ученый секретарь
диссертационного совета
доктор биологических наук



Магомедова М.А.

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность проблемы. Изучение механизмов воздействия токсических, чужеродных соединений на живой организм, выявление последствий влияния ксенобиотиков на метаболические реакции представляет практический и теоретический интерес.

Значительное увеличение разведочных и строительных работ нефтегазового комплекса в нашем регионе, естественно, влечет к возрастанию выбросов загрязнителей в окружающую среду. Ежегодно в атмосферу выбрасывается 2,5 млн. тонн нефти и нефтепродуктов, около 6 млрд м³ попутного нефтяного газа сжигается в факелах. Согласно экспертным данным, на нефтепромыслах теряется в общей сложности до 3,5% всей добываемой сырой нефти (с учетом нефтяных газов). Сейчас утилизируется в среднем около 70 % газов, поступающих из скважин с нефтью, а остальные 30 % сжигаются на факелах и частично испаряются в атмосферу (Грачев, Ахметханов, 2000; Мелконян, 2001).

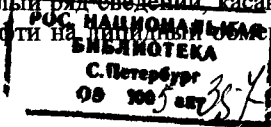
Кроме того, наблюдаются испарения нефти и нефтепродуктов в процессах их транспортировки и хранения. Источниками загрязнения атмосферы являются и нефтяные терминалы, и нефтебазы, железнодорожный транспорт, речные и морские нефтеналивные танкеры, автозаправочные комплексы и станции. Исследователями, в связи с этим, разрабатываются различные способы борьбы с нефтезагрязнениями и методы сбора и очистки (Цегельский и др., 2001).

В связи с этим возрастает актуальность проблемы острого и хронического воздействия нефти, нефтепродуктов, в том числе и газоконденсата (в условиях массового загрязнения среды ими) на обменные процессы организма.

Изучению этих вопросов посвящен ряд работ (Гиреев, 1983; Мионов, 1992; Егорова, 1995; Гильямирова, 1996), свидетельствующих о токсическом влиянии на обменные реакции организма различных нефтепродуктов.

Известно, что углеводороды с длинной цепью углеродных атомов, накапливаясь в тканях, оказывают прямое воздействие на внутриклеточный обмен. Наиболее опасными являются ароматические углеводороды, которые лучше растворимы в липидной фазе и обладают канцерогенными свойствами. Нефтепродукты могут аккумулироваться в живых организмах, содержащиеся в пище нефтепродукты нарушают функции некоторых органов и тканей человека и снижают общий уровень иммунитета, что повышает вероятность заболевания организма инфекционными болезнями (Воробьев, Новиков, 2001; Адаева, 2001).

В литературе имеется целый ряд сведений, касающихся токсического действия углеводородов нефти на организм человека. Показано, что за-



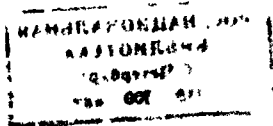
грязнение водной среды нефтью и сопутствующими растворами (буровой шлам, буровой раствор, газоконденсат) ведет к накоплению в тканях фосфолипидов, что говорит о процессах адаптации рыб (русский осетр, вобла, бычок и др.) к стрессовому воздействию загрязнителей. Вместе с тем наблюдается резкое падение суммарных фосфолипидов, сопровождающееся накоплением незестерифицированных жирных кислот и лизосоединений в тканях, что служит показателем усиления перекисного окисления мембранных липидов и, как следствие этого, деструктивных процессов (Чернышов, 1982; Исуев, Габибов, 1997; Абросимов, Бирюкова, 1997; Мусаев, Исуев, 2002; Уцов, Ибрапов, 2002; Серебренникова, 2002).

Единичные данные литературы показывают, что в отношении адениловой системы нуклеотидов воздействие этих же ксенобиотиков проявляется в падении уровня АТФ и накоплении АДФ и АМФ, что, вероятно, связано с расстройствами в соотношении процессов фосфорилирования и дефосфорилирования макроэргических соединений. Вместе с тем наблюдается повышение общей концентрации адениловых нуклеотидов, нормализация чего наблюдается по истечении двух недель после ингаляционного воздействия циклических углеводов (Шакиров, Фархутдинов, 1998; Егорова, Кулагина, 1995; Шакиров, Фархутдинов, 2000).

Изучение влияния газоконденсатной интоксикации на организм рыб и особенно наземных животных началось сравнительно недавно, о чем свидетельствует незначительное число работ (Костров, Курапов, 2000; Омаров, Курапов, 2000; Уцов, 2002; Серебренникова, Нагиев, 2002). В настоящее время изучение биохимических механизмов действия газоконденсата на организм представляется актуальной задачей экологической и токсикологической биохимии.

Энергетический обмен, в котором главную роль играют адениловые нуклеотиды, занимает центральное место в клеточном метаболизме. Любой биосинтетический и катаболический процесс сопровождается соответственно затратой и выработкой энергии, заключенной в связях макроэргических соединений, какими являются АТФ и АДФ. Кроме того, адениловые нуклеотиды являются структурными компонентами нуклеиновых кислот, участвуют в обмене коферментов (НАД, НАДФ, ФАД, КоА, ТПФ и др.). Они являются предшественниками циклических нуклеотидов, которые запускают каскадный механизм активирования внутриклеточных белков. АТФ необходим в процессах мышечного сокращения, активного транспорта, проведения нервного импульса (Маршалл, 1999; Ткачук и др., 2002; Северин и др., 2003).

В доступной литературе практически отсутствуют данные об активности важнейших ферментов метаболизма адениловых нуклеотидов -



АМФ-дезаминазы, 5'-нуклеотидазы и аденилаткиназы при действии газового конденсата.

В связи с этим представляет несомненный интерес выяснение закономерностей действия газоконденсата на процессы биосинтеза и распада нуклеотидов аденилового ряда, а также на их содержание в динамике отравления этим токсикантом.

Цель и задачи исследования. Изучить содержание адениловых нуклеотидов в печени крыс и активность ключевых ферментов их обмена при действии газового конденсата.

Для выполнения этой цели в работе решались следующие задачи:

1. Исследовать содержание отдельных форм адениловых нуклеотидов в печени крыс при действии газового конденсата.

2. Изучить в динамике острого отравления газоконденсатной смесью активность АМФ-дезаминазы в печени и сыворотке крови экспериментальных животных.

3. Изучить активность 5'-нуклеотидазы в печени и сыворотке крови экспериментальных крыс в динамике острого отравления газоконденсатом.

4. При модельных условиях эксперимента изучить активность прямой и обратной аденилаткиназы в печени и сыворотке крови отравленных животных.

Основные положения, выносимые на защиту.

1. Обнаружено, что в биохимических механизмах отравления газоконденсатом существенную роль играют нарушения содержания адениловых нуклеотидов в печени подопытных животных, что коррелирует с летальностью пораженных крыс и изменениями гематологических показателей.

2. Установлен факт резкого снижения содержания АДФ и АТФ на 5-10 сутки после отравления в печени крыс, подвергшихся воздействию газоконденсатной смеси.

3. В изменениях содержания адениловых нуклеотидов печени крыс в условиях отравления газоконденсатом, ведущую роль играют нарушения активности ферментов АМФ-дезаминазы, 5'-нуклеотидазы и аденилаткиназы. В частности, заметно повышается активность аденилаткиназы (особенно прямой реакции), снижается активность аденозиндезаминазы и, весьма существенно, - 5'-нуклеотидазы в печени экспериментальных животных в динамике острого отравления газоконденсатом.

Научная новизна. В настоящей работе впервые проведено комплексное исследование активности ключевых ферментов метаболизма адениловых нуклеотидов с одновременным определением содержания этих нуклеотидов в печени крыс в динамике острого отравления газовым

конденсатом. Получены новые данные об активности аденилаткиназы, АМФ-деаминазы и 5'-нуклеотидазы в печени и сыворотке крови крыс, подвергшихся действию газоконденсатной смеси.

Обнаружены специфические особенности функционирования ферментных систем обмена адениловых нуклеотидов в митохондриях и супернатанте печени отравленных животных. АТФ, как аллостерический эффектор АМФ-деаминазы, в условиях *in vitro* повышает активность фермента в печени и снижает в сыворотке крови.

Теоретическая и практическая значимость. Полученные данные расширяют имеющиеся представления о биохимических механизмах действия газового конденсата на организм, а также о механизмах нарушения активности ферментных систем метаболизма адениловых нуклеотидов и содержания этих нуклеотидов в тканях при действии газоконденсата.

Обнаруженные ранние изменения (спустя 1 час–1 сутки) активности исследуемых ферментов обмена адениловых нуклеотидов в сыворотке крови отравленных животных можно использовать в качестве индикаторов отравления данным токсикантом и применить их определение в целях практической медицины.

Данные, полученные в результате проведенных исследований, могут быть использованы при чтении лекций и проведении практических занятий по общей и клинической биохимии, токсикологической и экологической биохимии. Полученные в диссертации результаты используются в учебном процессе Дагестанской государственной медицинской академии при чтении лекций по токсикологической и биологической химии. Результаты работы вошли в лабораторный практикум по биохимии (Махачкала, 2004 г).

Апробация работы. Результаты работы докладывались и обсуждались на научных конференциях молодых ученых и на итоговых научных конференциях профессорско-преподавательского состава Дагестанской государственной медицинской академии (2003 - 2005); на международной научной конференции «Биохимия – Медицина» (Махачкала, 2002); на 2-й и 3-й Республиканской научно-практической конференции «Новые технологии в медицине» (Махачкала, 2003, 2004); на Всероссийской научной конференции «Актуальные проблемы биологии, медицины и экологии» (Томск, 2004); на региональной научно-практической конференции «Диагностика – специфическая форма познания патологических процессов» (Махачкала, 2004), на VII-й международной конференции «Циклы» (Ставрополь, 2005).

Публикации. По материалам данного исследования опубликовано 12 работ, две статьи находятся в печати.

Структура и объем диссертации. Диссертация состоит из введения, разделов: обзора литературы, описания материалов и методов исследования, результатов собственных исследований и их обсуждения, заключения и выводов. Библиографический указатель литературы содержит 210 источников, в том числе 184 автора из стран СНГ. Диссертация изложена на 130 страницах машинописного текста, содержит 18 таблиц и 7 рисунков.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Исследования проводились на 110 половозрелых беспородных лабораторных крысах обоего пола, средней массой 190–200 г. Подопытные животные, как и контрольные содержались в одинаковых стандартных условиях вивария на полноценном пищевом рационе (Западнюк и др., 1983).

Острое отравление газовым конденсатом вызывали путем однократного, перорального введения токсиканта предварительно наркотизированным животным. В качестве наркоза использовали калипсол. Газовый конденсат растворяли в дистиллированной воде 1:1 и вводили экспериментальным крысам в желудок через зонд в количестве 1 мл газоконденсата на 100 г массы животного. Контрольным крысам вводили эквивалентное количество дистиллированной воды.

Опыты проводились через 1 час, 1, 5, 10 и 15 суток после введения токсиканта. Такая постановка экспериментов позволяла исследовать наиболее ранние биохимические изменения аденилового нуклеотидного обмена в динамике развития патологического процесса в результате отравления газоконденсатной смесью. Исследования проводились в печени (отдельные серии и в сыворотке крови) отравленных животных. Печень, как известно, является весьма важным в метаболическом отношении органом и изменения ее обмена под влиянием различных воздействий в значительной мере отражаются на состоянии всего тела. Кроме того, печень как обезвреживающий орган, чрезвычайно тонко реагирует на различные неблагоприятные воздействия. Следует также отметить, что в печени активно протекает метаболизм нуклеотидов, биосинтез белков, а содержание нуклеотидов в этой ткани, то есть, в ткани с интенсивной биосинтетической активностью, отличается относительно высоким уровнем (Бышевский и др., 1994; Северин и др., 2003).

Животных забивали декапитацией, быстро извлекали печень, затем отмывали ее от крови охлажденным физиологическим раствором, высушивали между листами фильтрованной бумаги и взвешивали. Выделение митохондрий из гомогената производили общепринятым методом дифференциального центрифугирования (Гриффитс, 1978).

Содержание нуклеотидов определяли методом ионообменной хроматографии (Киреев и др., 1979). Количество отдельных нуклеотидов рассчитывали в мкмоль на 1 г ткани, используя молярные коэффициенты экстинкции. Активность 5'-нуклеотидазы оценивали по приросту неорганического фосфата (Скулачев, 1962) и выражали в мкг образовавшегося неорганического фосфата (Pi) на 1 мг белка, количество которого определяли микробиуретовым методом (Кочетов, 1980).

Активность АМФ-дезаминазы определяли спектрофотометрическим методом, основанным на уменьшении оптической плотности раствора при 265 нм после дезаминирования АМФ до ИМФ (Пеккель, 1980). Активность фермента рассчитывали по убыли адениловой кислоты в процессе АМФ-дезаминазной реакции с учетом коэффициента молярной экстинкции АМФ, равного 14500. Расчет активности АМФ-дезаминазы проводили в мкг АМФ на мг белка или мл сыворотки крови за время инкубации.

При определении активности аденилаткиназы исходили из того, что аденилаткиназная реакция обратима, - нами исследовалась активность как прямой, так и обратной аденилаткиназной реакции. Активность прямой аденилаткиназной реакции определяли по интенсивности образования АДФ в системе, сопряженной с пируваткиназой и лактатдегидрогеназной реакциями (Шестакова, 1972). Активность прямой аденилаткиназной реакции выражали в мкмольях окисленного НАДН на мг белка или мл сыворотки крови за время инкубации.

Активность обратной аденилаткиназной реакции определяли по интенсивности образования АТФ в системе, сопряженной с гексокиназой и глюкозо-6-фосфатдегидрогеназной реакциями (Lamprecht et al., 1963). Активность обратной аденилаткиназной реакции выражали в мкмольях восстановленного НАДФ на мг белка или мл сыворотки крови за время инкубации.

Результаты исследований подвергались статистической обработке при помощи общепринятых методов вариационной статистики (Кокунин, 1975).

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

В регуляции метаболизма адениловых нуклеотидов участвует сложная система биокаталитических механизмов клетки, а у высших организмов еще и регуляторные факторы надклеточного уровня.

Анализ полученных результатов свидетельствует о том, что действие газового конденсата приводит к существенным изменениям обмена адениловых нуклеотидов в печени и сыворотке крови отравленных животных. Характерной особенностью изменений содержания нуклеотидов является прогрессирующее снижение содержания АДФ и АТФ в печени по-

сле действия газового конденсата. В отличие от этого количество АМФ после отравления в большинстве сроков исследования повышается, причем, наиболее выражено в относительно более поздние сроки после отравления (табл. 1).

Таблица 1

**Содержание адениловых нуклеотидов в печени крыс
до и после отравления газовым конденсатом
(В мкмоль на 1 г сырой ткани; $M \pm m$; $n=8$)**

№	Состояние животных	АТФ	АДФ	АМФ
1	Интактные (контроль)	$2,52 \pm 0,09$	$1,37 \pm 0,04$	$1,64 \pm 0,05$
2	Сроки после отравления 1 час	$2,61 \pm 0,09$	$1,33 \pm 0,04$	$1,68 \pm 0,05$
3	1 сут	$2,42 \pm 0,09$	$1,28 \pm 0,03$	$1,77 \pm 0,06$
4	5 сут	$1,49 \pm 0,08^*$	$0,83 \pm 0,03^*$	$1,22 \pm 0,05^*$
5	10 сут	$1,74 \pm 0,08^*$	$0,77 \pm 0,03^*$	$1,86 \pm 0,06$
6	15 сут	$1,95 \pm 0,07$	$1,11 \pm 0,04$	$2,18 \pm 0,09^*$

Здесь и далее * - $P < 0,05$ по отношению к контролю

Кроме того, достигая максимума в период примерно на 5-10-е сутки после действия токсиканта, существенные изменения обнаружены в активности исследуемых ферментов обмена адениловых нуклеотидов, причем, обнаруженные сдвиги в адениловом нуклеотидном фонде печени крыс при действии газоконденсата, во многих случаях коррелирует с изменениями активности ферментов обмена этих нуклеозидфосфатов. Так, в печени крыс на 5-е сутки после отравления газоконденсатом отмечается достоверное снижение содержания не только АТФ и АДФ, но и АМФ. В этот же период происходит резкое усиление активности АМФ-деаминазы, катализирующей деградацию АМФ (табл. 2; рис. 1, 2).

Активность же 5'-нуклеотидазы в митохондриях печени крыс на 5-е сутки после отравления ниже контроля, причем без АТФ существенно (около 74%); однако спустя 10 суток (с АТФ) на 42% превышает контроль (табл. 3; рис. 3,4).

Минимальное количество АТФ в печени после действия газоконденсата отмечается на 5-е сутки (59% от контроля), однако и спустя 10 суток содержание АТФ остается достоверно сниженным - около 70% от контрольных показателей. Более того, и концу эксперимента (15 сутки) количество АТФ не достигает контрольных значений (77%).

Таблица 2

Активность АМФ-деаминазы в печени крыс отравленных газовым конденсатом (В мкг АМФ/на мг белка; $M \pm m$; $n=7-8$)

№	Фракции	постмитохондриальный супернатант		митохондрии	
	Условия опыта	с АТФ	без АТФ	с АТФ	без АТФ
1	Интактные (контроль)	0,71 $\pm$ 0,06	0,44 $\pm$ 0,03	0,10 $\pm$ 0,03	0
2	Сутки после отравления 1 час	0,70 $\pm$ 0,05	0,47 $\pm$ 0,05	0,19 $\pm$ 0,02*	0
3	1 сут	0,83 $\pm$ 0,10	0,32 $\pm$ 0,02*	0,27 $\pm$ 0,04*	0,09
4	5 сут	0,97 $\pm$ 0,04*	0,46 $\pm$ 0,05	0,31 $\pm$ 0,06*	0
5	10 сут	0,63 $\pm$ 0,04	0,48 $\pm$ 0,04	0,18 $\pm$ 0,03*	0
6	15 сут	0,66 $\pm$ 0,05	0,47 $\pm$ 0,06	0,13 $\pm$ 0,02	0

Таблица 3

Активность 5'-нуклеотидазы в печени крыс отравленных газовым конденсатом (В мкг Р_i/на мг белка; $M \pm m$; $n=7-8$)

№	Фракции	постмитохондриальный супернатант		митохондрии	
	Условия опыта	с АТФ	без АТФ	с АТФ	без АТФ
1	Интактные (контроль)	11,0 $\pm$ 0,7	9,7 $\pm$ 0,9	21,8 $\pm$ 3,2	19,9 $\pm$ 2,4
2	Сутки после отравления 1 час	14,4 $\pm$ 1,4*	9,4 $\pm$ 1,4	34,0 $\pm$ 3,7*	17,7 $\pm$ 1,0
3	1 сут	7,4 $\pm$ 1,2*	5,6 $\pm$ 0,5*	13,3 $\pm$ 2,0*	18,5 $\pm$ 2,0
4	5 сут	7,9 $\pm$ 1,0*	9,4 $\pm$ 1,2*	18,2 $\pm$ 2,2	14,8 $\pm$ 0,08*
5	10 сут	11,2 $\pm$ 0,9	10,2 $\pm$ 0,5	31,0 $\pm$ 2,5*	16,4 $\pm$ 0,4
6	15 сут	11,9 $\pm$ 1,1	9,6 $\pm$ 1,2	22,4 $\pm$ 3,5	19,6 $\pm$ 1,4

Рис. 1 Активность АМФ-деаминазы в печени (митохондрии и супернатант) и в сыворотке крови (в % от контроля) при отравлении газоконденсатом (без АТФ)

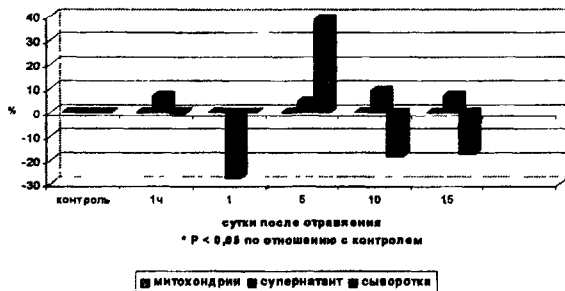


Рис. 2. Активность АМФ-деаминазы в печени (митохондрии и супернатант) и в сыворотке крови (в % от контроля) крыс при отравлении газоконденсатом (с АТФ)



Рис.3 Активность 5-нуклеотидазы в печени(митохондрии и супернатант) и в сыворотке крови (в % от контроля) при отравлении газоконденсатом (без АТФ)

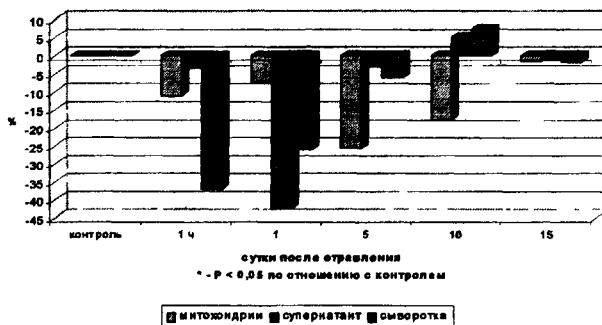


Рис. 4 Активность 5-нуклеотидазы в печени (митохондрии и супернатант) и в сыворотке крови крыс (в % от контроля) при отравлении газоконденсатом (с АТФ)



Рис. 5 Активность аденилаткиназы в печени (митохондрии и супернатант) и в сыворотке крови крыс (в % от контроля) при отравлении газоконденсатом (прямая реакция)



Рис. 6 Активность аденилаткиназы в печени (митохондрии и супернатант) и в сыворотке крыс (в % от контроля) при отравлении газоконденсатом (обратная реакция)



Изменения содержания АДФ в печени отравленных животных имеют принципиально схожую с АТФ картину, но в то же время несколько менее выраженную, чем АТФ. В отличие АТФ и АДФ, содержание АМФ, напротив, в большинстве сроков исследования повышается, причем тем больше, чем больше времени прошло с момента отравления газоконденсатом. Так, на 10 - 15-е сутки количество АМФ на 30-40% превышает контрольные значения.

Важным аспектом обмена нуклеотидов в тканях пораженного организма является усиление катаболизма этих соединений. Существенную роль в этих процессах играют нуклеозидфосфатазные системы клеток (Нарыжный и др., 1992; Бохински, 1994). В нарушениях аденилового нуклеотидного фонда печени отравленных крыс, важнейшее место занимают комплексные изменения активности ферментов их обмена.

Познание и истолкование ранних биохимических изменений в органах и тканях организма, подвергшегося действию различных ксенобиотиков, представляет собой один из наиболее важных разделов токсикологической биохимии, позволяющий уточнить патогенетические механизмы отравления и теоретически обосновать эффективные методы защиты (Силуянова и др., 2002). Наибольшие перспективы этом плане открываются при изучении динамики биохимических процессов, их направленности, интенсивности и взаимосвязей.

На основании проведенных исследований установлено, что печень, характеризующаяся высокой метаболической и функциональной активностью, отличается также высокой активностью изученных ферментов. В частности, в печени активно протекает взаимопревращение адениловых нуклеотидов, о чем свидетельствует выраженная активность аденилаткиназы.

Печень отличается высоким катаболизмом адениловой кислоты с участием АМФ-деаминазы и 5'-нуклеотидазы. И это имеет важное значение для снижения концентрации АМФ в клетке, регуляции пула адениловых нуклеотидов, а также повышения аденилатного энергетического заряда не только путем ускорения ресинтеза АТФ, но и путем уменьшения содержания одного из компонентов адениловой системы – АМФ, не имеющего макроэргической связи (Ткачук и др., 2002; Северин и др., 2003; Holmsen, et al., 1997).

Четкая корреляция между активностью ферментов обмена нуклеотидов и их содержанием обнаруживается не всегда. Это свидетельствует о том, что другие многочисленные реакции использования адениловых нуклеотидов также могут сыграть важную роль для общей оценки аденилового нуклеотидного фонда печени отравленных крыс. Однако, в большинстве сроков исследования, изменения содержания отдельных форм нуклео-

тидов в печени крыс после действия токсиканта хорошо согласуются с изменениями основных ферментов обмена этих нуклеотидов, что свидетельствует о ведущей роли данных каталитических систем в поддержании определенного уровня адениловых нуклеотидов в исследуемых тканях.

Важное значение для жизнедеятельности клетки имеет суммарное количество адениловых нуклеотидов (Апшмарин, 1998; Маршалл, 2003). Независимо от механизма снижения пула нуклеотидов происходит значительное замедление многих реакций синтеза, в частности, снижается биосинтез РНК и белка. Причем высокий пул нуклеотидов коррелирует с ускорением синтеза РНК и белка, а низкий – с угнетением процессов синтеза (Хансон и др., 1988; Тихонов, 1990). Пул нуклеотидов зависит от соотношения скорости «притока» адениловых нуклеотидов и скорости «оттока» их в реакциях синтеза с использованием адениловой кислоты, а также в процессе дезаминирования или дефосфорилирования АМФ с участием АМФ-дезаминазы и 5'-нуклеотидазы.

Проведенные исследования активности прямой и обратной аденилаткиназной реакции показали, что в печени и сыворотке крови обмен аденилатов с участием аденилаткиназы более интенсивно протекает по пути превращения АТФ и АМФ в аденозиндифосфорную кислоту ($\text{АТФ} + \text{АМФ} \rightarrow 2 \text{АДФ}$), чем в обратном направлении. Особенно это заметно в печени, где активность прямой аденилаткиназной реакции в митохондриях и супернатанте соответственно в 9 и 5 раз интенсивнее, чем обратной (табл. 4; рис. 5, 6).

Интенсивно протекающая прямая аденилаткиназная реакция имеет важное значение в условиях интенсивного использования АТФ для биосинтетических реакций, когда АТФ расщепляется по пирофосфатному пути. Разрыв двух макроэргических связей АТФ приводит к дополнительному выигрышу в свободной энергии (Скулачев, 1994; Березов и др., 2002). В этих условиях аденилаткиназа, во-первых, расходует продукт пирофосфатного пути расщепления АТФ (АМФ), создавая благоприятные условия течения данной реакции; во-вторых, пополняет уровень АДФ, необходимый для активации окислительных процессов и ресинтеза АТФ.

Активность обратной аденилаткиназной реакции в тканях животных выражена значительно слабее, чем прямой, что в определенной степени связано и с ингибирующей ролью АТФ на активность аденилаткиназы (Бышевский и др., 1997; Сепмет и др., 1998). При интенсивном расщеплении АТФ до АДФ и неорганического фосфата уменьшается отношение АТФ/АДФ и конкуренция между нуклеотидами складывается в пользу превращения аденилаткиназой АДФ в АТФ и АМФ. Повышение интенсивности обратной аденилаткиназной реакции в этих условиях метаболизма способствует пополнению уровня АТФ и росту концентрации АМФ

Таблица 4

Активность прямой и обратной аденилаткиназы в печени крыс отравленных газовым конденсатом (В мкмоль НАДН (или НАДФ⁺)/на мл сыворотки; $M \pm m$; $n = 7-8$)

№	Фракции	постмитохондриальный супернатант		митохондрии	
	Условия опыта	Прямая	Обратная	Прямая	Обратная
1	Интактные (контроль)	1,26 $\pm$ 0,12	0,25 $\pm$ 0,01	3,02 $\pm$ 0,13	0,32 $\pm$ 0,01
2	Сутки после отравления 1 час	1,73 $\pm$ 0,10*	0,23 $\pm$ 0,01	3,12 $\pm$ 0,15	0,30 $\pm$ 0,01
3	1 сут	2,10 $\pm$ 0,09*	0,30 $\pm$ 0,01*	3,81 $\pm$ 0,16*	0,38 $\pm$ 0,02
4	5 сут	1,51 $\pm$ 0,02	0,32 $\pm$ 0,02*	3,97 $\pm$ 0,26*	0,45 $\pm$ 0,04*
5	10 сут	1,44 $\pm$ 0,11	0,28 $\pm$ 0,01	4,11 $\pm$ 0,28*	0,41 $\pm$ 0,02*
6	15 сут	1,06 $\pm$ 0,05	0,27 $\pm$ 0,01	4,14 $\pm$ 0,29*	0,37 $\pm$ 0,02

- субстрата АМФ-деаминазы и 5'-нуклеотидазы и ингибитора обратной аденилаткиназной реакции. Поэтому повышение интенсивности катаболизма АМФ будет способствовать превращению 2 АДФ $\rightarrow$ АТФ + АМФ в аденилаткиназной реакции. Причем вначале, когда уровень АТФ относительно невысокий, АМФ подвергается преимущественно дефосфорилированию. По мере повышения концентрации АТФ активируется АМФ-деаминаза и угнетается 5'-нуклеотидаза, то есть превалирует процесс деаминарования адениловой кислоты.

Таким образом, при интенсивном расщеплении АТФ на АДФ и неорганический фосфат аденилаткиназа, АМФ-деаминаза и 5'-нуклеотидаза способствуют ресинтезу АТФ. Причем все три фермента в данной метаболической ситуации представляют собой сопряженную ферментную систему, в которой продукт предыдущего фермента служит субстратом для следующего.

В печени экспериментальных животных АМФ подвергается преимущественно дефосфорилированию (табл. 3; рис. 2); в сыворотке крови – как дефосфорилированию, так и деаминарованию (табл. 5; рис. 4). АМФ-деаминаза и 5'-нуклеотидаза, катализируя распад адениловой кислоты, регулируют пул адениловых нуклеотидов и величину аденилатного энергетического заряда клетки.

Таблица 5

Активность АМФ-дезаминазы, 5'-нуклеотидазы и аденилаткиназы в сыворотке крови при отравлении газоконденсатом (В мкг АМФ/на мл сыворотки, в мкг Рi/на мл сыворотки, в мкмоль НАДН (или НАДФ⁺)/на мл сыворотки, М±m; n= 7-8)

№	Фермент Условия опыта	АМФ-дезаминаза		5'-нуклеотидаза		аденилаткиназа	
		без АТФ	с АТФ	без АТФ	с АТФ	прямая	обратная
1	Интактные (контроль)	5,55±0,19	3,76±0,23	29,47±0,83	42,70±1,43	0,98±0,08	0,51±0,04
2	Сутки после отравления 1 час	5,53±0,18	3,79±0,23	18,57±0,92*	29,88±1,57*	0,95±0,08	0,49±0,04
3	1 сут	5,55±1,02	5,28±0,63	21,82±2,05*	26,09±2,50*	1,83±0,21*	0,53±0,02
4	5 сут	7,70±0,91*	5,63±0,57	27,67±1,01	41,67±2,91	1,64±0,24*	0,50±0,03
5	10 сут	4,54±0,74	6,23±0,42	31,60±1,36	44,85±0,68	1,12±0,13	0,52±0,03
6	15 сут	4,59±0,12	5,91±0,40	33,16±1,32	41,93±2,11	1,03±0,09	0,54±0,04

Следует подчеркнуть, что наиболее выраженные сдвиги как в содержании адениловых нуклеотидов, так и в активности ферментов их метаболизма, в большинстве случаев отмечается на 5-е и 10-е сутки после отравления животных. При модельных условиях эксперимента эти изменения в основном совпадают с общим состоянием отравленных животных, максимальной летальностью и изменениями гематологических показателей.

В динамике развития отравления активность ферментов обмена адениловых нуклеотидов претерпевают фазные изменения в зависимости от срока прошедшего после действия газоконденсата. Так, спустя 1 сутки после отравления газовым конденсатом в митохондриях и супернатанте происходит заметное повышение интенсивности прямой и обратной аденилаткиназной реакции. Одновременно с этим, в результате отравления, снижается активность АМФ-дезаминазы (в супернатанте) и 5'-нуклеотидазы в супернатанте и митохондриях. В митохондриях печени появляется незначительная активность АМФ-дезаминазы (без АТФ), отсутствующая в контроле.

Обращает внимание тот факт, что рост активности прямой аденилаткиназной реакции в печени отравленных крыс выражен в значительно большей степени, чем обратной. Так, в супернатанте интенсивность ее че-

рез 1 сутки исследований возрастает до 167% по отношению к контролю. Последнее способствует тому, что в аденилаткиназной реакции АТФ и АМФ интенсивно превращаются в АДФ.

Рост активности прямой аденилаткиназной реакции в совокупности с уменьшением концентрации АТФ, что особенно заметно на 5-е и 10-е сутки после действия газового конденсата, следует рассматривать как отрицательное последствие отравления токсикантом.

Активность обратной аденилаткиназной реакции (в противоположность прямой) в печени отравленных животных повышается в меньшей степени – примерно на 20-40% по отношению к контролю. Рост интенсивности обратной аденилаткиназной реакции ускоряет превращение адениловых нуклеотидов в направлении $2 \text{ АДФ} \rightarrow \text{АТФ} + \text{АМФ}$, что приводит к некоторому пополнению уровня АТФ. Более значительному повышению активности данной реакции препятствует второй ее продукт – адениловая кислота. Как отмечалось ранее, в печени интактных крыс обратная аденилаткиназная, АМФ-деаминазная и 5'-нуклеотидазная реакции сопряжены таким образом, что продукт первой реакции (АМФ) подвергается катаболизму с участием АМФ-деаминазы и 5'-нуклеотидазы. Действие газового конденсата вызывает выраженное угнетение активности АМФ-деаминазы и 5'-нуклеотидазы. В результате этого замедляется распад адениловой кислоты, которая может ингибировать обратную аденилаткиназную реакцию.

Поскольку уровень АТФ, АДФ и АМФ отражает баланс между реакциями, приводящими к их образованию и использованию, то для оценки полученных результатов необходимо учитывать ряд факторов, определяющих количество этих нуклеотидов в тканях. Снижение скорости катаболизма АМФ в результате падения активности АМФ-деаминазы и 5'-нуклеотидазы, усиленный расход АТФ в связи со значительным повышением интенсивности прямой аденилаткиназной реакции усугубляет нарушение обмена адениловых нуклеотидов и еще больше снижает уровень АТФ и величину аденилатного энергетического заряда в гепатоцитах пораженных животных.

После действия газоконденсатной смеси в сыворотке крови происходит повышение интенсивности прямой аденилаткиназной реакции и функции АМФ-деаминазы. Рост их активности максимально приходится на 5-е сутки после отравления, то есть совпадает с периодом наиболее выраженных изменений в печени, а также состоянием пораженных животных. Причем активность аденилаткиназы повышается более значительно, чем АМФ-деаминазы.

Аденилаткиназа, АМФ-деаминаза и 5'-нуклеотидаза имеют не одинаковую молекулярную массу. Наиболее низкая ее величина у аденилат-

киназы – 21500-40000 (Criss et al., 1984; Kubo et al., 1994). АМФ-дезаминаза различных тканей имеет молекулярную массу 161000-320000 (Нечипоренко и др., 1987; Skladanowski et al., 1991), а 5'-нуклеотидаза – 110000 – 205000 (Nakamura, 1986; Naito et al., 1989). Так как размер молекулы аденилаткиназы значительно меньше, чем АМФ-дезаминазы и 5'-нуклеотидазы, повышение ее активности в сыворотке крови может быть связано с тем, что фермент относительно легко проникает через плазматическую мембрану даже после незначительного повреждения ее различными ксенобиотиками.

Таким образом, проведенные нами исследования комплекса ферментов обмена адениловых нуклеотидов позволили раскрыть ранее неизвестные механизмы снижения уровня АТФ и нарушения обмена АДФ и АМФ в клетке после воздействия газовым конденсатом. Угнетение активности АМФ-дезаминазы и 5'-нуклеотидазы способствует замедлению катаболизма и накопления АМФ. Кроме того, обнаруженное нами достоверное снижение концентрации АМФ на 5-е сутки до 74% также может быть связано с тем, что АМФ активно используется в прямой аденилаткиназной реакции, активность которой при модельных условиях эксперимента преобладает над активностью обратной аденилаткиназной реакции. Это способствует утилизации АМФ и пополнению уровня АДФ. Действительно, в условиях нашего эксперимента содержание АДФ в печени отравленных животных снижается в меньшей степени, чем АТФ. Кроме того, в интенсивно протекающей прямой аденилаткиназной реакции одновременно с АМФ расходуется и АТФ, возрастает дефицит макроэрга в клетке. Следовательно, нарушения активности аденилаткиназы, АМФ-дезаминазы и 5'-нуклеотидазы являются одной из важных причин снижения уровня АТФ в гепатоцитах при воздействии данного токсиканта.

Механизмы происходящих изменений активности ферментов обмена адениловых нуклеотидов после отравления газоконденсатом могут быть разными, в том числе и связанными с аллостерической регуляцией ферментативной активности. Из числа исследованных нами ферментов выраженной аллостерической регуляции подвергается АМФ-дезаминаза. Функция данного фермента зависит от АТФ – одного из его аллостерических эффекторов. Как показали результаты наших исследований, АТФ *in vitro* повышает активность АМФ-дезаминазы в митохондриях и супернатанте печени, а в сыворотке крови понижает ее функцию. Следует отметить, что после отравления в митохондриях и супернатанте печени не ослабляется стимулирующее действие АТФ на активность АМФ-дезаминазы, а в сыворотке крови отравленных животных АТФ практически не вызывает изменений функции фермента. Из приведенных данных следует, что отравление газоконденсатом существенно не влияет на функ-

циональное состояние аллостерического центра АМФ-деаминазы митохондрий и супернатанта печени, а фермент сыворотки крови отравленных животных выходит из-под контроля регуляторного влияния АТФ. Причем эти нарушения, вероятно, в некоторой степени определяют направленность изменений активности АМФ-деаминазы.

Как уже указывалось, изменения активности исследованных ферментов обмена адениловых нуклеотидов в сыворотке крови отравленных животных, появляются в сравнительно ранние сроки, когда клинические возможности распознавания отравления ограничены отсутствием специфической симптоматики, а также доступностью биологического материала. В связи с этим исследование активности данных ферментов в сыворотке крови является перспективным в плане разработок соответствующих диагностических критериев для практической медицины.

ВЫВОДЫ

1. Печень интактных крыс характеризуется высокой активностью ферментов метаболизма адениловых нуклеотидов – АМФ-деаминазы, 5'-нуклеотидазы и аденилаткиназы. Активность всех изученных ферментов в митохондриях печени заметно выше, чем в супернатанте. Активность прямой аденилаткиназной реакции в митохондриях и супернатанте печени существенно выше, чем обратной аденилаткиназной реакции.

2. Действие газоконденсатом вызывает значительные нарушения содержания отдельных форм адениловых нуклеотидов, а также активности ферментов их метаболизма в печени. Доминирующей тенденцией при этом является снижение содержания АДФ и особенно АТФ в большинстве сроков исследования. Наблюдаемые отклонения обусловлены изменениями активности ферментов обмена нуклеотидов. Одной из важных причин снижения содержания АТФ является установленные изменения активности аденилаткиназы, АМФ-деаминазы и 5'-нуклеотидазы.

3. После отравления газоконденсатом происходят фазные изменения активности ферментов обмена нуклеотидов. Наиболее закономерным является прогрессирующее усиление активности аденилаткиназы в печени и сыворотке крови, причем более существенно – прямой аденилаткиназной реакции.

4. Наиболее выраженные изменения динамики содержания адениловых нуклеотидов и активности ферментов их обмена наблюдаются в период с 5-х на 10-е сутки, что совпадает во времени с нарастанием тяжести отравления изменениями клеточного состава периферической крови и летальностью отравленных животных.

5. У отравленных крыс происходит угнетение активности 5'-нуклеотидазы (на 1-5-е сутки) и в сыворотке крови – в большинстве сроков наблюдения. Активность АМФ-дезаминазы (без АТФ) достоверно снижена до 73% в супернатанте печени и повышена (с АТФ) в митохондриях печени и в сыворотке крови на всех этапах исследования.

6. АТФ, как аллостерический эффектор АМФ-дезаминазы, в условиях *in vitro* повышает ее активность в печени и снижает в сыворотке крови интактных животных. Одной из причин нарушения активности АМФ-дезаминазы при действии газового конденсата является ослабление аллостерической регуляции ее функции АТФ.

7. Ранние изменения активности ферментов обмена адениловых нуклеотидов (через 1 час – 1 сутки) в сыворотке крови животных, подвергшихся действию газового конденсата, могут сыграть роль индикаторов отравления данным токсикантом, что может быть использовано в практической медицине.

Список работ, опубликованных по теме диссертации

1. Сейфаддинова М.С. Определение активности АМФ-дезаминазы в печени крыс при остром отравлении газовым конденсатом // Тезисы докл. 56-й научн. конф. Молодых ученых Дагестанской государственной медицинской академии. - Махачкала, 2002. – С. 135-136.

2. Сейфаддинова М.С. Особенности катаболизма адениловой кислоты в печени крыс при действии газоконденсатной смеси // Материалы межд. научной конф. «Биохимия – медицине». Юбилейный вып., Махачкала, 2002. – С. 71-73.

3. Нагиев Э.Р., Сейфаддинова М.С., Магомедова М.А. Модификация метода определения нуклеотидов в тканях животных // Материалы 2-й Республ. научно-практ. конф. «Новые технологии в медицине». Изд-во Даггосмедакадемии. - Махачкала, 2003. – С. 341-343.

4. Нагиев Э.Р., Сейфаддинова М.С. Определение активности ферментов – важнейший аспект в диагностике патологических процессов // Материалы региональной научно-практической конференции «Диагностика – специфическая форма познания патологических процессов». - Махачкала, 2004. – С.154-157.

5. Сейфаддинова М.С., Нагиев Э.Р. Некоторые биохимические критерии резистентности организма к экстремальным факторам окружающей среды // Сб. научных работ «Актуальные проблемы биологии». - Т. 3, №1, Томск, 2004. – С. 96 – 97.

6. Нагиев Э.Р., Дадашев М.Н., Сейфаддинова М.С. Воздействие экстремальных факторов на метаболизм и некоторые пути направленной

коррекции // Журн. «Оборонный комплекс – научно-техническому прогрессу России». – Москва, 2004, № 3. – С. 42 – 45.

7. Сейфаддинова М.С. Содержание адениловых нуклеотидов в печени крыс после острого отравления газоконденсатной смесью //Сборник статей «Новые технологии в медицине». – Изд-во ДГМА. – Махачкала, 2004. – С. 204 – 206.

8. Сейфаддинова М.С., Нагиев Э.Р. Исследование активности прямой и обратной аденилаткиназной реакции в сыворотке крови отравленных крыс //Сборник статей «Новые технологии в медицине». – Изд-во ДГМА. – Махачкала, 2004. – С.211-214.

9. Сейфаддинова М.С., Нагиев Э.Р., Луговец В.М. Активность ключевых ферментов обмена адениловых нуклеотидов в печени крыс //Материалы VII-й междуна. конф. «Циклы». – Ставрополь. – СевКавГТУ, 2005. – С. 61-64.

10. Сейфаддинова М.С. Обмен адениловых нуклеотидов в тканях крыс при действии газового конденсата //Тезисы докл. 57-й научн. конф. Молодых ученых Даггосмедакадемии. – Изд-во ДГМА. – Махачкала, 2005. – с. 111-112.

11. Нагиев Э.Р., Сейфаддинова М.С. Исследование активности 5'-нуклеотидазы в печени крыс, отравленных газоконденсатной смесью //Сборник научных трудов ЦНИЛа ДГМА. – Юбилейный вып. – Махачкала, 2005. – 95-97.

12. Нагиев Э.Р., Сейфаддинова М.С. Метаболизм адениловых нуклеотидов при действии экстремальных факторов// Экология промышл. производства. – межотр. науч-практ. журнал: Москва, 2005. – вып. 1. – с. 49-51.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

ГК – газовый конденсат

ГКС – газоконденсатная смесь

АТФ – аденозинтрифосфорная кислота

АДФ – аденозиндифосфорная кислота

АМФ – аденозинмонофосфорная кислота

цАМФ – циклический АМФ

5'-Н - 5' - нуклеотидаза

НАД – никотинамидадениндинуклеотид

НАДФ – никотинамидадениндинуклеотидфосфат.

НМФ – нуклеозидмонофосфат

НДФ – нуклеозиддифосфат

НТФ – нуклеозидтрифосфат

ФРПФ – фосфорибозилпирофосфат

Pi (Ф_n) - неорганический фосфат

PP - пирофосфат

ТХУ – трихлоруксусная кислота

ФАД - флавинадениндинуклеотид

ФМН - флавинаденинмононуклеотид

КоА - коэнзим А

ТПФ - тиаминопирофосфат

ПДК – предельно допустимая концентрация

Формат 60x84. 1/16. Печать ризографная. Бумага №1. Гарнитура Таймс.
Усл.п.л. - 1 изд. п.л. - 1 Заказ - 140 - 05 Тираж 100 экз.
Подписано в печать 27.04.05. Отпечатано в ООО «Деловой Мир»
Махачкала, ул.Коркмасова, 35а

№ - 89 16

РНБ Русский фонд

2006-4

15493