

БИОХИМИЯ

УДК 591.133:577.15:599.723.2

ИЗМЕНЕНИЕ КАТАЛИТИЧЕСКИХ ХАРАКТЕРИСТИК АЛКОГОЛЬДЕГИДРОГЕНАЗЫ ПРИ ВВЕДЕНИИ В ФЕРМЕНТАТИВНУЮ СИСТЕМУ ФАРМПРЕПАРАТОВ ПИРАЦЕТАМ, ЗОРЕКС И УНИТИОЛ

Г.П. Лапина, Н.В. Парфентьева

Тверской государственный университет, Тверь

В условиях оптимального соотношения концентраций компонентов реакционной среды, а именно АДГ, этанола, НАД, Пирацетама, Зорекса и Унитиола, рассчитаны и проанализированы ферментативные параметры. Найдены оптимальные для функционирования АДГ условия применения Пирацетама, Зорекса и Унитиола, которые могут служить практическими рекомендациями при лечении больных хроническим алкоголизмом.

Ключевые слова: *никотинамидадениндинуклеотид (НАД), алкогольдегидрогеназа (АДГ), печень лошади, каталитические параметры, константа Михаэлиса (K_m), константа каталитическая ($K_{кат}$), максимальная скорость (V_{max}), активация*

Введение. Известно, что алкогольдегидрогеназа – фермент класса оксидоредуктаз (1.1.1.1), катализирующий процессы окисления никотинамидадениндинуклеотидом первичных алифатических спиртов в соответствующие альдегиды. Источниками алкогольдегидрогеназы служат ткани животных (например, печень лошади), грибы, дрожжи, бактерии; возможно нахождение фермента и в других источниках. Наиболее доступными, стабильными и активными ферментами являются алкогольдегидрогеназы, выделенные из дрожжей, а также печени лошади (Авилова и др., 2001; Родионова, Сметанникова, 2006а, б).

В практической медицине довольно широко используются фармпрепараты Пирацетам и Зорекс, но эффективность их применения определяется знанием молекулярно-кинетического механизма их действия на фермент АДГ, который не исследован (Лапина, Сметанникова, 2007; Лапина, Золотарева, 2009).

Целью настоящей работы явилось исследование изменения каталитических характеристик алкогольдегидрогеназы печени лошади при введении в ферментативную систему фармпрепаратов Пирацетама, Зорекса и Унитиола.

Методика. В качестве возможного регулятора активности алкогольдегидрогеназы изучены фармпрепараты Пирацетам, Зорекс и Унитиол (Буров, Ведерникова, 1985). Для изучения каталитической

реакции в спектрофотометрическую кювету помещали поочередно 0.1 мл одного из фармпрепаратов ($0,5 \times 10^{-2} \text{M}$, $1,5 \times 10^{-2} \text{M}$, $2,5 \times 10^{-2} \text{M}$, $4,5 \times 10^{-2} \text{M}$, $5,5 \times 10^{-2} \text{M}$); 0,1 мл раствора субстрата НАД ($1,5 \times 10^{-2} \text{M}$); 0,1 мл раствора субстрата этилового спирта ($1,5 \cdot 10^{-2} \text{M}$); 0,1 мл АДГ ($2,4 \times 10^{-4} \text{M}$). Содержимое кюветы быстро перемешивали и определяли оптическую плотность (D) при длине волны 345 нм в течение 5 мин через каждые 15 с на спектрометре «Spocol». Контрольная кювета не содержала субстрата (субстрат заменяли бидистиллированной водой).

Ферментативная реакция сопровождалась восстановлением НАД. При окислении спирта происходило восстановление НАД до НАД·Н₂ (на 1 моль окисленного спирта образуется 1 моль НАД·Н₂). Его количество определяли спектрофотометрически при $\lambda=345 \text{nm}$. Конечным продуктом ферментативной реакции являлся уксусный альдегид (Кочетов, 1994; Лапина, Золотарева, 2008а).

Объект исследования – фермент алкогольдегидрогеназа печени лошади – коммерческий препарат («Reanal», Венгрия).

Активность рассчитывали исходя из данных изменения оптической плотности D во времени хода ферментативной реакции, после чего строились кинетические кривые (D - t) (Лапина, Золотарева, 2008б).

Результаты и обсуждение. В условиях оптимального соотношения концентраций всех компонентов реакционной среды, а именно, АДГ, этанола, НАД, Пирацетама, Зорекса и Унитиола, были рассчитаны ферментативные параметры (табл. 1).

Таблица 1
Значения каталитических характеристик АДГ
при введении фармпрепаратов Пирацетама, Зорекса и Унитиола

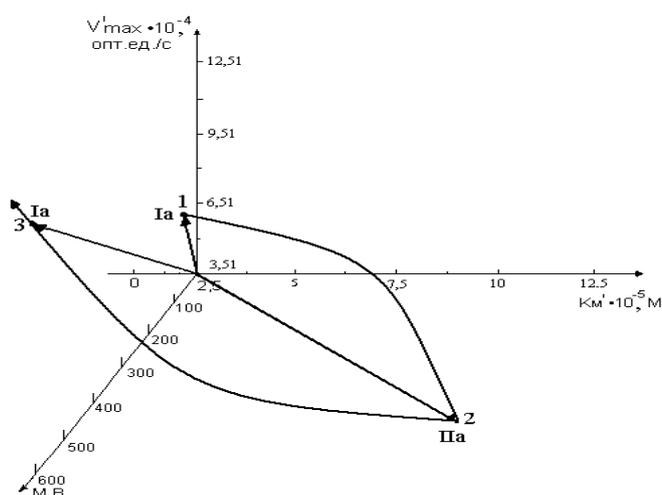
| Ферментативные системы | Эффекторы | Молекулярная масса | Km, 10^{-5}M | Vmax, 10^{-4} опт.ед./с | Тип активации |
|------------------------|-----------|--------------------|------------------------|---------------------------|---------------|
| 1 | Контроль | – | $2,51 \pm 0,17$ | $3,51 \pm 0,17$ | – |
| 3 | Пирацетам | 142,16 | $5,03 \pm 0,39$ | $20,01 \pm 0,39$ | Па |
| 4 | Зорекс | 630,09 | $2,03 \pm 0,17$ | $6,62 \pm 0,17$ | Ia |
| 5 | Унитиол | 124,23 | $2,12 \pm 0,16$ | $6,34 \pm 0,16$ | Ia |

Из табл. 1 видно, что Пирацетам в большей степени влияет на образование фермент-субстратного комплекса. Суммарный наблюдаемый эффект – ослабление взаимодействия фермента и субстрата при введении Пирацетама. Именно в этих условиях активность алкогольдегидрогеназы максимальна. Следовательно, при добавлении Пирацетама этанол с участием АДГ утилизируется наиболее эффективно.

Рассчитанные ферментативные параметры и соответственно

типы активации фермента для препаратов Пирацетам, Зорекс и Унитиол в ферментативных системах имеют разнонаправленный характер изменений: в случае Пирацетама – тип активации Па, а в случае Зорекса и Унитиола – тип активации Ia. Это не позволяет провести сопоставление найденных значений ферментативных параметров АДГ, так как типы активации различны. Поэтому наряду с первым и вторым способами определения ферментативных параметров был применен ещё один способ анализа значений ферментативных параметров – метод векторного построения полученных экспериментальных данных в $K_m' V'$ - системе координат.

На основе данных табл. 1 построили кривую течения – геометрический «портрет» ферментативной реакции, катализируемой АДГ печени лошади (рисунок).



Р и с у н о к . Пространственная кривая АДГ-реакции в трехмерной $K_m' V'$ – системе координат, активируемой препаратами Зорекс (3), Унитиол (1) и Пирацетам (2)

На основе рисунка рассчитали дополнительный ферментативный параметр – интенсивность активации (длины $p\vec{I}a_{(1)}$ -, $p\vec{I}a_{(2)}$ -, $p\vec{I}a_{(3)}$ -векторов) для трех обсуждаемых ферментативных систем и сравнили этот параметр для изученных ферментативных систем (табл. 2).

Таблица 2

Значения длин $p\vec{I}a_{(1)}$ -, $p\vec{I}a_{(2)}$ -, $p\vec{I}a_{(3)}$ -векторов

| Препарат | Ферментативные системы | Длины \vec{p} - векторов, у. е. |
|-----------|------------------------|-----------------------------------|
| Пирацетам | 3 | 2,50 |
| Зорекс | 4 | 0,48 |
| Унитиол | 5 | 0,39 |

Именно этот интегральный параметр несет обобщенную количественную информацию об интенсивности активации фермента.

Самым действенным для АДГ среди изученных фармпрепаратов является Пирацетам (2,50 у. е.). Эффективность фармпрепаратов Зорекс и Унитиол в сравнении с Пирацетамом в 5,2 раз ниже. Кроме того, данные табл. 2 указывают на преобладающий вклад компонента Зорекса в сравнении с Унитиолом. Обращает на себя внимание то, что при введении в ферментативную систему изученных фармпрепаратов (Пирацетама, Зорекса и Унитиола) меняются не только тип активации, но и механизм изучаемой каталитической реакции, а также её интенсивность.

Заключение. Таким образом, впервые разработанный и апробированный многоэтапный научно-методический подход позволил детально изучить ферментативное поведение АДГ при добавлении Пирацетама, Зорекса и Унитиола и может служить основой для изучения других фармпрепаратов.

Сисок литературы

- Авилова Т.В., Егорова О.А., Новикова Т.В.* 2001. Условия биосинтеза, выделение и свойства NAD-зависимой алкогольдегидрогеназы // Биохимия. Т. 51. Вып. 10. С. 1673-1681.
- Буров Ю.В., Ведерникова Н.Н.* 1985. Нейрохимия и фармакология алкоголизма. М.: Медицина. 240 с.
- Кочетов Г.А.* Практическое руководство по энзимологии. - М.: Высшая школа, 1998. 267 с.
- Лапина Г.П., Золотарева Н.В.* 2009. Пирацетам – регулятор каталитической активности алкогольдегидрогеназы печени лошади // Вестник ТвГУ. Сер. Биол. экол. Вып. 11. № 2. С. 59-65.
- Лапина Г.П., Золотарева Н.В.* 2008а. Регуляция активности алкогольдегидрогеназы печени лошади с использованием молекулярно-кинетических механизмов // Тез. докл. VII науч. конф. аспирантов и студентов хим. ф-та. Тверь: ТвГУ. С. 45.
- Лапина Г.П., Золотарева Н.В.* 2008б. Субстратная специфичность алкогольдегидрогеназы // Тез. докл. XVII Рос. молодеж. науч. конф., посвящ. 90-летию со дня рождения проф. В.А. Кузнецова. Екатеринбург. 2008. С. 165.
- Лапина Г.П., Сметанникова Н.В.* 2007. Регуляция активности алкогольдегидрогеназы печени лошади пирацетамом // Состояние воды в биологических и модельных системах: тез. докл. I Междунар. конф. Тверь: ТГМА. С. 173.
- Родионова Г.Е., Сметанникова Н.В.* 2006а. Изучение ферментативных параметров алкогольдегидрогеназы // Проблемы теоретической и экспериментальной химии: тез. докл. XVI Рос. молодеж. науч. конф., посвящ. 85-летию со дня рождения проф. В.П. Кочергина. Екатеринбург: УГУ. С. 64.

Родионова Г.Е., Сметанникова Н.В. 2006б. Ферментативные характеристики алкогольдегидрогеназы // Тез. докл. V науч. конф. аспирантов и студентов хим. ф-та, посвященной 35-летию Тверского государственного университета. Тверь: ТвГУ. С. 30.

SHIFTS IN CATALYTIC PARAMETERS OF ALCOHOL DEHYDROGENASE UNDER THE APPLICATION OF PIRACETAM, ZOREX AND UNITOL TO THE ENZYME SYSTEM

G.P. Lapina, N.V. Parfentyeva

Tver State University, Tver

Enzyme parameters under the optimal concentrations of alcohol dehydrogenase, ethanol, nicotinamide adenine dinucleotide, Piracetam, Zorex and Unitiol have been calculated and analyzed. Optimal conditions for the application of Piracetam, Zorex and Unitiol are found. They can be used in treatment of chronic alcoholism.

Keywords: *nicotinamide adenine dinucleotide (NAD), alcohol dehydrogenase (ADH), horse liver, catalytic parameters, Mikhaelis's (Km) constant, catalytic constant (Ccat), the maximum speed (Vmax), activation*

Об авторах:

ЛАПИНА Галина Петровна – доктор химических наук, профессор, заведующая кафедрой физико-химической экспертизы биоорганических соединений, ФГБОУ ВПО «Тверской государственный университет», 170100, Тверь, ул. Желябова, д. 33, e-mail: Galina.Lapina@tversu.ru.

ПАРФЕНТЬЕВА Наталья Владимировна – кандидат биологических наук, доцент кафедры физико-химической экспертизы биоорганических соединений, ФГБОУ ВПО «Тверской государственный университет», 170100, Тверь, ул. Желябова, д. 33, e-mail: Natas2006@mail.ru.

Лапина Г.П. Изменение каталитических характеристик алкогольдегидрогеназы при введении в ферментативную систему препаратов пирacetам, зорекс и унитол / Г.П. Лапина, Н.В. Парфентьева // Вестн. ТвГУ. Сер. Биология и экология. 2014. № 1. С. 75-79.