

УДК 612.1:636.7

## СУПРАМОЛЕКУЛЯРНЫЕ ФЕРМЕНТНЫЕ СИСТЕМЫ КРОВИ СОБАК В КЛИНИЧЕСКОЙ ДИАГНОСТИКЕ

С.Ю. Зайцев, В.И. Максимов, Т.В. Бардюкова

(ФГОУ ВПО “Московская государственная академия ветеринарной медицины и биотехнологии им. К.И. Скрябина”; e-mail: szaitsev@mail.ru)

**Изучена активность ряда ферментов (“ферментный профиль”), важных для клинической диагностики, в сыворотке крови животных и показано, что активность АЛТ выше на 55–221%, АСТ – на 85–285%, ГГТ – на 168–234%, ЛДГ – в 6,4–7,4 раза, КК – в 2,3–3,1 раза у собак 6–11 лет с хронической сердечной недостаточностью по сравнению со здоровыми животными того же возраста. На основании анализа “изоферментного профиля” ЛДГ можно выстроить следующий ряд активности:  $ЛДГ_1 > ЛДГ_2 > ЛДГ_4 > ЛДГ_3 > ЛДГ_5$  для собак всех возрастов при ХСН.**

Проблема создания, изучения и применения супрамолекулярных биохимических систем (СБС) с заданными свойствами, представляющих собой высокоорганизованные комплексы белков, липидов и других биологически активных соединений, является современной и находится “на стыке” биологической и биоорганической химии; био- и нанотехнологии; медицины и ветеринарии.

Многие ферменты, детектируемые в плазме крови и широко применяемые для диагностики физиолого-биохимического статуса животных, можно рассматривать как “эндогенные” СБС определенных уровней организации, поскольку они состоят из нескольких полипептидных цепей (субъединиц), которые, комбинируясь различными способами, образуют четвертичную структуру фермента [1–3]. Так, лактатдегидрогеназа (ЛДГ) состоит из 4 субъединиц 2 типов (Н и М); креатинкиназа (КК) – из 2 субъединиц 2 типов (В и М). Более того, у животных обнаружено 5 изоформ ЛДГ и 3 изоформы КК [1–3]. Все эти ферменты и их изоформы в крови животных составляют характерный набор (“ферментные” СБС или “ферментный профиль”), который зависит от патологических изменений органов и тканей животных, что явилось нашей базовой моделью для биохимических исследований крови животных и совершенствования биохимических методов анализа.

Целью данной работы было изучение активности ряда ферментов, важных для клинической диагностики, в сыворотке крови животных и выявление корреляции полученного “ферментного профиля” крови у собак старшего возраста с изменениями в деятельности сердца.

### Материалы и методы

Для решения поставленных задач в работе использовали 37 собак, которых разделили на 2 группы: 1 группа – клинически здоровые собаки, 2 группа – собаки, страдающие хронической сердечной недостаточностью (ХСН, III функциональный класс). Диагноз ХСН устанавливали в ветеринарной клинике «Центр» (г. Москва) [4]. Собаки всех групп были разделены на три подгруппы в зависимости от возраста: 6–7, 8–9 и 10–11 лет. Все животные подбирались по принципу аналогов: кобели, пудели, собаки старшего возраста и живой массой 15–20 кг. Материалом для исследования служила сыворотка и плазма крови. Кровь у всех групп собак брали в утренние часы натощак. Плазму хранили при 4–8°C в течение 6 ч. Для хранения в течение более длительного срока плазму замораживали и хранили при –20°C. Сыворотку крови получали методом отстаивания цельной крови и ретракции кровяного сгустка с последующим центрифугированием (при необходимости). Центрифугирование сыворотки проводили при скорости 2000 об/мин в течение 10–15 мин [4].

Для определения общей активности следующих ферментов: аланинаминотрансферазы (АЛТ), аспаратаминотрансферазы (АСТ), гаммаглутамилтрансферазы (ГГТ), лактатдегидрогеназы (ЛДГ), креатинкиназы (КК) в сыворотке крови собак использовали стандартный биохимический метод [5], основанный на спектрофотометрическом изучении смеси сыворотки крови и соответствующих реагентов после инкубирования при температуре 37°C в течение 1–3 мин. Для определения изоферментного спектра ЛДГ и КК использовали метод электрофореза в полиакриламидном

геле при стандартном режиме [4–6]. Содержание каждого изофермента в процентах от общей активности ЛДГ или КК ( $X, \%$ ) определяли как отношение пика определяемой фракции изофермента к сумме всех пиков изоферментов [7].

Статистическую обработку результатов проводили с помощью пакета программ “статистика” для “Windows”. Достоверность различий результатов относительно друг друга и относительно нормы оценивали по стандартному критерию Стьюдента, на уровне значимости 0,95.

### Результаты и их обсуждение

“Ферментный профиль” крови собак следует рассматривать как один из примеров СБС, поскольку для получения характеристики физиолого-биохимического статуса животных при многих заболеваниях требуется исследование совокупности основных ферментов в крови животных, которые составляют специфический набор (“ферментный профиль”), зависящий от нормального состояния или патологических изменений органов и тканей конкретного животного. Наличие у животных изоформ ряда ферментов, используемых в клинической диагностике, значительно усложняет характерный “ферментный профиль” крови животных и является дополнительным подтверждением правильности его рассмотрения как СБС высокого уровня организации.

Полученные данные по активности ферментов сыворотки крови здоровых и больных собак (“ферментный профиль” крови по активности ферментов АСТ, АЛТ, ГГТ, ЛДГ и КК) приведены в табл. 1.

У здоровых собак (контрольная группа) отмечено существенное изменение активности ряда ферментов

в крови с возрастом (табл. 1): у собак 8–9 лет активность АЛТ была ниже в среднем на 23%, активность АСТ – на 24%, активность ГГТ – на 13%, по сравнению с подгруппой собак 6–7 лет; тогда как активность ЛДГ была ниже в среднем на 6%, активность КК даже несколько увеличивалась по сравнению с подгруппой собак 6–7 лет (но изменения активности для двух последних ферментов нельзя считать достоверными). Более четкая картина наблюдалась для здоровых собак самой старшей возрастной подгруппы (10–11 лет), у которых отмечено снижение активности АЛТ на 53%, активности АСТ – на 50%, активности ГГТ – на 26%, тогда как значения активности ЛДГ и КК изменялись незначительно (в пределах ошибки эксперимента) по сравнению с подгруппой собак 6–7 лет (табл. 1). Обобщая полученные данные, можно сделать вывод, что “ферментный профиль” у здоровых собак изменяется с возрастом следующим образом: активность ферментов АЛТ, АСТ, ГГТ достоверно и существенно снижается с увеличением возраста животных, тогда как активность ЛДГ и КК изменялась мало и недостоверно.

При хронической сердечной недостаточности (ХСН) различной этиологии у собак всех возрастных подгрупп выявлено достоверное повышение активности всех изученных ферментов (табл. 2). Так, активность АЛТ была выше на 55–221% у собак 6–11 лет с ХСН, активность АСТ была выше на 85–285% у собак 6–11 лет с ХСН, активность ГГТ была выше на 168–234% у собак 6–11 лет с ХСН (табл. 2), по сравнению с контролем для той же возрастной подгруппы (табл. 1). Особенно значительно в крови собак с ХСН повышалась активность двух ферментов, представленных в табл. 2: активность ЛДГ была

Таблица 1

Активность ( $A, E/l$ ) ферментов в крови здоровых собак ( $n$ ) старших возрастных групп (6–11 лет)

Ферменты	$n$	$A (E/l), 6-7$ лет	$n$	$A (E/l), 8-9$ лет	$n$	$A (E/l), 10-11$ лет
АЛТ	5	34,6±1,9	5	26,6±1,7 <sup>#</sup>	5	16,2±1,7 <sup>###</sup>
АСТ		32,4±1,1		24,5±1,4 <sup>##</sup>		16,1±1,2 <sup>##</sup>
ГГТ		4,7±0,2		4,1±0,3 <sup>#</sup>		3,5±0,2 <sup>##</sup>
ЛДГ		120±9		113±8		116±12
КК		52±5		61±5		55±5

Примечание. Достоверность разницы по отношению к возрасту 6–7 лет: # –  $P < 0,05$ ; ## –  $P < 0,01$ ; ### –  $P < 0,001$ .

Т а б л и ц а 2

## Активность (А, Е/л) ферментов в крови собак (n) старших возрастных групп (6–11 лет), страдающих ХСН

Ферменты	n	A (Е/л), 6–7 лет	n	A (Е/л), 8–9 лет	n	A (Е/л), 10–11 лет
АЛТ	7	53,7±1,8**	9	54±2***	6	52±2***
АСТ		60±2***		63±3***		62±2***
ГГТ		12,6±0,4***		12,6±0,9***		11,7±0,7***
ЛДГ		1009±79***		837±76***		965±65***
КК		213±17***		204±14***		226±19***

Примечание. Достоверность разницы по отношению к контролю (табл. 1): \* – P<0,05; \*\* – P<0,01; \*\*\* – P<0,00.

выше в среднем в 7,4, 6,4 и 7,3 раза, а активность КК – в 3,1, 2,3 и 3,1 раза у собак 6–7, 8–9 и 10–11 лет с ХСН (табл. 2) по сравнению с активностью для этих ферментов у здоровых собак той же возрастной подгруппы (табл. 1).

Если сравнивать изменение активности для всех изученных ферментов в возрастном аспекте у собак при хронической сердечной недостаточности, то относительно небольшие отличия в активности АЛТ, АСТ и ГГТ находились практически в пределах ошибки измерений (табл. 2), т.е. эти изменения нельзя считать достоверными. Трудно также считать достоверными более значительные колебания в активности ЛДГ и КК у собак при хронической сердечной недостаточности (табл. 2), что связано с огромными «диспропорциональными» изменениями в активности различных изоферментных форм ЛДГ и КК, как будет представлено ниже.

Для правильного использования полученных данных в клинической диагностике, по нашему мнению, необходимо также детальное изучение изоферментного спектра ряда указанных ферментов, например ЛДГ, в крови собак в норме (табл. 3) и при ХСН (табл. 4).

Из приведенных в табл. 3 данных следует, что наибольшая активность в норме у собак присуща изоферменту ЛДГ<sub>4</sub> (от 44,9 до 42,4 Е/л), а наименьшая – изоферменту ЛДГ<sub>5</sub> (от 5,3 до 4,6 Е/л), для здоровых животных всех возрастов. В целом на основании данных табл. 3 можно выстроить следующий ряд: ЛДГ<sub>4</sub> > ЛДГ<sub>1</sub> > ЛДГ<sub>2</sub> > ЛДГ<sub>3</sub> > ЛДГ<sub>5</sub> для здоровых животных всех возрастов, поскольку небольшое уменьшение активности всех фракций ЛДГ с возрас-

том является незначительным и недостоверным для всех возрастных подгрупп (табл. 3).

Как показали наши исследования, у больных животных активность всех изоферментов ЛДГ значительно повышалась (табл. 4), однако отсутствуют достоверные отличия для изоферментов ЛДГ с возрастом. Так, при ХСН у собак активность изоферментов ЛДГ<sub>1</sub> повышалась в среднем в 17,2, 15,1 и 15,3 раза; ЛДГ<sub>2</sub> – в 14,1, 11,9 и 16,8 раза; ЛДГ<sub>3</sub> – в 2,0, 1,7 и 2,0 раза; ЛДГ<sub>4</sub> – в 1,2, 1,4 и 1,5 раза; ЛДГ<sub>5</sub> – в 2,1, 2,3 и 2,4 раза соответственно у собак 6–7, 8–9 и 10–11 лет с ХСН (табл. 4) по сравнению с активностью для этих изоферментов у здоровых собак той же возрастной подгруппы (табл. 3).

Из приведенных в табл. 4 данных следует, что наибольшая активность у собак при ХСН присуща изоферментам ЛДГ<sub>1</sub> (от 586 до 485 Е/л) и ЛДГ<sub>2</sub> (от 379 до 258 Е/л), а наименьшая – изоферменту ЛДГ<sub>5</sub> (от 11,3 до 10,4 Е/л), для животных всех возрастов. В целом на основании данных табл. 4 для собак всех возрастов при ХСН можно выстроить следующий ряд:

$$\text{ЛДГ}_1 > \text{ЛДГ}_2 > \text{ЛДГ}_4 > \text{ЛДГ}_3 > \text{ЛДГ}_5$$

На основании полученных выше рядов для фракций ЛДГ в крови собак в норме и при ХСН можно предложить диагностический параметр – отношение суммарной активности изоферментов четырех фракций (ЛДГ<sub>1</sub> + ЛДГ<sub>2</sub> + ЛДГ<sub>3</sub> + ЛДГ<sub>5</sub>) к активности фракции ЛДГ<sub>4</sub>. Этот параметр, который можно назвать ЛДГ – изоферментным параметром (ЛДГ–ИП), для собак в возрасте 6–7 лет равен 1,7 для здоровых животных и 17,6 для собак при ХСН, т.е. увеличивается практически в 10 раз, что достаточно наглядно

Т а б л и ц а 3

**Активность фракций ЛДГ (Е/л) в сыворотке крови здоровых собак (n) старших возрастных подгрупп**

Фракции ЛДГ	n	A (Е/л), 6–7 лет	n	A (Е/л), 8–9 лет	n	A (Е/л), 10–11 лет
ЛДГ <sub>1</sub>	5	34,1±2,8	5	32,6±2,7	5	31,6±2,9
ЛДГ <sub>2</sub>		23,5±2,3		21,7±2,9		22,6±3,1
ЛДГ <sub>3</sub>		12,3±0,9		11,5±0,3		12,2±0,8
ЛДГ <sub>4</sub>		44,9±2,9		42,4±2,1		44,4±4,8
ЛДГ <sub>5</sub>		5,3±0,3		4,6±0,4		4,8±0,7

Т а б л и ц а 4

**Активность фракций ЛДГ (Е/л) в сыворотке крови собак (n) старших возрастных групп, страдающих ХСН**

Фракции ЛДГ	n	A (Е/л), 6–7 лет	n	A (Е/л), 8–9 лет	n	A (Е/л), 10–11 лет
ЛДГ <sub>1</sub>	7	586±41**	9	492±43**	6	485±32**
ЛДГ <sub>2</sub>		333±31**		258±28**		379±29**
ЛДГ <sub>3</sub>		24,6±2,5**		20,0±1,9**		24,2±2,4**
ЛДГ <sub>4</sub>		54,4±3,6**		57,4±3,1**		64,7±4,5**
ЛДГ <sub>5</sub>		11,3±0,5**		10,4±0,5**		11,7±0,5**

*Примечание.* Достоверность разницы по отношению к контролю (табл. 3): \* – P<0,05; \*\* – P<0,01; \*\*\* – P<0,001.

для клинической диагностики такой патологии. Активность фракции ЛДГ<sub>4</sub> была выбрана для сравнительного анализа по двум причинам: во-первых, она является максимальной у здоровых собак, во-вторых, она повышается очень незначительно (только на 20–50%) у собак при ХСН, тогда как значения активности всех других фракций ЛДГ повышаются в несколько раз.

При биохимическом анализе крови человека данные по изоферментному профилю ЛДГ приводят в процентах. В нашем случае такая обработка приведет к следующим данным для собак в возрасте 6–7 лет – здоровые животные: ЛДГ<sub>1</sub> – 28,4%, ЛДГ<sub>2</sub> – 19,6, ЛДГ<sub>3</sub> – 10,2, ЛДГ<sub>4</sub> – 37,4, ЛДГ<sub>5</sub> – 4,4%; а животные с ХСН: ЛДГ<sub>1</sub> – 58,1, ЛДГ<sub>2</sub> – 33,0, ЛДГ<sub>3</sub> – 2,4, ЛДГ<sub>4</sub> – 5,4, ЛДГ<sub>5</sub> – 1,1%. По нашему мнению, параметр ЛДГ–ИП является более наглядным для сравнительного анализа клинико-биохимических данных для данной патологии у животных.

Таким образом, для физиолого-биохимической оценки адаптации организма собак в онтогенезе при изменении деятельности сердца необходимо исследовать в крови “ферментные СБС”, а именно общую активность АЛТ, АСТ, ГГТ, ЛДГ, КК и их изоферментный спектр, что не отменяет возможность определения и ряда других ферментов и соединений. Это позволяет диагностировать деструктивные процессы в миокарде, вызванные хронической сердечной недостаточностью.

Важным клинико-биохимическим параметром крови животных считается коэффициент отношения АСТ:АЛТ [5], который у человека в норме должен быть ~1,3–1,4. По данным табл. 1, этот коэффициент равен 0,94 (у здоровых собак 6–7 лет), 0,92 (у собак 8–9 лет) и 1,0 (у собак 10–11 лет); а у собак с ХСН, по данным табл. 2, он равен 1,1 (6–7 лет) или 1,2 (8–9 и 10–11 лет). Эти изменения незначительны

и недостоверны, тогда как абсолютные изменения активности АСТ и АЛТ у собак с ХСН достоверно выше, чем у здоровых. Поэтому нами предложено использовать ряд обобщенных коэффициентов, например, отношение суммарной активности трех ферментов – трансаминаз (АСТ, АЛТ и ГГТ) при патологии (ХСН) к контролю (здоровым животным), что составляет: 1,8 – для собак 6–7 лет, 2,3 – для собак 8–9 лет и 3,5 – для собак 10–11 лет. Еще более показательным является отношение суммарной активности всех 5 ферментов (коэффициент СБС) при патологии (ХСН) к контролю (здоровым животным),

что составляет: 5,5 – у собак 6–7 лет, 5,1 – у собак 8–9 лет и 6,4 – у собак 10–11 лет.

Таким образом, все приведенные выше данные, свидетельствуют о том, что “ферментный профиль” крови собак следует рассматривать как один из примеров СБС высокого уровня организации. Наиболее перспективным является использование всей совокупности полученных данных по ферментам и их изоформам как единой супрамолекулярной биохимической системы для оценки физиолого-биохимического статуса собак в возрастной динамике и при хронической сердечной недостаточности.

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Уайт А., Хендлер Ф., Смит Э., Хилл Р., Леман И. Основы биохимии. М., 1981.
2. Мари Р., Греннер Д., Мейес П., Родуэлл В. Биохимия человека. М., 1993.
3. Зайцев С.Ю., Конопатов Ю.В. Биохимия животных. Фундаментальные и клинические аспекты. СПб., 2005.
4. Бардюкова Т.В., Зайцев С.Ю., Максимов В.И. // Ветеринарная медицина. 2006. 2–3. С. 28.
5. Бурмистров Е. Н. Клиническая лабораторная диагностика. Основные исследования и показатели. М., 2005.
6. Пустовалова Л. М. Практические работы по биохимии. М., 2004.
7. Корочкин Л. И., Серов О. Л., Пудовкин А. И. Генетика изоферментов. М., 1977.

Поступила в редакцию 23.11.07

## SUPRAMOLECULAR ENZYME SYSTEMS OF DOG BLOOD IN CLINICAL DIAGNOSTICS

S.Yu. Zaitsev, V.I. Maksimov, T.V. Bardukova

(FGOY VPO “Moscow State Academy of veterinary medicine and biotechnology)

**The activity of some enzymes (“enzyme profile”), important for the clinical diagnostics, in the serum of animals was studied. It was shown that the activity of ALT higher on 55–221%, AST – on 85–285%, GGT – on 168–234%, LDG – in 6,4...7,4 times, KK – in 2,3–3,1 times for dogs of 6–11 years with cronical heart diseases (CHD), as compared to the healthy animals of the same ages. The following row of activities:  $LDG_1 > LDG_2 > LDG_4 > LDG_3 > LDG_5$  was obtained for the dogs with CHD by analysis of the “isoenzyme profile”.**