

УДК 577.121+612.392.6+615.279

ВПЛИВ УНІТІОЛУ НА СТАН ЕНЕРГЕТИЧНОГО МЕТАБОЛІЗМУ У ЩУРІВ ПРИ ВВЕДЕННІ ХЛОРИДУ КОБАЛЬТУ

С. М. ОХРИМЕНКО, П. А. КАЛІМАН

Харківський національний університет імені В. Н. Каразіна,
кафедра біохімії

Ключові слова: кобальт, унітіол, глюкоза, глікоген, вільні жирні кислоти, амінотрансферази, лактатдегідрогеназа

Вивчено вплив хлориду кобальту та унітіолу на показники енергетичного метаболізму — вміст глюкози та вільних жирних кислот в крові, глікогену в печінці, а також на активність ферментів гліколізу та глюконеогенезу — лактатдегідрогенази та амінотрансфераз — в органах щурів, а також в сироватці крові. Встановлено, що введення тваринам хлориду кобальту спричинює розвиток стрес-реакції, що відображується в посиленні процесів глікогенолізу та ліполізу, а також глюконеогенезу. Попереднє введення унітіолу лише в деяких випадках призвело до нормалізації зазначених показників. Введення одного унітіолу в деяких випадках спричинювало таку ж дію, як і при введенні стрес-агента — хлориду кобальту. Відзначено високу чутливість серцевого ізоциму лактатдегідрогенази до дії хлориду кобальту і здатність унітіолу впливати на цей показник за умов гіпоксії, що спричинюється введенням хлориду кобальта. Виявлено чутливість лактатдегідрогенази печінки та нирок до дії унітіолу. Дія зазначеного препарату на показники, що вивчалися, скоріш за все, не пряма, а опосередкована системами внутрішньоклітинної регуляції.

ВСТУП

Сполуки важких металів, що потрапляють до організму з повітрям, водою, їжею, активують процеси вільнорадикального окислення, що супроводжується розвитком оксидативного стресу [2, 5, 12] і порушенням внутрішньоклітинного гомеостазу. Відновлення останнього потребує посилення процесів енергозабезпечення клітин — гліколізу, ліполізу і глюконеогенезу [3]. Для попередження або послаблення дії важких металів на організм широко застосовують антиоксиданти, серед яких значне місце посідають тіолові сполуки. Однак вивчення механізмів їх дії частіш за все пов'язано зі складовими системами антиоксидантного захисту, в той час як функціонування багатьох метаболічних шляхів залишається недостатньо дослідженим. До того ж біологічні ефекти антиоксидантів залежать від їх дози, що вводиться в організм. Метою даного дослідження було вивчення дії унітіолу на показники енергетичного метаболізму при ок-

сидативному стресі, спричиненому введенням хлориду кобальту, в дозі, що позитивно впливає на складові системи антиоксидантного захисту в цих умовах [8].

МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ

Для дослідів використовували самців щурів лінії Вістар масою 160–200 г, що утримувались в стандартних умовах віварію. Хлорид кобальту вводили внутрішньоочеревинно в дозі 3 мг на 100 г маси, унітіол вводили в дозі 25 мг на 100 г маси за 30 хвилин до ін'єкції розчину солі. Тварин брали в експеримент через 4 та 24 години після введення хлориду кобальту, застосовуючи легкий ефірний наркоз. Кров збирали та отримували сироватку, де визначали вміст глюкози, вільних жирних кислот (ВЖК), сечовини, а також активність амінотрансфераз та лактатдегідрогенази (ЛДГ). У крові визначали ступінь гемолізу еритроцитів. В печінці визначали вміст глікогену; в гомогенатах печінки, нирок та серця визначали активність аланін-, аспартат- та тирозинамінотрансфераз (АлАТ, АсАТ, ТАТ), а також активність ЛДГ. В гомогенатах печінки та нирок також визначали вміст сечовини. Вміст глюкози визначали глюкозооксидазним мето-

С. М. Охріменко — асистент кафедри біохімії Харківського національного університету ім. В. Н. Каразіна, к.б.н.

П. А. Каліман — професор кафедри біохімії Харківського національного університету ім. В. Н. Каразіна, д.б.н.

дом за допомогою стандартних наборів, вміст ВЖК — за Duncomb, глікоген — за методом Камр [1]. Ступінь гемолізу еритроцитів визначали за Ягером [15], вміст сечовини — за кольоровою реакцією за допомогою стандартних наборів. Активність амінотрансфераз та ЛДГ визначали за допомогою кольорових реакцій на піруват для АЛАТ, АсАТ та ЛДГ, р-ОФП — для ТАТ [11, 17].

РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

Введення в організм щурів хлориду кобальту спричинувало зниження вмісту глікогену в печінці в обидва досліджувальні строки, що може свідчити про активацію симпато-адреналової системи в організмі та розвиток стрес-реакції. Доказом цього є також підвищення вмісту вільних жирних кислот в сироватці крові за цих умов. Попереднє введення унітіолу запобігало ліполізу, але не гальмувало процес глікогенолізу, а в короткі терміни (4 год.) навіть посилювало його. В цей же період було встановлено значне зниження вмісту глюкози в сироватці крові, що може свідчити про участь унітіолу в активації процесів мобілізації та транспорту глюкози в клітини за умов оксидативного стресу, спричи-

неного хлоридом кобальту. В той же час, введення одного унітіолу через 24 години спричинувало зміни, подібні до дії стрес-агента (табл. 1). Ймовірно, ці зміни спричинив не власне препарат, оскільки період його полувиведення складає 1-5 годин, а ті наслідки, що залишилися після його застосування. Відомо, що основне місце дії унітіолу — кров та міжцелюлярна рідина, оскільки препарат погано проникає в клітини. Показано здатність унітіолу зв'язуватись з різними білками [9, 14, 19], серед яких можна припустити і мембранні, для яких ця речовина може бути агоністом та брати участь в активації каскадних механізмів регуляції внутрішньоклітинних процесів.

Про участь в адаптації до дії хлориду кобальту гіпофізарно-надниркової системи організму свідчить підвищення активності амінотрансфераз в печінці — АсАТ через 4 години, ТАТ — в обидва досліджувальні терміни (табл. 2), оскільки їх індукція контролюється глюкокортикоїдами [10]. Посилення процесів переамінування відображує залучення амінокислот до процесу глюконеогенезу, що доводиться роботами, де встановлено активацію протеолітичних

Таблиця 1

ВПЛИВ ХЛОРИДУ КОБАЛЬТУ ТА УНІТІОЛУ НА ВМІСТ ГЛІКОГЕНУ В ПЕЧІНЦІ, ГЛЮКОЗИ ТА ВІЛЬНИХ ЖИРНИХ КИСЛОТ В СИРОВАТЦІ КРОВІ ЩУРІВ

	контроль	CoCl ₂ 4 год.	CoCl ₂ 24 год.	унітіол + + CoCl ₂ 4 год.	унітіол + + CoCl ₂ 24 год.	унітіол 24 год.
глікоген, г/100 г	2,04±0,21	0,66±0,19*	0,34±0,07*	0,13±0,03*	0,20±0,06*	0,066±0*
глюкоза, ммоль/л	5,93±0,87	5,98±0,65	6,34±0,67	3,49±0,16*	6,02±0,37	4,24±0,30
ВЖК, мкекв/мл	0,54±0,05	0,71±0,04*	0,70±0,06*	0,88±0,28	0,49±0,08	1,14±0,18*

Примітка: тут і далі * — p < 0,05 в порівнянні з контролем

Таблиця 2

ВПЛИВ ХЛОРИДУ КОБАЛЬТУ ТА УНІТІОЛУ НА АКТИВНІСТЬ АЛАТ, АСАТ, ЛДГ ТА ТАТ В ОРГАНАХ ЩУРІВ (МКМОЛЬ ПВК/ ХВ. ТА НМОЛЬ П-ОФП/ ХВ. НА МГ БІЛКА)

органи	контроль	CoCl ₂ 4 год.	CoCl ₂ 24 год.	унітіол + + CoCl ₂ 4 год.	унітіол + + CoCl ₂ 24 год.	унітіол 4 год.	унітіол 24 год.
АЛАТ							
печінка	16,0±1,0	17,0±0,9	13,3±1,3	16,3±0,5	15,8±1,2	13,4±1,4	19,2±1,1*
нирки	6,86±0,46	7,0±0,52	5,59±0,4	7,33±1,45	6,75±0,75	4,8±0,6*	6,8±0,92
серце	11,3±0,4	10,7±0,4	10,1±0,8	12,0±0,7	12,8±0,5*	7,8±0,9*	9,4±1,2
АсАТ							
печінка	16,1±0,6	19,3±1,3*	12,3±1,2*	16,7±0,6	14,0±0,8	11,7±0,8*	16,5±0,9
нирки	15,6±1,2	18,5±1,3	13,0±0,8	16,5±2,2	19,8±0,9*	17,0±1,4	20,8±2,1*
серце	15,1±1,1	16,0±0,4	14,9±1,7	18,2±1,7	18,7±0,7*	17,6±1,9	18,3±0,6*
ТАТ							
печінка	6,38±1,34	12,0±1,18*	15,1±1,24*	18,0±4,1*	6,5±1,51	8,34±3,95	11,2±3,8
ЛДГ							
печінка	4,8±1,7	4,5±1,2	4,1±1,5	2,3±1,1	4,6±1,7	5,8±1,8	11,1±2,7*
нирки	5,3±1,5	2,6±0,8	5,9±1,5	3,4±2,3	8,2±3,1	11,0±0,9*	12,4±2,2*
серце	18,2±5,1	3,1±0,9*	7,9±2,0*	5,8±3,8*	10,9±3,9	16,9±2,2	14,9±2,3

ферментів в тканинах при дії хлориду кобальту [4]. Зниження активності АсАТ в печінці через добу після введення хлориду кобальту може бути пов'язаним із витіком ферменту в кров внаслідок лабілізації мембранних структур, що неодноразово було показано раніше. Введення в організм хлориду кобальту спричинює посилення процесів ПОЛ, підвищення ступеню гемолізу еритроцитів [8, 13], що підтверджується і нашими даними (табл. 3). Водночас ми виявили зниження активності амінотрансфераз та ЛДГ в сироватці крові при введенні хлориду кобальту, що може бути пов'язаним як з дією протеїназ, так і з виходом ферментів в сечу. Слід відзначити особливості регуляції активності ТАТ в умовах оксидативного стресу, спричиненого введенням хлориду кобальту. Період півжиття ТАТ складає 1,5–6 год [6], і підвищена активність ферменту через добу (табл. 2) може бути пов'язана з порушенням його деградації, що ми обговорювали в роботі [7]. Зазначимо, що в цьому задіяна внутрішньоклітинна тіол-залежна система протеолізу [16].

Застосування унітіолу перед введенням хлориду кобальту спричинювало нормалізацію активності АсАТ в печінці як через 4 години, так і через добу, однак було зафіксовано підвищення активності АЛАТ в серці, АсАТ — в нирках та серці, ТАТ — в печінці, причому виявлені часові особливості активації кожного з цих ферментів (табл. 2). Якщо підвищення активності амінотрансфераз в печінці та нирках свідчить про посилення глюконеогенезу з амінокислот, то активність цих ферментів в серці відображує потребу кардіоміоцитів в метаболітах циклу Кребса, що спостерігається при підвищенні потреби клітин в АТФ. Введення одного унітіолу тваринам виявило деякі закономірності його дії на процеси переамінування, а саме: зниження активності АЛАТ та АсАТ через 4 години та її підвищення через добу. Схоже, що в реалізації цих ефектів не беруть участі глюкокортикоїди, оскільки активність високочутливої до них ТАТ не зміню-

валась в обидва терміни після введення унітіолу (табл. 2). Зниження активності АЛАТ та АсАТ в органах щурів через 4 години після введення унітіолу супроводжується зниженням їх активності в сироватці крові, а для АсАТ ця дія продовжується цілу добу (табл. 3), що може свідчити про участь застосованого препарату в процесах регуляції активності зазначених ферментів як в тканинах, так і в крові. Процеси переамінування тісно пов'язані з циклом сечоутворення; дані таблиці 3 свідчать про те, що при дії хлориду кобальту вміст сечовини в сироватці не змінюється, однак застосування унітіолу виявило підвищення вмісту сечовини в сироватці крові, що ще раз може доводити дію даного препарату на хід метаболічних процесів.

Відомо, що введення сполук кобальту до організму спричинює розвиток гіпоксії та утворення транскрипційного фактору HIF, що активує ряд генів, в тому числі і гени ЛДГ [18]. В нашій постановці ми не виявили активації зазначеного фермента (табл. 2), що, можливо, пов'язано з термінами нашого дослідження, оскільки процес трансляції даного білка відбувається дуже швидко. Однак в обидва досліджувальні терміни ми встановили значне зниження активності ЛДГ в серці при введенні хлориду кобальту, причому така ж картина спостерігалась і в сироватці крові (табл. 3). Отримані дані, з одного боку, можуть свідчити про високу чутливість ЛДГ1 до дії хлориду кобальту, з іншого — підтверджувати тезу про активацію протеїназ, що виявляють тканинну специфічність; слід також мати на увазі можливість витоку фермента з кардіоміоцитів в кров та далі в сечу внаслідок лабілізації плазматичних мембран, що доводиться даними про посилення спонтанного гемолізу (табл. 3).

В усякому разі, саме ЛДГ1 виявилась найбільш чутливою до гіпоксії і саме гальмування гліколізу може бути початком ланцюга метаболічних змін, що можуть призвести до розвитку патології міокарду. Попереднє введення унітіолу не вплинуло на зниження активності ЛДГ в сер-

Таблиця 3

ВПЛИВ ХЛОРИДУ КОБАЛЬТУ ТА УНІТІОЛУ НА СТУПІНЬ ГЕМОЛІЗУ ЕРИТРОЦИТІВ (В %), ВМІСТ СЕЧОВИНИ ТА АКТИВНІСТЬ АЛАТ, АСАТ ТА ЛДГ В СИРОВАТЦІ КРОВІ (ММОЛЬ СЕЧОВИНИ / Л, НМОЛЬ ПВК / ХВ. НА МГ БІЛКА)

	контроль	CoCl ₂ 4 год.	CoCl ₂ 24 год.	унітіол + CoCl ₂ 4 год.	унітіол + CoCl ₂ 24 год.	унітіол 4 год.	унітіол 24 год.
гемоліз	2,78±0,29	4,23±0,53*	3,51±0,85	2,21±0,41	3,43±0,57	не визначали	2,67±0,47
АЛАТ	0,93±0,16	0,79±0,17	0,45±0,06*	0,91±0,3	1,46±0,47	0,40±0,07*	0,79±0,31
АсАТ	1,22±0,15	1,47±0,34	0,81±0,07*	1,23±0,27	2,2±0,72	0,71±0,08*	0,6±0,12*
ЛДГ	11,08±1,46	4,04±0,42*	5,41±1,34*	7,4±2,13	8,21±2,01	7,33±1,55	14,09±2,46
сечовина	9,3±2,0	11,8±2,1	8,4±0,9	20,1±0,7*	12,4±0,8	14,1±0,2*	15,3±0,7*

ці на ранніх термінах після введення хлориду кобальту і запобігало зниженню активності фермента через добу. Привертає увагу той факт, що введення одного унітіолу, як і в інших випадках, виявило модулюючу дію: щодо ЛДГ, активність її в печінці та нирках підвищувалася при дії препарату (табл. 2).

ВИСНОВКИ

Результати проведеного дослідження свідчать про чутливість показників енергетичного метаболізму до дії хлориду кобальту. Попереднє введення унітіолу лише в деяких випадках виявляло нормалізуючу дію. В той же час, введення одного цього препарату спричинювало в ряді випадків ефекти, схожі на такі при дії стрес-агента. Виявлено здатність унітіолу в застосованій дозі впливати на активність показників азотного та вуглеводного обміну.

ПЕРЕЛІК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ ІНФОРМАЦІЇ

1. Буланкіна Н. І., Охріменко С. М., Ганусова Г. В. Методи дослідження ліпідів та вуглеводів. — Харків: ХНУ ім. В. Н. Каразіна, 2006. — 50 с.
2. Дубинина Е. Е. Роль активных форм кислорода в качестве сигнальных молекул в метаболизме тканей при состояниях окислительного стресса // Вопросы мед. химии. — 2001. — Т. 47. — № 6. — С. 561–581.
3. Калиман П. А., Охрименко С. М. Цикл глюкоза-жирные кислоты при окислительном стрессе у крыс, вызванном хлоридом кобальта // Укр. біохім. журнал. — 2005. — № 77, 2. — С. 154–158.
4. Калиман П. А., Самохин А. А., Самохина Л. М. Система протеиназа-ингибитор протеиназ у крыс при окислительном стрессе, вызванном введением хлорида кобальта // Укр. біохім. журнал. Т. 72. — 2000. — № 1. — С. 89–92.
5. Меньщикова Е. Б., Ланкин В. З., Зенков Н. К. и др. Окислительный стресс. Проксиданты и антиоксиданты. — М.: Слово, 2006. — 556 с.
6. Мертвцов Н. П. Регуляция экспрессии генов стероидными гормонами. — Новосибирск: Наука, 1990. — 262 с.
7. Охріменко С. М. Регуляція активності тирозинаміотрансферази печінки щурів за умов окислативного стресу // Медична хімія. — 2006. — № 2. — С. 105–108.
8. Павиченко О. В. Антиоксидантна система еритроцитів та гемоксигеназна активність в серці, судинах і легенях щурів за умов розвитку гемолітичної анемії: Автореф. дис. канд. біол. наук. — Харків, 2004. — 19 с.
9. Паламарчук А. В., Власенко М. В. Унітіол як антиоксидантний препарат та його застосування у лікуванні хворих на цукровий діабет // Ліки. — 2003. — № 1-2. — С. 18–21.
10. Протасова Т. Н. Гормональная регуляция активности ферментов. — М.: Медицина, 1975. — 236 с.
11. Пушкина Н. Н. Биохимические методы исследования. М.: Медгиз, 1963. — С. 208–210.
12. Саприн А. Н., Калинина Е. В. Окислительный стресс и его роль в механизмах апоптоза и развитии патологических процессов // Успехи биол. химии. — Т. 39. — 1999. — С. 289–326.
13. Соколік В. В. Вплив хлоридів кобальту та меркурію на пероксидне окислення ліпідів, систему тіолів та активність глутатіонзалежних антиоксидантних ферментів: Автореф. дис. канд. біол. наук. — Харків, 2004. — 19 с.
14. Стефанов О. В., Аркадьев В. Г., Максимов Ю. М. Застосування унітіолу в кардіології // Ліки. — 2002. — № 1-2. — С. 47–50.
15. Строев Е. А., Макарова В. Г. Практикум по биологической химии. — М.: Высшая школа, 1986. — С. 208–211.
16. Ciechanover A., Hargrove J. L., Gross-Mesilaty S Ubiquitin-mediated degradation of tyrosine aminotransferase (TAT) in vitro and in vivo // Mol. Biol. Rep. — 1997. — V. 24, № 1-2. — P. 27–33.
17. Schepard B., New Method for Assay of Tyrosine Transaminase // Analyt. Biochem. — 1969. — V. 30. — P. 443–448.
18. Semenza L. G. Oxygen-regulated transcription factors and their role in pulmonary disease // Respir. Res. — 2000. — № 1. — P. 159–162
19. Sies H Oxidative Stress: Oxidant and Antioxidants. — N. Y.: Academic Press. — 1991.

УДК 577.121+612.392.6+615.279

**ВЛИЯНИЕ УНИТИОЛА НА СОСТОЯНИЕ ЭНЕРГЕТИЧЕСКОГО
МЕТАБОЛИЗМА У КРЫС ПРИ ВВЕДЕНИИ ХЛОРИДА КОБАЛЬТА**

С. М. Охрименко, П. А. Калиман

Ключевые слова: кобальт, унитиол, глюкоза, гликоген, свободные жирные кислоты, аминотрансферазы, лактатдегидрогеназа

Изучено влияние хлорида кобальта и унитиола на показатели энергетического метаболизма — содержание глюкозы и свободных жирных кислот в крови, гликогена в печени, а также на активность ферментов гликолиза и глюконеогенеза — лактатдегидрогеназы и аминотрансфераз — в органах крыс, а также в сыворотке крови. Установлено, что введение животным хлорида кобальта вызывает развитие стресс-реакции, что отражается в усилении процессов гликогенолиза и липолиза, а также глюконеогенеза. Предварительное введение унитиола лишь в некоторых случаях приводило к нормализации указанных показателей. Введение одного унитиола в некоторых случаях вызывало такой же эффект, как и при введении стресс-агента — хлорида кобальта. Выявлены высокая чувствительность сердечного изоэзима лактатдегидрогеназы к действию хлорида кобальта и способность унитиола влиять на этот показатель в условиях гипоксии, вызываемой введением хлорида кобальта. Выявлена чувствительность лактатдегидрогеназы печени и почек к действию унитиола. Действие указанного препарата на изученные показатели, скорее всего, не прямое, а опосредовано системами внутриклеточной регуляции.

UDC 577.121+612.392.6+615.279

**THE EFFECT OF UNITHIOL ON THE STATE OF ENERGY METABOLISM
IN RATS UNDER INTRODUCTION OF COBALT CHLORIDE**

S. M. Okhrimenko, P. A. Kaliman

Key words: cobalt, unithiole, glucose, glycogen, free fatty acids, aminotransferases, lactate dehydrogenase

The effect of cobalt chloride and unithiol on some indices of energy metabolism like glucose and free fatty acids content in blood and glycogen content in liver, and activities of enzymes of glycolysis and glyconeogenesis — lactate dehydrogenase and aminotransferases — in organs and blood serum of rats were studied. It was found that introduction of cobalt chloride was responsible for development of a stress reaction which was manifested itself in the increase of glycogenolysis, lypolysis and glyconeogenesis. The preliminary introduction of unithiol resulted in normalisation of the mentioned indices only in the some cases. Introduction of unithiol only resulted in the same effect as in the case of cobalt chloride in some cases too. It was observed that cordial isozyme of lactate dehydrogenase was very sensitive to the influence of cobalt chloride but unithiol could affect this influence under hypoxia resulted from introduction of cobalt chloride. It was revealed that lactate dehydrogenases in liver and kidney were sensitive to unithiol. The data obtained allow to suggest that the effect of unithiol on the indices under study was most likely indirect, i.e. mediated by mechanisms of intracellular metabolic control, than direct.

Адреса для листування:

31077, м. Харків, м. Свободи, 4,
Кафедра біохімії Харківського національного універси-
тету ім. В. Н. Каразіна
Тел. 38(057)707-55-02