

УДК: 577.151:54-38

АДАПТАЦИЯ ФЕРМЕНТОВ ЛИПИДНОГО И АЗОТИСТОГО ОБМЕНА У КРЫС ПРИ ОКСИДАТИВНОМ СТРЕССЕ, ВЫЗВАННОМ СОЛЯМИ КОБАЛЬТА И РТУТИ

С.М.Охрименко, Н.Ю.Гурьева, П.А.Калиман

Харьковский национальный университет им. В.Н.Каразина (Харьков, Украина)

Pavel.A.Kaliman@univer.kharkov.ua

Изучено влияние хлоридов кобальта и ртути на активность липазы жировой ткани, β -оксибутиратдегидрогеназы и аминотрансфераз печени крыс в динамике. Выявлен активирующий эффект солей металлов в отношении липазы и аминотрансфераз, зависящий от вида металла и времени его экспозиции в организме. В то же время введение в организм хлоридов кобальта и ртути вызывало снижение активности β -оксибутиратдегидрогеназы. Обнаруженные изменения активности изученных ферментов могут отражать адаптацию метаболизма при оксидативном стрессе.

Ключевые слова: *хлорид кобальта, хлорид ртути, липаза, жировая ткань, β -оксибутиратдегидрогеназа, аминотрансферазы, печень, крыса.*

Введение

Поступление в организм избыточных концентраций солей тяжелых металлов и металлов с переменной валентностью вызывает появление активных форм кислорода, усиление процессов перекисного окисления липидов, повреждение всех типов биомолекул. При этом равновесие в системе прооксиданты-антиоксиданты сдвигается в сторону накопления молекул с прооксидантными свойствами и развивается оксидативный стресс (Саприн, Калинина, 1999). Адаптация организма к этому состоянию отражается в изменении ряда показателей метаболизма: усиливается синтез антиоксидантных ферментов, мембранных фосфолипидов, мобилизуются энергетические резервы и т.д. Ранее на нашей кафедре было показано, что введение в организм животных избыточных количеств солей кобальта и ртути вызывает снижение содержания гликогена в печени и изменение концентрации глюкозы и свободных жирных кислот в крови, активацию ферментов глюконеогенеза (Калиман, Охрименко, 2003; Калиман, Охрименко, 2005; Буланкина и др., 2004). Однако, малоизученными остаются процессы мобилизации липидов в этих условиях, а также внутриклеточная локализация адаптивных процессов. В связи с этим целью данной работы явилось изучение активности ключевого фермента липолиза жировой ткани - гормончувствительной триглицеридлипазы (ТГ-липазы, КФ 3.1.1.3), активности кетогенного фермента β -оксибутиратдегидрогеназы (ОБДГ, КФ 1.1.1.30), а также активности аланин-, аспартат- и тирозинаминотрансфераз (АлАТ, КФ 2.6.1.2; АсАТ, КФ 2.6.1.1; ТАТ, КФ 2.6.1.5) в митохондриальной и постмитохондриальной фракциях печени крыс в динамике после введения в организм животных высоких доз хлоридов кобальта и ртути.

Объекты и методы исследования

Объект исследования - 3-месячные крысы-самцы линии Wistar. Хлорид кобальта и хлорид ртути вводили внутривентриально в дозах соответственно 3 мг и 0,7 мг на 100 г массы тела. Контрольным животным вводили физраствор. Животных брали в опыт через 4 и 24 часа после инъекций. После декапитации печень перфузировали охлажденным физраствором, навески гомогенизировали в среде выделения, содержащую 50 мМ трис-НСI (рН 7,4), 0,25 М сахарозу, 0,002 М цистеин. Из гомогената печени путем дифференциального центрифугирования получали митохондриальную и постмитохондриальную фракции. Для разрушения митохондрий их суспендировали в среде выделения с добавлением глицерина при непрерывном помешивании в течение 20 минут (Практикум по биохимии, 1979). Гомогенат жировой ткани готовили на физиологическом растворе при температуре 35°C. Активность триглицеридлипазы определяли в гомогенате жировой ткани нефелометрическим методом (Аксененко, Баркатан, 1994), активность β -оксибутиратдегидрогеназы определяли в митохондриальной фракции печени по накоплению восстановленного NAD (Косенко, Каминский, 1986). Активности АлАТ и АсАТ определяли с помощью цветных реакций на пируват (Пушкина, 1963), активность ТАТ - с помощью цветной реакции на п-оксифенилпируват (Shepard, 1969). Активность всех аминотрансфераз определяли в митохондриальной и постмитохондриальной фракциях печени. Содержание белка определяли методом Лоури (Lowry et al., 1951). Расчет активности всех ферментов проводили на мг белка за мин. Статистическая обработка полученных

данных проводилась по методу Стьюдента с использованием пакета компьютерных программ Biostat. Число повторов экспериментов - 5-8 для каждой точки.

В работе использовали реактивы марок чда и хч отечественного и импортного производства.

Результаты и обсуждение

Введение животным хлорида кобальта вызывало повышение активности триглицеридлипазы в оба исследуемые срока, в то время как введение хлорида ртути вызывало повышение активности данного фермента только через 24 часа (табл. 1 и 2). Эти данные могут свидетельствовать об активации симпато-адреналовой системы организма и выбросе катехоламинов в кровь в условиях введения CoCl_2 , поскольку ТГ-липаза - регуляторный фермент, чувствительный к действию ряда гормонов, в том числе и к адреналину, который вызывает цАМФ-зависимую активацию данного фермента (Брокергоф, Дженсен, 1978). О развитии стресс-реакции в данных условиях свидетельствуют и результаты исследований, проведенных ранее на нашей кафедре, где было установлено снижение содержания гликогена в печени, увеличение концентрации глюкозы и свободных жирных кислот в крови при введении животным солей кобальта (Калиман, Охрименко, 2005).

Таблица 1.

Влияние хлорида кобальта на активность триглицеридлипазы жировой ткани крыс ($\Delta E \cdot 10^{-2}$ /час на мг белка)

Контроль	Время воздействия	
	4 часа	24 часа
19,3 ± 1,7	25,3 ± 1,7*	27,5 ± 2,5*

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

Таблица 2.

Влияние хлорида ртути на активность триглицеридлипазы жировой ткани крыс ($\Delta E \cdot 10^{-2}$ /час на мг белка)

Контроль	Время воздействия	
	4 часа	24 часа
19,3 ± 1,7	22,5 ± 3,6	27,1 ± 3,6*

Различия в динамике активации ТГ-липазы при введении хлоридов кобальта и ртути могут быть связаны с различными механизмами действия этих металлов на метаболические процессы. Так, кобальт вызывает оксидативный стресс непосредственно, вытесняя железо из гема и гемопротенинов, образуя Со-протопорфирин, в том числе в реакциях биосинтеза гема, тем самым препятствуя восстановлению содержания гемопротенинов, вызывая активацию свободнорадикального окисления и развитие гипоксии. Ртуть связывает SH-группы белков и небелковых тиолов, угнетая активность ряда антиоксидантных ферментов и снижая содержание восстановленного глутатиона, приводит к развитию оксидативного стресса несколько позже с последующим повреждением мембран эритроцитов и накоплением свободного гема, обладающего прооксидантными свойствами (Калиман та ін., 2004; Трахтенберг, Коршун, 1990).

Активация липолиза при стрессе сопровождается накоплением в митохондриях ацетил-КоА, который, не успевая окисляться в цикле трикарбоновых кислот, используется гепатоцитами для синтеза кетоновых тел, поскольку в длительной стрессовой ситуации именно кетоновые тела служат основным энергетическим субстратом для многих органов, в том числе сердечной мышцы.

С целью выяснения механизмов действия хлоридов кобальта и ртути на кетогенез мы исследовали активность β -оксибутиратдегидрогеназы - фермента, регулирующего соотношение ацетоацетата и β -оксибутирата. Результаты исследований отражены в таблицах 3 и 4. Так, активность ОБДГ снижалась при введении хлорида кобальта в оба срока, а при введении хлорида ртути - через 4 часа. Это может быть связано с несколькими причинами. Во-первых, известно ингибирующее действие кортизола на ОБДГ (Bedetti et al., 1987), а развитие любой стресс-реакции, в

том числе и в нашем случае, сопровождается повышением содержания глюкокортикоидов в крови, что подтверждается и установленной нами ранее активацией ферментов глюконеогенеза, переаминирования и мочевинообразования при введении в организм хлоридов кобальта и ртути

Таблица 3.

Влияние хлорида кобальта на активность β -оксибутиратдегидрогеназы печени крыс ($\Delta E \cdot 10^{-3}$ /мин на мг белка)

Контроль	Время воздействия	
	4 часа	24 часа
20,8 ± 2,2	13,5 ± 1,4*	13,2 ± 1,9*

Таблица 4.

Влияние хлорида ртути на активность β -оксибутиратдегидрогеназы печени крыс ($\Delta E \cdot 10^{-3}$ /мин на мг белка)

Контроль	Время воздействия	
	4 часа	24 часа
20,8 ± 2,2	12,8 ± 0,9*	22,1 ± 4,2

(Буланкина и др., 2004; Калиман, Охрименко, 2003; Калиман, Охрименко, 2005). С другой стороны, аллостерическим модулятором ОБДГ является фосфатидилхолин, содержание которого в мембранах снижается в результате усиления процессов ПОЛ, вызванных хлоридом кобальта. Снижение активности ОБДГ при действии хлорида ртути может быть связано с прямым ингибирующим действием этого металла на фермент, поскольку в его активный центр входит остаток цистеина (Latruffe, Gaudemer, 1975), а ртуть обладает высоким сродством к сульфгидрильным группам.

Эффекты хлоридов кобальта и ртути на активность аминотрансфераз в печени крыс отражены в таблицах 5 и 6. Введение в организм животных хлоридов кобальта и ртути вызывало повышение активности митохондриальной формы ТАТ через 4 часа; в этот же срок было установлено и повышение активности митохондриальной АсАТ при действии хлорида кобальта. Через 24 часа экспозиции солей металлов в организме активность этих двух ферментов в митохондриях была значительно повышена по сравнению с контролем как при использовании хлорида кобальта, так и хлорида ртути. Повышение активности данных аминотрансфераз в митохондриях при примененных воздействиях может служить отражением активации первой стадии глюконеогенеза – пируваткарбоксилазной реакции, проходящей в митохондриях, поскольку аминотрансферазы прямо (АсАТ) или опосредованно (ТАТ) участвуют в регуляции содержания пирувата и образующегося из него оксалоацетата.

В постмитохондриальной фракции печени введение хлорида ртути вызывало повышение активности всех исследованных аминотрансфераз, а хлорида кобальта – повышение активности только АсАТ и ТАТ, причем и здесь была отмечена специфика действия металлов, проявляющаяся в различной динамике изменений активности данных ферментов. Повышение активности цитоплазматических аминотрансфераз отражает процессы мобилизации аминокислот и образование субстратов для глюконеогенеза, активирующегося при стрессе. Усиление процессов переаминирования при введении солей кобальта и ртути связано с активацией цикла мочевинообразования, что было показано нами ранее (Калиман, Охрименко, 2003; Калиман, Охрименко, 2005; Буланкина и др., 2004). Снижение активности АлАТ в постмитохондриальной фракции печени через сутки после введения хлорида кобальта, видимо, связано с утечкой фермента из ткани в кровь, поскольку при оксидативном стрессе, вызванном введением хлорида кобальта, усиливаются процессы ПОЛ (Буланкина и др., 2004), приводящие к лабильности мембранных структур, что подтверждается данными об увеличении степени спонтанного гемолиза эритроцитов в этих условиях (Калиман, Охрименко, 2005).

Выявленный активирующий эффект хлоридов кобальта и ртути в отношении аминотрансфераз, очевидно, связан с синтезом этих ферментов *de novo* в результате активации гипоталамо-

гипофизарно-надпочечниковой системы и повышения в крови содержания глюкокортикоидов, выступающих индукторами синтеза ферментов глюконеогенеза и переаминирования. В опытах с использованием ингибитора белкового синтеза актиномицина Д нами ранее была показана индукция синтеза *de novo* цитоплазматической формы ТАТ хлоридами кобальта и ртути (Калиман, Охрименко, 2003; Калиман, Охрименко, 2005).

Таблица 5.

Влияние хлорида кобальта на активность аминотрансфераз печени крыс (мкг ПВК/мин и нмоль п-ОФП/мин на мг белка)

Показатели	Контроль	Время воздействия	
		4 часа	24 часа
митохондрии			
АсАТ	0,20 ± 0,06	1,36 ± 0,21*	1,9 ± 0,38*
АлАТ	1,79 ± 0,24	1,93 ± 0,41	1,14 ± 0,35
ТАТ	2,6 ± 0,2	3,5 ± 0,3*	4,6 ± 0,1*
постмитохондриальная фракция			
АсАТ	0,30 ± 0,06	0,98 ± 0,07*	3,63 ± 0,20*
АлАТ	5,03 ± 0,95	5,92 ± 0,79	1,06 ± 0,18*
ТАТ	3,2 ± 0,12	3,84 ± 0,15*	2,97 ± 0,8

Таблица 6.

Влияние хлорида ртути на активность аминотрансфераз печени крыс (мкг ПВК/мин и нмоль п-ОФП/мин на мг белка)

Показатели	Контроль	Время воздействия	
		4 часа	24 часа
митохондрии			
АсАТ	0,20 ± 0,06	0,19 ± 0,09	2,2 ± 0,35*
АлАТ	1,79 ± 0,24	1,73 ± 0,42	2,27 ± 0,38
ТАТ	2,6 ± 0,2	6,5 ± 1,5*	11,1 ± 2,0*
постмитохондриальная фракция			
АсАТ	0,30 ± 0,06	0,28 ± 0,12	3,63 ± 0,34*
АлАТ	5,03 ± 0,95	5,9 ± 0,81	7,75 ± 0,55*
ТАТ	3,2 ± 0,12	8,0 ± 1,0*	15,0 ± 3,0*

Таким образом, результаты проведенных исследований свидетельствуют о развитии стресс-реакции при введении в организм высоких доз хлоридов кобальта и ртути. Это отражается в активации липолиза в жировой ткани, изменении соотношения кетоновых тел, интенсификации процессов переаминирования. Полученные результаты укладываются в общую картину развития оксидативного стресса, вызываемого солями тяжелых металлов и металлов с переменной валентностью. Различия в динамике адаптивных изменений активности изученных ферментов могут быть связаны с различными механизмами действия кобальта и ртути на процессы инициации свободнорадикального окисления и последующие реакции антиоксидантной защиты.

Список литературы

- Аксененко Л.П., Баркатан З.С. Клиническая лабораторная диагностика. – Киев: Вища школа, 1994. – С. 108-110.
- Брокергоф Х., Дженсен Р. Липолитические ферменты. – М.: Мир, 1978. – 396с.
- Буланкина Н.И., Ганусова Г.В., Охрименко С.М., Яковенко М.Г. Влияние хлорида кобальта и триптофана на некоторые показатели метаболизма у крыс разного возраста // VI Международный симпозиум «Биологические механизмы старения» (26-29 мая 2004г., Харьков). Тез. докл. – Харьков, 2004. – С.74.
- Калиман П.А., Охрименко С.М. Влияние хлорида ртути на активность тирозинаминотрансферазы и некоторые стороны азотистого и углеводного обмена в печени крыс // Актуальные проблемы медицины и биологии. – 2003. - №1. - С. 476-482.

- Калиман П.А., Охрименко С.М. Цикл глюкоза – жирные кислоты при оксидативном стрессе у крыс, вызванном хлоридом кобальта // Укр. біохім. журн. – 2005.- Т.77, №2. – С. 154-158.
- Калиман П.А., Бараннік Т.В., Боріков О.Ю. та ін. Оксидативний стрес і регуляція антиоксидантного захисту в механізмах адаптації метаболізму в екстремальних умовах // Матеріали міжнародної наукової конференції „Каразінські природознавчі студії” (14-16 червня 2004р., Харків) – Харків, 2004. – С. 228–229.
- Косенко Е.А., Каминский Ю.Г. Регуляторы активности 3-оксибутиратдегидрогеназы в митохондриях печени крысы // Укр. біохім. журн. – 1986. – Т.58, №2. – С. 20–25.
- Практикум по биохимии / Под ред. Мешковой Н.П., Северина С.Е. - М.: Изд-во Моск. ун-та, 1979. – 430с.
- Пушкина Н.Н. Биохимические методы исследования. – М.: Медгиз. 1963. – С. 208–210.
- Саприн А.Н., Калинина Е.В. Окислительный стресс и его роль в механизмах апоптоза и развития патологических процессов // Успехи биол. химии. – 1999. – Т.39. – С. 289–326.
- Трахтенберг И.М., Коршун М.Н. Ртуть и ее соединения в окружающей среде. – К.: Вища школа, 1990. – 231с.
- Bedetti C.D., Montero G.A., Stoppani A.O. Effect of diabetes, adrenalectomy and hypophysectomy on D-3-hydroxybutyrate dehydrogenase activity and substrate oxidation by rat mitochondria // Biochem. Int. – 1987. – Vol.14, №1. – P. 45–54.
- Latruffe N., Gaudemer Y. Possible occurrence for histidyl and cysteyle residues in the catalytic center of rat liver mitochondrial D(-)-beta-hydroxybutyrate dehydrogenase // Biochimie. - 1975. – Vol.57, №8. – P. 849–857.
- Lowry O.H., Rosebrough N.J., Farr A.L. et al. Protein measurement with Folin phenol reagent // J. Biol. Chem. – 1951. – Vol.193. – P. 265–275.
- Schepard B. New Method for Assay of Tyrosine Transaminase // Analyt. Biochem. – 1969. – Vol.30. – P. 443–448.

АДАПТАЦІЯ ФЕРМЕНТІВ ЛІПІДНОГО ТА АЗОТНОГО ОБМІНУ У ЩУРІВ ПРИ ОКСИДАТИВНОМУ СТРЕСІ, ЩО СПРИЧИНЕНИЙ СОЛЯМИ КОБАЛЬТУ ТА МЕРКУРІЮ
С.М.Охрименко, Н.Ю.Гур'єва, П.А.Калиман

Вивчено вплив хлоридів кобальту та меркурію на активність ліпази жирової тканини, β -оксибутиратдегідрогенази та амінотрансфераз печінки щурів в динаміці. Встановлено активуючий ефект солей металів відносно ліпази та амінотрансфераз, що залежить від виду металу та тривалості його експозиції в організмі. В той же час введення в організм хлоридів кобальту та меркурію спричиняло зниження активності β -оксибутиратдегідрогенази. Зареєстровані зміни активності вивчених ферментів можуть відображувати адаптацію метаболізму при оксидативному стресі.

Ключові слова: *хлорид кобальту, хлорид меркурію, ліпаза, жирова тканина, β -оксибутиратдегідрогеназа, амінотрансферази, печінка, щур.*

THE ADAPTATION OF ENZYMES OF LIPID AND NITROGENOUS METABOLISMS IN RAT UNDER OXIDATIVE STRESS CAUSED BY COBALT AND MERCURY SALTS
S.M.Okhrimenko, N.Y.Gur'eva, P.A.Kaliman

The dynamic effects of cobalt and mercury chlorides on the activity of adipose tissue lipase, β -oxibutyrate dehydrogenase and aminotransferases in rat liver were investigated. The activating effects of salts depending on the type of metal and exposure in organism were revealed on the lipase and aminotransferases. At the same time injection of cobalt and mercury chlorides provoked decrease in β -oxibutyrate dehydrogenase activity. The revealed shifts in activities of the mentioned enzymes might reflect adaptation of metabolism to oxidative stress.

Key words: *cobalt chloride, mercury chloride, lipase, adipose tissue, β -oxibutyrate dehydrogenase, aminotransferases, liver, rat.*

Представлено В.І.Жуковим
 Рекомендовано до друку Є.Е.Перським