

УДК: 577.12:599.32

Вплив аргініну на показники азотного та вуглеводного метаболізму у щурів при експериментальному рабдоміолізі

П.А.Каліман, С.М.Охріменко

*Харківський національний університет імені В.Н.Каразіна (Харків, Україна)
S.Okhrimenko@mail.ru*

Досліджено вміст глікогену в печінці, активність амінотрансфераз та аргінази в органах, а також вміст сечовини та креатиніну в сироватці крові щурів при введенні гліцеролу та аргініну. Встановлено такі зміни досліджуваних показників при введенні гліцеролу, що свідчать про розвиток стрес-реакції. Попереднє введення аргініну у ряді випадків попереджувало дію гліцеролу, що може свідчити про його регуляторну роль, ймовірно, пов'язану з утворенням оксиду азоту. Встановлено органні особливості дії гліцеролу та аргініну.

Ключові слова: рабдоміоліз, аргінін, стрес, глікоген, амінотрансферази, аргіназа, органи, щур.

Влияние аргинина на показатели азотистого и углеводного метаболизма у крыс при экспериментальном рабдомиолизе

П.А.Калиман, С.М.Охрименко

Изучено содержание гликогена в печени, активность аминотрансфераз и аргиназы в органах, а также содержание мочевины и креатинина в сыворотке крови крыс при введении глицерола и аргинина. Установлены такие изменения исследуемых показателей при введении глицерола, которые свидетельствуют о развитии стресс-реакции. Предварительное введение аргинина в ряде случаев предупреждало действие глицерола, что может свидетельствовать о его регуляторной роли, вероятно, связанной с образованием оксида азота. Установлены органные особенности действия глицерола и аргинина.

Ключевые слова: рабдомиолиз, аргинин, стресс, гликоген, аминотрансферазы, аргиназа, органы, крыса.

Effect of arginine on the indices of nitrogenous and carbohydrate metabolism in rats under experimental rhabdomyolysis

P.A.Kaliman, S.M.Okhrimenko

Glycogen content in liver, aminotransferase and arginase activities in organs, and urea and creatinine content in blood serum of rats under injections of glycerol and arginine have been investigated. Under injection of glycerol alone there have been revealed such shifts in the indices studied which indicate development of stress. Preliminary injection of arginine in several cases prevented effects of glycerol that could give evidence of its regulating role, likely connected with formation of nitrogen oxide. Several features concerning effects of glycerol and arginine in various organs were specified.

Key words: rhabdomyolysis, arginine, stress, glycogen, aminotransferase, arginase, organs, rat.

Вступ

Аргінін – умовно незамінна амінокислота, що є попередником для синтезу білків та багатьох біологічно важливих молекул, таких як орнітин, пролін, поліаміни, креатин. В організмі людини та тварин аргінін також використовується для синтезу оксиду азоту (NO) (Бабушкіна, 2009). Синтез NO з L-аргініну каталізується NO-синтазами (NOS), що мають декілька ізоформ з різною локалізацією та поділяються на конститутивні та ті, що індукуються (Зенков і др., 2000). NO має широкий спектр біорегуляторної дії, впливаючи на функціонування таких систем організму, як серцево-судинна, дихальна, травна, уrogenітальна, нервова, ендокринна, імунна та система гемостазу. Основна молекулярна мішень NO – гемова частина розчинної гуанілатциклази; через регуляцію утворення цГМФ виявляється більшість фізіологічних ефектів NO. Іншими можливими мішенями для NO є розчинний АДФ-рибозилуючий фермент та фактори транскрипції, через які NO може безпосередньо впливати на транскрипцію генів та трансляцію мРНК (Вуан et al., 2009). Недостатньо вивченими є модулюючі ефекти NO за умов підвищення вмісту вільного гему в організмі, коли посилюються вільнорадикальні процеси та розвивається оксидативний стрес (Меньщикова і др., 2006). При

рабдоміолізі відбувається масове надходження міоглобіну з пошкоджених міоцитів в кровоток та міжклітинну рідину, що супроводжується підвищенням вмісту вільного гему в крові та тканинах. Тому метою нашого дослідження було вивчення впливу аргініну на показники азотного та вуглеводного метаболізму в експериментальній моделі рабдоміолізу.

Методика

Об'єкт дослідження – щури-самці лінії Wistar масою 150–220 г, що утримувались в стандартних умовах віварію. Рабдоміоліз моделювали введенням 50% розчину гліцеролу в дозі 1 мл на 100 г маси, по ½ дози в кожний стегновий м'яз. Аргінін вводили в дозі 60 мг на 100 г маси за 0,5 години до введення гліцеролу. Маніпуляції з тваринами проводили згідно з правилами «Європейської конвенції захисту хребетних тварин, які використовуються для експериментальних та інших наукових цілей» (Страсбург, 1985 р.). Тварин брали в дослід через 4 та 24 години після введення гліцеролу із застосуванням легкого ефірного наркозу. В сироватці крові визначали вміст сечовини, креатиніну, а також активність амінотрансфераз за допомогою стандартних тест-наборів. В гомогенаті печінки визначали вміст глікогену та активність тирозинамінотрансферази (ТАТ); в гомогенатах печінки, нирок та серця визначали активність аланін- та аспартатамінотрансфераз (АлАТ та АсАТ) та аргінази методами, що описані в роботі (Калиман, Охрименко, 2005). Оцінку значущості різниці у вибірках з нормальним розподіленням проводили за допомогою t-критерію Стьюдента. В роботі використовували реактиви фірм «Reanal» (Угорщина), «Fluka» (Німеччина), «Rexim» (Франція) та вітчизняного виробництва марок хч та чда.

Результати

Введення гліцеролу спричинювало значне зниження вмісту глікогену в печінці щурів в обидва досліджувані терміни – наполовину через 4 години та в 7 разів через добу. При сумісному введенні аргініну та гліцеролу вміст глікогену через 4 години не відрізнявся від контролю, а через добу був знижений майже наполовину. При цьому введення одного аргініну не впливало на показники вмісту глікогену в печінці щурів протягом експерименту (табл. 1).

Таблиця 1.

Вміст глікогену в печінці щурів при введенні гліцеролу та аргініну (г на 100 г тканини)

Контроль	Гліцерол 4 год.	Гліцерол 24 год.	Аргінін + гліцерол 4 год.	Аргінін + гліцерол 24 год.	Аргінін 4 год.	Аргінін 24 год.
6,46±1,03	3,01±0,59*	0,91±0,12*	6,37±0,77	3,57±0,15*	3,91±0,61	5,26±0,36

Примітка: тут та далі * – $p < 0,05$.

Введення гліцеролу не змінювало активність АлАТ та АсАТ в печінці щурів в обидва досліджувані терміни, в той час як активність ТАТ була підвищеною через 4 години після початку експерименту. Попереднє введення аргініну посилювало вплив гліцеролу на активність цього ферменту в ранні терміни, і активність ТАТ вдвічі перевищувала показники контролю. Через добу після сумісного введення аргініну та гліцеролу виявлено зниження активності АлАТ в печінці. Введення одного аргініну також спричинювало зниження активності амінотрансфераз печінки – АлАТ та ТАТ через добу (табл. 2).

В нирках щурів більш чутливою до дії наведених чинників виявилась АлАТ – її активність підвищувалась вдвічі через добу після введення гліцеролу; введення одного аргініну та сумісно з гліцеролом спричинювало підвищення активності ферменту в ранні терміни. Для АсАТ в нирках встановлено підвищення активності тільки через добу після введення гліцеролу (табл. 2).

Активність амінотрансфераз в серці щурів підвищувалась після введення гліцеролу – АлАТ в обидва терміни, АсАТ через добу. Активність АсАТ (через добу) та АлАТ (через 4 години) поверталась до рівня контролю у разі попереднього застосування аргініну. Введення одного аргініну спричинювало значне зниження активності АсАТ в ранні терміни (табл. 2).

Введення гліцеролу спричинювало значне підвищення активності АлАТ та АсАТ в сироватці крові щурів, що не запобігалось попереднім введенням аргініну в ранні терміни, а для АлАТ і через добу. В той же час, через добу після сумісного введення гліцеролу та аргініну активність АсАТ була на рівні контрольних значень. Введення одного аргініну спричинювало підвищення активності АсАТ в сироватці крові через добу (табл. 2).

Таблиця 2.
Активність аміотрансфераз в тканинах щурів при введенні гліцеролу та аргініну (мкмоль, нмоль ПВК/хв та нмоль р-ОФП/хв на мг білка)

	Контроль	Гліцерол 4 год.	Гліцерол 24 год.	Аргінін + гліцерол 4 год.	Аргінін + гліцерол 24 год.	Аргінін 4 год.	Аргінін 24 год.
Печінка							
АлАТ	22,1±3,3	15,1±0,5	15,1±0,5	18,7±1,7	13,4±1,1*	18,8±0,7	14,1±1,4*
АсАТ	14,4±1,2	11,9±0,4	14,2±0,5	13,9±2,5	14,9±0,4	11,2±0,5	12,3±1,4
ТАТ	6,16±0,75	9,17±0,72*	5,85±0,71	14,9±1,8*	4,37±0,36	7,48±1,53	3,89±0,52*
Нирки							
АлАТ	3,24±0,54	4,1±0,66	7,34±0,56*	5,58±0,79*	5,08±0,78	5,69±0,88*	2,9±0,49
АсАТ	14,1±0,7	13,5±1,0	20,1±1,0*	12,9±1,9	21,6±2,3	18,7±1,3	16,9±1,7
Серце							
АлАТ	4,6±0,8	9,05±0,93*	7,74±0,52*	7,42±0,43	7,9±0,84*	7,39±0,78	3,47±0,67
АсАТ	14,3±1,5	15,5±1,2	22,7±1,1*	15,6±0,5	15,8±1,3	1,4±0,2*	13,5±1,0
Сироватка							
АлАТ	0,33±0,06	0,56±0,04*	0,64±0,04*	0,59±0,06*	0,62±0,04*	0,32±0,04	0,33±0,02
АсАТ	0,38±0,02	0,91±0,12*	0,96±0,03*	0,83±0,08*	0,46±0,05	0,35±0,05	0,54±0,03*

Показники азотного метаболізму – вміст сечовини та креатиніну в сироватці – підвищувались в ранні терміни після введення гліцеролу, а вміст сечовини – і через добу. Попереднє введення аргініну посилювало утворення сечовини, спричинене введенням гліцеролу, через 4 години, і нормалізувало його через добу. Вміст креатиніну, підвищений після введення гліцеролу в ранні терміни, нормалізувався при застосуванні аргініну. В той же час, для самого аргініну була показана здатність підвищувати вміст креатиніну в сироватці крові (табл. 3).

Таблиця 3.
Вміст сечовини та креатиніну в сироватці крові щурів при введенні гліцеролу та аргініну (ммоль сечовини/л та мкмоль креатиніну/л)

	Контроль	Гліцерол 4 год.	Гліцерол 24 год.	Аргінін + гліцерол 4 год.	Аргінін + гліцерол 24 год.	Аргінін 4 год.	Аргінін 24 год.
Сечовина	4,6±0,4	6,2±0,1*	7,0±0,8*	12,3±1,8*	11,0±3,9	5,2±0,9	4,9±0,5
Креатинін	92,0±10,3	141,7±14,1*	97,1±12,0	104,4±20,0	131,8±24,6	146,3±11,5*	103,6±10,5

Введення гліцеролу спричинювало зниження активності аргінази в усіх досліджуваних органах, причому мінімальні показники активності ферменту спостерігались в ранні терміни (табл. 4). Попереднє введення аргініну нормалізувало активність аргінази в печінці та серці в обидва терміни. В нирках аргінін частково запобігав зниженню активності ферменту, спричиненому введенням гліцеролу, в ранні терміни, і посилював дію гліцеролу через добу. При цьому введення одного аргініну призводило до зниження активності аргінази в нирках та серці (табл. 4).

Таблиця 4.
Активність аргінази в органах щурів при введенні гліцеролу та аргініну (мкмоль та нмоль сечовини/хв на мг білка)

Контроль	Гліцерол 4 год.	Гліцерол 24 год.	Аргінін + гліцерол 4 год.	Аргінін + гліцерол 24 год.	Аргінін 4 год.	Аргінін 24 год.
Печінка						
0,48±0,08	0,17±0,01*	0,25±0,04*	0,46±0,04	0,43±0,02	0,56±0,07	0,31±0,03
Нирки						
17,1±1,9	2,0±0,26*	12,3±1,9	13,2±2,4	26,5±2,0*	5,8±2,0*	11,0±3,5
Серце						
25,3±2,5	7,7±1,9*	13,2±3,4*	29,3±6,3	27,5±5,9	8,5±1,5*	8,0±1,5*

Обговорення

Зниження вмісту глікогену та підвищення активності тирозинамінотрансферази в печінці при введенні гліцеролу тваринам свідчать про розвиток стрес-реакції, оскільки глікогенфосфорилаза та ТАТ знаходяться під контролем симпато-адреналової та гіпофізарно-надниркової систем регуляції. Про розвиток оксидативного стресу за цих умов можуть свідчити дані щодо зниження вмісту вільних SH-груп в різних тканинах, що були отримані нами раніше (Охріменко та ін., 2010), а також дані інших авторів про підвищення вмісту вільного гему та активацію ферментів антиоксидантного захисту після введення гліцеролу (Obrooch et al., 2009). Виявлена нами властивість аргініну повністю або частково попереджувати зниження вмісту глікогену в печінці, спричинене введенням гліцеролу, може свідчити про здатність NO впливати на активність аденілатциклази, оскільки глікогенфосфорилаза є цАМФ-залежним ферментом.

Глюкокортикоїди, вміст яких в крові підвищується при стресі, спричинюють індукцію ферментів глюконеогенезу та амінотрансфераз в печінці та нирках. За умов нашого експерименту було виявлено підвищення активності ТАТ в печінці, а АлАТ та АсАТ тільки в нирках після введення гліцеролу. Можна допустити, що індукція АлАТ та АсАТ відбувалась і в печінці, але більшість молекул зазначених ферментів могла вийти з тканин в кров, про що свідчить підвищення активності амінотрансфераз в сироватці після введення гліцеролу. З літературних даних відомо, що при оксидативному стресі посилюються процеси ПОЛ, змінюється стан мембранних структур, внаслідок чого підвищується їх проникливість (Конторщиков, 2000). Введення аргініну не запобігало витоку амінотрансфераз з тканин в кров за умов рабдоміолізу в ранні терміни, а для АлАТ і через добу, що може свідчити про відсутність мембранопротекторних властивостей NO в даній метаболічній ситуації.

Цікавими виявились дані про зниження активності АлАТ та ТАТ в печінці після введення аргініну. Можна припустити, що в цьому органі з високою метаболічною активністю відбувається тонка регуляція експресії генів білків-ферментів за участю NO. Підвищена активність АлАТ в нирках при введенні аргініну може свідчити про органну специфічність регуляції, в якій задіяний оксид азоту. Зниження активності АсАТ в серці щурів після введення аргініну, можливо, пов'язано з особливостями мембранного складу кардіоміоцитів, що спричинює виток ферменту в кров, що підтверджується даними про підвищення активності АсАТ в сироватці крові після введення аргініну.

Підвищення активності амінотрансфераз в серці при введенні гліцеролу може свідчити про їх індукцію, спрямовану на підтримку роботи циклу Кребса та забезпечення енергопостачання серцевого м'язу в стресовій ситуації. Протективний ефект аргініну за цих умов, вочевидь, пов'язаний з властивостями NO як вазодилатора, що дозволяє достатньо забезпечувати серцевий м'яз киснем і покращувати тканинне дихання.

Підвищення вмісту сечовини в сироватці крові при введенні тваринам гліцеролу свідчить про посилення азотного обміну за умов стресу, залучання амінокислот в процес глюконеогенезу, що підтверджується нашими даними про підвищення активності ТАТ в печінці, АлАТ та АсАТ в нирках за умов експерименту. Посилюючий ефект аргініну на дію гліцеролу в ранні терміни, вочевидь, пов'язаний із залучанням аргініну до азотного обміну та, як наслідок, зі збільшенням вмісту сечовини в крові. В той же час, введення аргініну попереджало підвищення вмісту сечовини в сироватці крові, спричинене гліцеролом, через добу, що, можливо, обумовлюється взаємовідносинами аргінази та NO-синтаз, що мають загальний субстрат – аргінін. Підвищення вмісту креатиніну в сироватці крові за умов нашого експерименту може бути наслідком посилення розпаду в м'язовій тканині креатинфосфату, а також порушенням ниркової фільтрації, що спостерігається при рабдоміолізі (Vanholder et al., 2000). При цьому здатність аргініну модулювати вміст креатиніну в сироватці крові, вочевидь, пов'язана з особливостями дії NO, що впливають на роботу ниркового фільтру.

Про активацію печінкової аргінази при введенні гліцеролу свідчать дані про підвищення вмісту сечовини в сироватці; виявлене нами зниження активності ферменту може бути пов'язане з його витоком в кров, про що говорилось вище. Зменшення аргіназної активності в усіх досліджуваних нами органах може бути спричинене не тільки витоком ферментного білку з тканин в кров: при оксидативному стресі може відбуватися хімічна модифікація аргінази, а також окислення Mn^{2+} , який є активатором ферменту. Захисний ефект аргініну щодо активності аргінази при введенні гліцеролу виявляє органну специфічність. Взаємовідносини аргінази та NO-синтаз можна спостерігати в нирках та серці, коли введення аргініну спричинювало зниження активності аргінази.

Список літератури

Бабушкіна А.В. L-аргінин // Укр. мед. журнал. – 2009. – №6, вып.74. – С. 41–53. /Babushkina A.V. L-arginin // Ukr. med. zhurnal. – 2009. – №6, vyp.74. – S. 41–53./

- Зенков Н.К., Меньщикова Е.Б., Реутов В.П. NO-синтазы в норме и при патологии различного генеза. – М.: Слово, 2000. – С. 30–34. /Zenkov N.K., Men'shchikova Ye.B., Reutov V.P. NO-sintazy v norme i pri patologii razlichnogo geneza. – M.: Slovo, 2000. – S. 30–34./
- 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. /Kaliman P.A., Okhrimenko S.M. Tsikl glyukoza-zhirnyye kisloty pri oksidativnom stresse u krysv, vyzvanom khloridom koba'l'ta // Ukr. biokhim. zhurn. – 2005. – T.77, №2. – S. 154–158./
- Конторщикова К.Н. Перекисное окисление липидов в норме и патологии. – Н.Новгород: Наука, 2000. – 24с. /Kontorshchikova K.N. Perekisnoye okisleniye lipidov v norme i patologii. – N.Novgorod: Nauka, 2000. – 24s./
- Меньщикова Е.Б., Ланкин В.З., Зенков Н.К. и др. Окислительный стресс. Проксиданты и антиоксиданты. – М.: Слово, 2006. – 553с. /Men'shchikova Ye.B., Lankin V.Z., Zenkov N.K. i dr. Okislitel'nyy stress. Prooksidanty i antioksidanty. – M.: Slovo, 2006. – 553s./
- Охрименко С.М., Яковенко М.Г., Журова М.А. та ін. Особливості метаболізму при експериментальному рабдоміолізі у щурів різного віку // Матеріали ІХ Межд. симпозиума «Биологические механизмы старения». – Харьков, 2010. – С. 60–61. /Okhrimenko S.M., Yakovenko M.G., Zhurova M.A. ta in. Osoblyvosti metabolizmu pry eksperymental'nomu rabdomiolizi u shchuriv riznogo viku // Materialy IX Mezhd. simpoziuma «Biologicheskiye mekhanizmy stareniya». – Khar'kov, 2010. – S. 60–61./
- Bryan N.S., Bian K., Murad F. Discovery of the nitric oxide signaling pathway and targets for drug development // *Frontiers in Bioscience*. – 2009. – Vol.14. – P. 1–18.
- Obrooch A.V., Lykova O.A., Puzanova V.S. et al. The action of L-arginine and Zn-protoporphyrin on some parameters of antioxidant-prooxidant balance in rat tissues under experimental rhabdomyolysis // Матеріали ІV Міжн. конф. молодих вчених «Біорізноманіття. Екологія. Адаптація. Еволюція». – Одеса: Печатный дом, 2009. – С. 166–167. /Obrooch A.V., Lykova O.A., Puzanova V.S. et al. The action of L-arginine and Zn-protoporphyrin on some parameters of antioxidant-prooxidant balance in rat tissues under experimental rhabdomyolysis // Materialy IV Mizhn. konf. molodykh vchenykh «Bioriznomanittya. Ekologiya. Adaptatsiya. Evolyutsiya». – Odesa: Pechatnyy dom, 2009. – S. 166–167./
- Vanholder R., Sever V.S., Ereke E. et al. Rhabdomyolysis // *J. Am. Soc. Nephrol.* – 2000. – Vol.11. – P. 1553–1561.

Представлено: В.І.Жуков / Presented by: V.I.Zhukov

Рецензент: Н.І.Буланкіна / Reviewer: N.I.Bulankina

Подано до редакції / Received: 14.11.2011