

СТАН ВУГЛЕВОДНОГО ТА АЗОТИСТОГО МЕТАБОЛІЗМУ В ТКАНИНАХ ЩУРІВ ЗА ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНОГО РАБДОМІОЛІЗУ

© П. А. КАЛИМАН, С. М. ОХРИМЕНКО

*Харківський національний університет ім. В. Н. Каразіна, Україна;
e-mail: s.okhrimenko@mail.ru*

Вивчено вплив введення гліцеролу на вміст тіолів та показники вуглеводного та азотистого метаболізму в органах щурів in vivo. Встановлено зниження вмісту непротеїнових тіогруп у печінці, нирках та серці, протеїнових — в нирках та серці щурів після введення гліцеролу, що може бути пов'язано з їх окисленням в умовах надмірного надходження в тканини вільного гему за рабдоміолізу. У печінці знижується вміст глікогену та підвищується активність тирозинамінотрансферази. Про активацію азотистого метаболізму після введення гліцеролу свідчать підвищення активності амінотрансфераз у тканинах, а також показники вмісту сечовини в сироватці крові тварин. Підвищення вмісту креатиніну може свідчити про порушення фільтрувальної функції нирок.

Ключові слова: рабдоміоліз, стрес, адаптація, тіоли, амінотрансферази, глюкоза, щури.

Рабдоміоліз — руйнування поперечно-смугастих м'язів, що спричинює вивільнення продуктів розпаду міоцитів у міжклітинну рідину та системний кровотік. Основною токсичною сполукою, що вивільнюється під час рабдоміолізу, є міоглобін. У нормі міоглобін зв'язується із глобуліном плазми. За інтенсивного його вивільнення плазма не в змозі зв'язати весь міоглобін, що надходить у кров, внаслідок чого він фільтрується крізь гломерулярний фільтр та потрапляє до каналців нирок, де може спричинити обструкцію каналців та порушення функції нирок [1–3]. Однією з провідних причин рабдоміолізу є краш-синдром — міоліз внаслідок компресії м'язової тканини з наступною реперфузією, що спостерігається за нещасних випадків або стихійного лиха. Також рабдоміоліз може розвиватись у разі гіпертермії, гіпотермії, тривалої гіпокнезії, інфекції, введення лікарських препаратів тощо [4–6]. Непротеїновий компонент міоглобіну — гем, здатний посилювати вільнорадикальні процеси в судинному руслі та тканинах, до яких він може надходити як за рецепторопосередкованим механізмом, так і внаслідок своєї ліпофільності [7, 8]. Показано, що рабдоміоліз супроводжується посиленням процесів пероксидного окислення ліпідів (ПОЛ), утворенням активних форм кисню та нітрогену, активацією ензимів антиоксидантного захисту [9–14], що свідчить про розвиток оксидативного стресу. При цьому фор-

муються захисні реакції, які спрямовані на збереження гомеостазу і потребують значних енергетичних ресурсів. Раніше нами було показано, що за оксидативного стресу, спричиненого введенням в організм солей важких металів, підтримання пулу вільної глюкози забезпечується механізмами нейрогуморальної регуляції шляхом глікогенолізу в печінці та активації глюконеогенезу в печінці та нирках [15, 16]. У той же час процеси адаптації до підвищеного вмісту гему в крові та тканинах залишаються недостатньо вивченими. У зв'язку з цим метою наших досліджень було вивчення стану системи тіолів, а також показників вуглеводного та азотистого метаболізму в щурів в одній з моделей оксидативного стресу — експериментальному рабдоміолізі.

Матеріали і методи

Об'єкт дослідження — щури-самці лінії Вістар з масою тіла 170–220 г. Рабдоміоліз моделювали введенням 50%-го водного розчину гліцеролу в дозі 1 мл на 100 г маси тіла по 0,5 дози в кожен стегновий м'яз [17]. Маніпуляції з тваринами проводили згідно з правилами «Європейської конвенції захисту хребетних тварин, які використовуються для експериментальних та інших наукових цілей» (Страсбург, 1985 р.). Щурів брали в дослід через 4 та 24 год після введення гліцеролу із застосуванням легкого ефірного наркозу. У сироватці крові визначали вміст глюкози, сечовини, креатиніну, а також активність амінотрансфераз за допо-

могою стандартних тест-наборів. В гомогенаті печінки визначали вміст глікогену та активність тирозинамінотрансферази (ТАТ, 2.6.1.5 – L-тирозин:2-оксоглутарат амінотрансфераза); в гомогенатах печінки, нирок та серця визначали вміст протеїнових та непротеїнових SH-груп, а також активність аланін- та аспартатамінотрансфераз (АлАТ, 2.6.1.2 – L-аланін:2-оксоглутарат амінотрансфераза; АсАТ, 2.6.1.1 – L-аспартат:2-оксоглутарат амінотрансфераза) методами, які описано в роботі [16]. Оцінку вірогідності різниці у вибірках з нормальним розподіленням проводили за *t*-критерієм Стьюдента. У роботі використовували реактиви фірм Reanal (Угорщина), Fluka (Німеччина), REXIM (Франція) та вітчизняного виробництва марок хч та чда.

Результати та обговорення

Про посилення окислювальних процесів у тканинах після введення гліцеролу можуть свідчити результати визначення вмісту вільних SH-груп, що входять до складу протеїнів та непротеїнових сполук (рис. 1). Так, вміст непротеїнових SH-груп значно знижується в печінці, нирках та серці тварин вже через 4 год після введення гліцеролу – у 8–10 разів порівняно з контролем. Через добу після введення гліцеролу тільки в печінці вміст непротеїнових SH-груп є зниженим порівняно з контролем, в нирках та серці відбувається відновлення їх вмісту до рівня контролю. Вміст протеїнових SH-груп після введення гліцеролу знижений в серці та нирках – в серці в обидва досліджувані терміни, а в нирках – через 4 год. При цьому зниження вмісту протеїнових SH-груп після введення гліцеролу відбувається в значно меншій мірі порівняно зі зниженням вмісту непротеїнових SH-груп. Зниження вмісту непротеїнових і протеїнових SH-груп в органах щурів в умовах нашого експерименту може бути пов'язано з їх окисненням та утворенням -S-S-сполук, що зазвичай відбувається за посилення окислювальних процесів у тканинах. Одержані результати узгоджуються з даними літератури, де описано підвищення вмісту вільного гему та активація вільнорадикальних процесів у тканинах після введення тваринам гліцеролу [17]. Відомо, що надлишок гему стимулює утворення вільних радикалів та ініціює ПОЛ. Іони заліза, що входять до складу гему, взаємодіють з киснем із утворенням радикалів, що можуть виступати як ініціатори пероксидного окислення. У присутності іонів заліза (II) процес

вільнорадикального окислення набуває розгалуженого характеру:



З'являються нові вільні радикали та іони, а значить і нові продукти пероксидного окислення. Для ефективного розгалуження ланцюгів необхідно відновлення окисленого заліза за рахунок сульфгідрильних груп:



Внаслідок цього відновлене залізо здатне ініціювати утворення нових $\text{RO}\cdot$ за взаємодії з молекулою гідропероксиду ROOH . Зниження вмісту непротеїнових та протеїнових SH-груп в органах щурів за введення гліцеролу може свідчити про активне залучення їх до окисних реакцій, причому не тільки за участю іонів заліза. Окислення SH-груп протеїнів супроводжується зміною їхньої структури та властивостей, для тіолових ензимів – зміною каталітичної активності; непротеїнові тіоли – глутатіон та сірковмісні амінокислоти – виявляють за цих умов антиоксидантні властивості, відновлюючи різні окислені субстрати. Нормалізація вмісту непротеїнових SH-груп в нирках та серці щурів через добу після введення гліцеролу може бути пов'язана з адаптивним синтезом глутатіону, що активується в умовах оксидативного стресу. Відсутність нормалізації вмісту непротеїнових SH-груп в печінці через добу після введення гліцеролу може бути пов'язана з високою метаболічною активністю цього органа та, як наслідок, з більшою кількістю окислювальних реакцій в умовах нашого експерименту. Відновлення вмісту протеїнових SH-груп в нирках через добу після введення гліцеролу разом із відновленням вмісту непротеїнових SH-груп в них у цей термін може свідчити про здатність тканини нирок відновлювати окислювально-відновний баланс протягом доби після введення гліцеролу. В серці щурів через добу після введення гліцеролу така рівновага ще не встановлюється, про що свідчить знижений вміст протеїнових SH-груп в цьому органі. В печінці через добу після введення гліцеролу спостерігається підвищення вмісту протеїнових SH-груп, що може бути пов'язано з адаптивним синтезом SH-вмісних протеїнів, насамперед металотіонеїнів, що здійснюється за надходження до організму деяких металів, а також у разі підвищення в крові рівня глюкокортикоїдів [19].

Додатковим свідченням посилення окислювальних процесів у тканинах після введення

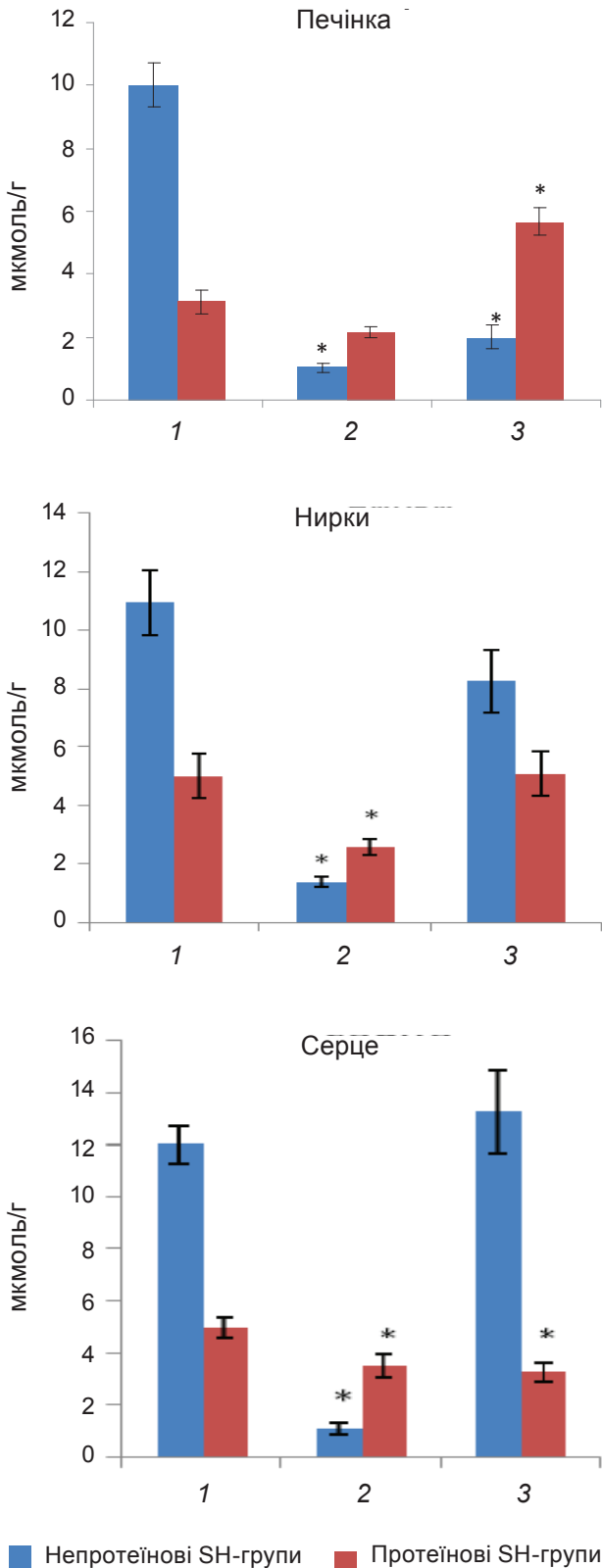


Рис. 1. Вміст SH-груп в органах щурів за введення гліцеролу: 1 – контроль, 2 – через 4 год після введення гліцеролу, 3 – через 24 год ($M \pm m$, $n = 8-12$). * Дані вірогідно відрізняються від контролю, $P < 0,05$

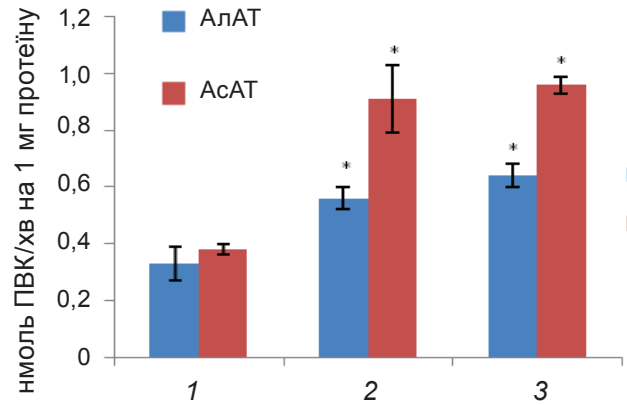


Рис. 2. Активність амінотрансфераз в сироватці крові щурів за введення гліцеролу: 1 – контроль, 2 – через 4 год після введення гліцеролу, 3 – через 24 год ($M \pm m$, $n = 5-8$). * Дані відрізняються вірогідно порівняно з контролем, $P < 0,05$

ня тваринам гліцеролу можуть бути результати визначення активності амінотрансфераз у сироватці крові (рис. 2). Так, активність АлАТ та АсАТ у сироватці крові через 4 год після введення гліцеролу підвищується вдвічі і залишається підвищеною через добу. Підвищення активності АлАТ та АсАТ в сироватці крові є свідченням витоку ензимних протеїнів із тканин, що стає можливим завдяки структурно-функціональним змінам плазматичних мембран внаслідок посилення в них процесів ПОЛ, а також окислювальної модифікації мембранних протеїнів за надходження в тканини великої кількості вільного гему.

Про підвищену потребу організму в енергетичних субстратах в умовах експериментального рабдоміолізу свідчать дані про зниження вмісту глікогену в печінці щурів – в 3,5 та 4 рази через 4 год та через добу відповідно (рис. 3). При цьому активація глікогенолізу через 4 год після введення гліцеролу супроводжується підвищенням вмісту глюкози в сироватці крові тварин (рис. 3). Оскільки глікоген-фосфорилаза – ключовий ензим глікогенолізу – є цАМФ-залежним ензимом, активація процесу глікогенолізу за введення гліцеролу може бути пов'язана з підвищенням вмісту внутрішньоклітинного цАМФ і свідчити про розвиток стрес-реакції в організмі. Про участь системи нейрогуморальної регуляції в адаптації метаболізму в умовах експериментального рабдоміолізу також можуть свідчити наші дані щодо активності амінотрансфераз у тканинах. Індукція синтезу досліджуваних нами амінотрансфераз відбувається за

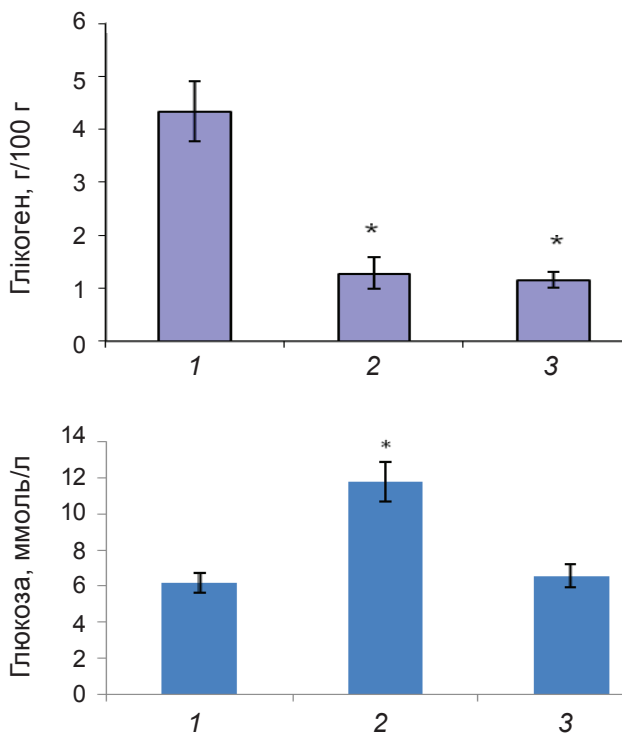


Рис. 3. Вміст глікогену в печінці та глюкози в сироватці крові щурів за введення гліцеролу: 1 – контроль, 2 – через 4 год після введення гліцеролу, 3 – через 24 год ($M \pm m$, $n = 6-8$). * Дані відрізняються вірогідно порівняно з контролем, $P < 0,05$

підвищення вмісту в крові глюкокортикоїдів в умовах будь-якої стресової ситуації. Так, в печінці, де міститься індукцйельна форма тирозинамінотрансферази, активність цього ензиму підвищується майже наполовину через добу після введення гліцеролу (рис. 4). Активність АлАТ та АсАТ підвищується в усіх досліджуваних органах щурів за введення гліцеролу, причому підвищення активності обох ензимів спостерігається вже через 4 год і залежно від органа складає 50–150% порівняно з контролем. Через добу після введення гліцеролу активність АлАТ та АсАТ значно підвищується в нирках, а активність АлАТ – ще й в печінці (рис. 5). Підвищення активності амінотрансфераз в органах щурів за введення гліцеролу свідчить про посилення обміну амінокислот в умовах рабдоміолізу, що є складовою частиною адаптивних процесів в організмі тварин. Так, одним з найважливіших адаптивних процесів є глюконеогенез, ключові ензими якого, як і амінотрансферази, знаходяться під контролем глюкокортикоїдів. Активація глюконеогенезу супроводжується залученням великої кількості амінокислот як

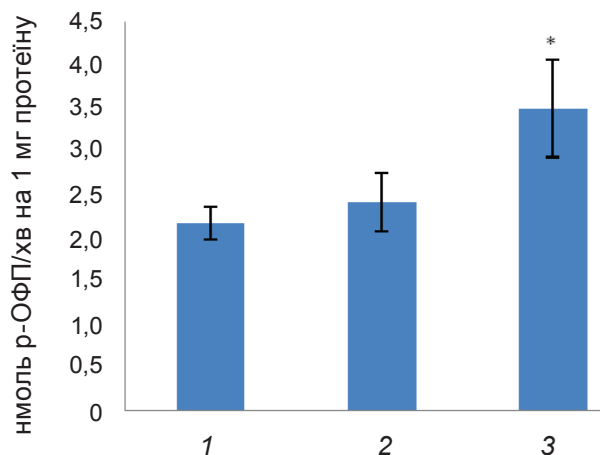


Рис. 4. Активність тирозинамінотрансферази в печінці щурів за введення гліцеролу: 1 – контроль, 2 – через 4 год після введення гліцеролу, 3 – через 24 год ($M \pm m$, $n = 5-8$). * Дані відрізняються вірогідно порівняно з контролем, $P < 0,05$

субстратів для синтезу глюкози і, відповідно, підвищенням активності амінотрансфераз. Оскільки процес глюконеогенезу відбувається в печінці та нирках, підвищення активності амінотрансфераз в цих органах може свідчити про активацію синтезу глюкози в умовах рабдоміолізу. При цьому слід зазначити, що через добу після введення гліцеролу залучення амінокислот до адаптивних процесів в печінці та нирках триває, що підтверджується підвищенням активності АлАТ та АсАТ. Підвищення активності АлАТ та АсАТ в серці щурів через 4 год після введення гліцеролу може бути пов'язане з інтенсифікацією циклу Кребса, коли в умовах стресу серцевий м'яз потребує значно більше енергії для скорочення, а амінотрансферази забезпечують підтримання потрібного рівня оксалоацетату та α -кетоглутарату – важливих компонентів циклу; при цьому АлАТ регулює ще й рівень пірувату, що є субстратом для утворення ацетил-КоА.

Дані про підвищення активності амінотрансфераз в органах щурів за введення гліцеролу узгоджуються з результатами визначення вмісту сечовини в сироватці крові, що свідчить про посилення азотистого метаболізму в умовах рабдоміолізу (рис. 6). Так, через 4 год після введення щурам гліцеролу вміст сечовини в сироватці крові підвищується наполовину, а через добу майже вдвічі перевищує показники контролю. Також у сироватці крові встановлено підвищення вмісту креатиніну після введення гліцеролу – вдвічі через 4 год

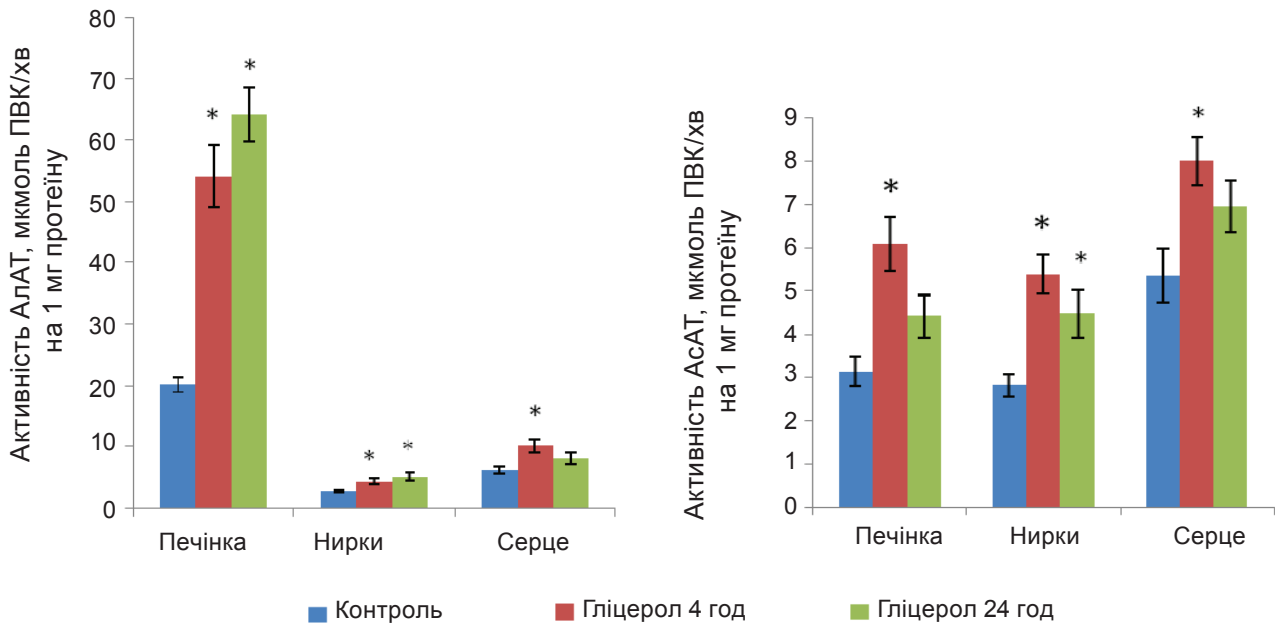


Рис. 5. Активність аланінамінотрансферази та аспартатамінотрансферази в органах щурів за введення гліцеролу ($M \pm t$, $n = 6-9$). * Дані відрізняються вірогідно порівняно з контролем, $P < 0,05$

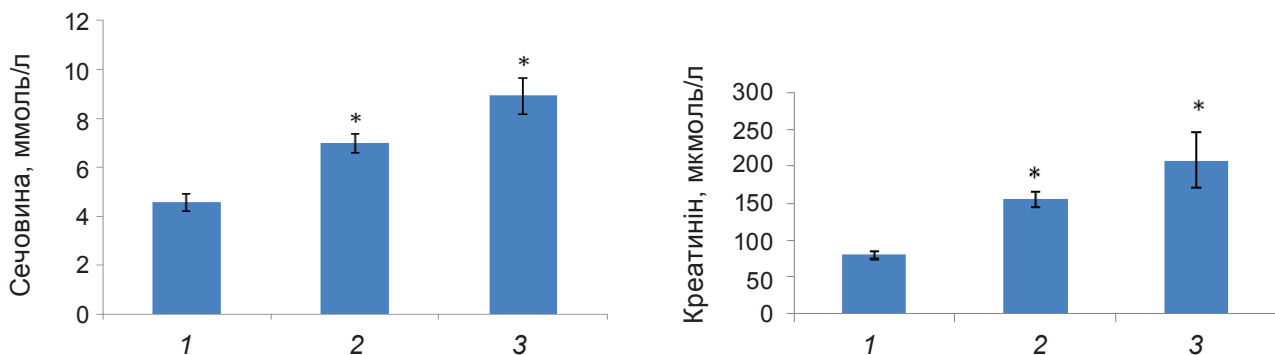


Рис. 6. Вміст сечовини та креатиніну в сироватці крові щурів за введення гліцеролу: 1 – контроль, 2 – через 4 год після введення гліцеролу, 3 – через 24 год ($M \pm t$, $n = 8-12$). * Дані відрізняються вірогідно порівняно з контролем, $P < 0,05$

та в 2,5 рази через добу (рис. 6). Підвищення вмісту креатиніну в сироватці крові тварин може свідчити про порушення фільтрувальної функції нирок вже протягом першої доби після введення гліцеролу та пов'язаного з цим масованого вивільнення міоглобіну та гему. Обструкція ниркових каналців, що призводить до гострої ниркової недостатності в умовах рабдоміолізу різного генезу, описана в роботах [2, 6, 10].

Таким чином, підвищення вмісту вільного гемму в крові та тканинах в умовах рабдоміолізу спричинює зміни в системі тіолів, які за-

лежать від терміну дії пошкоджуючого чинника та властивостей тканин організму. В умовах рабдоміолізу відбувається активація гормонозалежних процесів – глікогенолізу в печінці та переамінування амінокислот в печінці та інших органах, що свідчить про розвиток стрес-реакції в організмі тварин, спрямованої на підтримку гомеостазу. В той же час, підвищення вмісту креатиніну в сироватці крові в умовах нашого експерименту може свідчити про порушення фільтрувальної функції нирок.

СОСТОЯНИЕ УГЛЕВОДНОГО И АЗОТИСТОГО МЕТАБОЛИЗМА В ТКАНЯХ КРЫС ПРИ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОМ РАБДОМИОЛИЗЕ

П. А. Калиман, С. М. Охрименко

Харьковский национальный университет
им. В. Н. Каразина, Украина;
e-mail: s.okhrimenko@mail.ru

Изучено влияние введения глицерола на систему тиолов и показатели углеводного и азотистого метаболизма в органах крыс *in vivo*. Установлено снижение содержания непротеиновых тиогрупп в печени, почках и сердце, протеиновых – в почках и сердце крыс после введения глицерола, что может быть связано с их окислением в условиях избыточного поступления в ткани свободного гема при рабдомиолизе. В печени снижается содержание гликогена и повышается активность тирозин-аминотрансферазы. Об активации азотистого метаболизма после введения глицерола свидетельствует повышение активности аминотрансфераз в тканях, а также показатели содержания мочевины в сыворотке крови. Повышенное содержание креатинина в сыворотке крови может свидетельствовать о нарушении фильтрующей функции почек.

Ключевые слова: рабдомиолиз, стресс, адаптация, тиолы, аминотрансферазы, глюкоза, крысы.

CARBOHYDRATE AND NITROGENOUS METABOLISM CONDITION IN THE RAT TISSUE UNDER EXPERIMENTAL RHABDOMYOLYSIS

P. A. Kaliman, S. M. Okhrimenko

Karazin Kharkiv National University, Ukraine;
e-mail: s.okhrimenko@mail.ru

S u m m a r y

Some effects of glycerol injection on indices of the condition of the thiol-disulfide system as well as carbohydrate and nitrogen metabolism in rats *in vivo* were studied. A decrease was revealed in levels of non-protein SH-groups in the liver, kidney and heart, as well as of protein SH-groups in the kidney and heart of rats following glycerol injection. That might be connected with SH-group oxidation under the excessive arrival of free haem into tissues under rhabdomyolysis. A decrease in glycogen and increase in tyrosine aminotransferase activity in the liver were observed. Activation of nitrogenous

metabolism following glycerol injection is indicated by the increase of aminotransferase activity in organs, and concentration of blood urea. High concentration of creatinine in the rat serum can reflect malfiltration in kidneys.

Key words: rhabdomyolysis, stress, adaptation, thiols, aminotransferases, glucose, rat.

1. *Vanholder R., Sever V.S., Ereik E., Lomeire N.* // J. Am. Soc. Nephrol. – 2000. – N 11. – P. 1553–1561.
2. *Holt S., Moore K.* // Exp. Nephrol. – 2000. – N 8. – P. 114–125.
3. *Ярмагомедов А. А.* // Вестн. инт. терапии. – 2000. – № 2. – С. 52–55.
4. *Khan F. Y.* // Neth. J. Med. – 2009. – 67, N 9. – P. 272–283.
5. *Larbi E. B.* // East Afr. Med. J. – 1997. – 74, N 12. – P. 829–831.
6. *Висвесваран П., Гунтупалли Я.* // Клинические лекции по медицине критических состояний. – 1999. – 15, № 2. – С. 317–351.
7. *Jenev V., Balla J., Yachie A. et al.* // Am. Soc. Hematol. – 2002. – N 100. – P. 879–887.
8. *Филимоненко В. П.* // Вісник ХНУ. Серія: Біологія. – 2009. – С. 50–55.
9. *Reeder B. J., Sharpe M. A., Kay A. D. et al.* // Biochem. Soc. Trans. – 2002. – 30, N 4. – P. 745–748.
10. *Minigh J. L., Valentovic M. A.* // Toxicology. – 2003. – 184, N 2–3. – P. 113–123.
11. *Rodrigo R., Trujillo S., Bosco C.* // Exp. Biol. Med. – 2006. – 231, N 8. – P. 1430–1438.
12. *Moore K. P., Holt S. G., Patel R. P. et al.* // J. Biol. Chem. – 1998. – 273, N 48. – P. 31731–31737.
13. *Baliga R., Ueda N., Walker P. D., Shah S. V.* // Am. J. Kidney Dis. – 1997. – 29, N 3. – P. 465–477.
14. *Puppo A., Halliwell B.* // Free Radic. Res. Commun. – 1988. – N 4. – P. 415–422.
15. *Калиман П. А., Охрименко С. М.* // Укр. біохім. журн. – 2005. – 77, № 2. – С. 154–158.
16. *Охрименко С. М., Гурьева Н. Ю., Калиман П. А.* // Вісник ХНУ. Серія: Біологія. – 2005. – № 1–2. – С. 56–60.
17. *Филимоненко В. П., Никитченко И. В., Калиман П. А.* // Укр. біохім. журн. – 2009. – 81, № 1. – С. 34–43.
18. *Барабой В. А., Сутковой Д. А.* Окислительно-антиоксидантный гомеостаз в норме и патологии. – К.: Чернобыльинтеринформ, 1997. – 428 с.
19. *Miles A. T., Hawksworth G. M., Beattie J. H. et al.* // Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol. – 2000. – 35, N 1. – P. 35–70.

Отримано 30.09.2011