

Н. М. Кургалюк, І. В. Шостаковська

Вплив α -кетоглутарату натрію на активність ферментів переамінування та сукцинатдегідрогенази у щурів з різною резистентністю до гіпоксії

Установлено, що парентеральне введення крысам α -кетоглутарата натрія (20 мг/100 г) приводить до підвищення впливу в їх організмі холінергічного механізму регуляції та збільшення аминотрансферазної активності на фоні зниження сукцинатдегідрогенази в тканині печінки, підшлункової залози та слизової оболонки тонкої кишки. У високорезистентних до гіпоксії тварин активність ферментів переамінування та сукцинатдегідрогенази значно вища, ніж у групі низкорезистентних. Введення α -кетоглутарата натрія тваринам з низкою стійкістю до гіпоксії приводить до збільшення активності ферментів переамінування до рівня високорезистентних в контролі, одночасно підвищуючи їх резистентність. Ефект дії α -кетоглутарата натрія на енергетичний обмін в тканинах з різною парасимпатичною залежністю у тварин, в різній мірі переважає гіпоксію, нивелюється блокадою М- та Н-холінорецепторів.

Вступ

Виявлена залежність між станом вегетативного балансу у щурів і стійкістю тварин до гіпоксії показала [4], що вроджена висока резистентність (ВР) до гіпоксії значно залежить від переважання холінергічних регуляторних впливів. У низкорезистентних (НР) до гіпоксії тварин, навпаки, виявлено знижені холінергічні впливи та посилені тони симпатичної нервової системи.

Ступінь природної стійкості організму до гіпоксії корелює з кількісними характеристиками деяких показників окислювального метаболізму тканин, зокрема мітохондріального та мікросомального окислення [5, 6]. Тварини з ВР мають меншу швидкість окислення сукцинату, ніж щури з НР. Однак ефективність окисного фосфорилування у них вища, ніж у щурів з НР. Мітохондрії (МХ) печінки щурів з ВР в енергетичному відношенні відрізняються більш економним режимом роботи порівняно з МХ щурів з НР. Згідно з цими дослідженнями, щури з ВР мають потужнішу систему окислювальної детоксикації печінки, що може забезпечити їм порівняно з тваринами з НР підвищену стійкість до впливу токсичних сполук.

α -кетоглутарат (α -КГЛ) – природний метаболіт організму людини і тварин – відомий як медіатор циклу трикарбонових кислот (ЦТК). Поряд з цим йому властива здатність підвищувати холінергічний статус організму [10, 15]. Дія α -КГЛ зумовлює підвищення вмісту ацетилхоліну, зниження концентрації катехоламінів і активності холінестераз тканин і цільної крові [8], стимулює дихання та окисне фосфорилування, підвищує ефективність

використання кисню для синтезу макроергів, активує субстратне фосфорилування. Всі ці ефекти α -КГЛ натрію спрямовані на обмеження дії сильних стресорних чинників, пов'язаних з нагромадженням катехоламінів, підвищенням окислення сукцинату, активацією сукцинатдегідрогенази (СДГ), що призводять до роз'єднання процесів дихання та окисного фосфорилування [1]. Переключення дихання з сукцинат- на α -КГЛ-залежне дихання надзвичайно важливе для більш ефективного енергетичного забезпечення діяльності клітин і підвищення резистентності організму до екстремальних навантажень.

Мета нашої роботи — вивчення впливу α -КГЛ натрію на активність ферментів переамінування та СДГ у щурів з різною резистентністю до гіпоксії.

Методика

Досліджували травні залози (печінка, підшлункова залоза, слизова оболонка тонкої кишки) білих щурів. Тварин утримували за умов віварію на стандартному раціоні. Перед експериментом їх попередньо розподілили на дві групи — ВР і НР до гіпоксії [2]. α -КГЛ натрію щурам вводили внутрішньоочеревинно у дозі 20 мг на 100 г маси тіла. Час дії α -КГЛ становив 30 хв. Холіноблокатори атропін і бензогексоній — у дозі 0,5 мг на 100 г вводили за 30 хв до ін'єкції α -КГЛ натрію. Ефекти ін'єкції останнього контролювали введенням рівного об'єму (1 мл) 0,9 %-го розчину NaCl.

Активність ферментів переамінування — аланін- і аспаратамінотрансферази (АлАТ і АсАТ) вивчали в гомогенатах тканин за методикою Осадчої [13], СДГ — за методом Єщенка і Вольського [9]. Визначали вміст ацетилхоліну (АХ) за Хестрінім [14] у модифікації Mc Дональді [17]. Досліджувані показники визначали за наважкою тканин, розтертих до порошкоподібного стану в середовищі рідкого азоту. Гомогенати готували з врахуванням видової специфіки тканин. Середовища містили (ммоль/л) для печінки: сахароза — 300, тріс-буфер — 10, для підшлункової залози: сахароза — 250, тріс-буфер — 40, для слизової оболонки тонкої кишки: сахароза — 250, тріс-буфер — 20 (рН 7,4). Гомогенат заморожували у рідкому азоті з наступним розморожуванням на льоду для руйнування мембран МХ. Вміст білка визначали за Лоурі [16]. Для побудови калібрувальної кривої використовували бичачий альбумін сироватки крові фірма («Serva» США).

Статистичну обробку результатів проводили з використанням критерію *t* Стьюдента. Для визначення міри спряження між окремими досліджуваними показниками і спрямованості існуючого між ними зв'язку визначали коефіцієнт кореляції [7].

Результати та їх обговорення

Встановлено, що у щурів з ВР і НР найвища амінотрансферазна активність властива тканині печінки, а найнижча — слизовій оболонці тонкої кишки. У тварин з ВР активність АлАТ та АсАТ у контролі достовірно була вище, ніж у групі з НР у тканині печінки, підшлунковій залозі та слизовій оболонці тонкої кишки (таблиця). Це засвідчує неоднакову дію амінотрансфераз у тварин з різною резистентністю до гіпоксії, що може впливати на енергетичне забезпечення субстратами циклу Кребса [2, 11].

Активність аланін- і аспартатамінотрансфераз (мкмоль пірувату $\text{Na}\cdot\text{г}^{-1}\cdot\text{год}^{-1}$) та сукцинатдегідрогенази (нмоль сукцинату $\text{Na}\cdot\text{мг}^{-1}$ білка $\cdot\text{хв}^{-1}$) у високо- та низькорезистентних до гіпоксії тварин (n = 5)

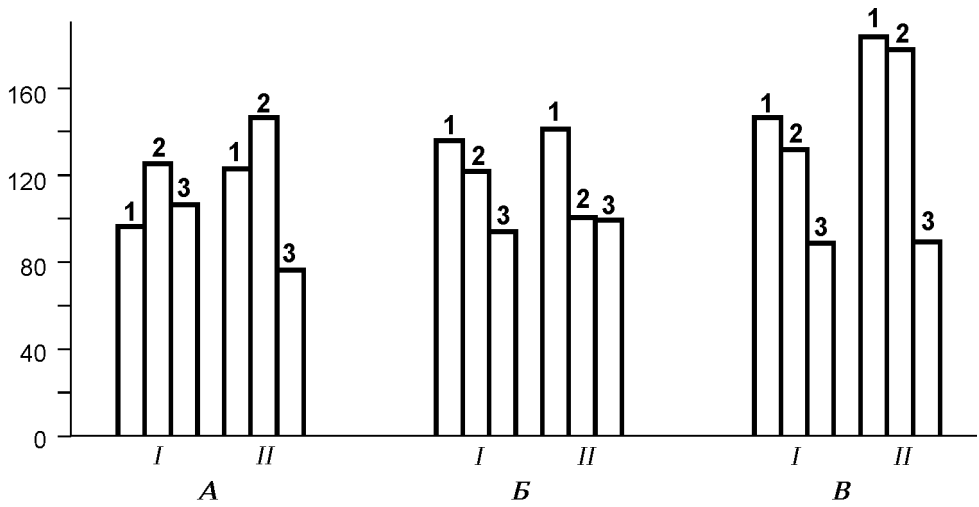
Об'єкт дослідження	Амінотрансферазна активність				Активність сукцинатдегідрогенази	
	АлАТ		АсАТ		Високо-резистентні щури	Низько-резистентні щури
	Високо-резистентні щури	Низько-резистентні щури	Високо-резистентні щури	Низько-резистентні щури		
Печінка	956±19*	650±17	765±14*	685±10	13,16±0,27*	11,15±0,16
Підшлункова залоза	330±22**	263±4,0	368±6,5*	225±7,5	4,54±0,35**	2,88±0,52
Слизова оболонка тонкої кишки	167±12*	117,3±1,8	197±26	149±31	5,02±1,25	3,34±0,71

*P < 0,01, **P < 0,05.

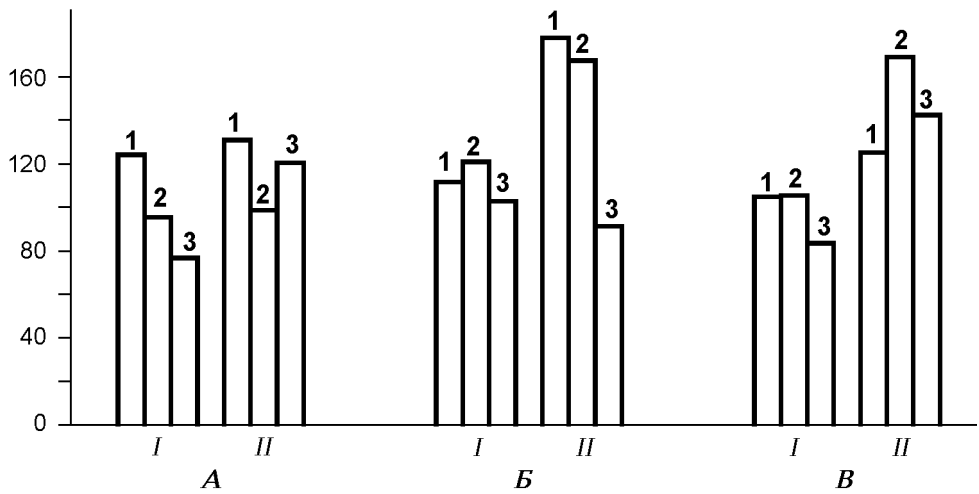
Введення α -КГЛ тваринам з ВР призводило до деякого зниження активності АлАТ, що може сприяти утилізації пірувату [12], водночас у тварин з НР спостерігалось підвищення активності вказаного ферменту на 22 % (P < 0,05) порівняно з контрольною групою тварин з ВР (рисунок, а). За цих умов активність АсАТ в обох випадках була підвищеною (123 і 129 % відповідно; P < 0,05) (див. рисунок, б). Блокада М-холінорецепторів атропіном у тварин з ВР і з НР призводила до підвищення активності АлАТази, водночас активність іншого ферменту — АсАТ наближалася до рівня контрольних значень (96 і 98 % для щурів з ВР і НР). Блокада М- і Н-холінорецепторів атропіном і бензогексонієм при введенні α -КГЛ суттєво знижувала активність АлАТ у щурів НР (76 %, P < 0,01), а також — до цих же значень активність АсАТ (76 %, P < 0,01) у щурів з ВР. Отже, блокада холінорецепторів усувала зміни активності АлАТ і АсАТ у різних групах тварин, зумовлені введенням α -КГЛ.

Введення α -КГЛ проявляється сильніше у тканині підшлункової залози порівняно з тканиною печінки, оскільки введення препарату в усіх випадках призводило до збільшення трансаміназної активності в обох групах тварин. Проте в групі з НР ця активація проявлялася на істотно вищому відсотковому рівні: так, підвищення АлАТази становило 142 % (P < 0,01) при 135 % у щурів з ВР, а активності АсАТ — 173 % (P < 0,01) при 110 % у групі щурів з ВР. Ці результати свідчать, що екзогенний α -КГЛ підвищує низький рівень амінотрансферазної активності у щурів з НР, наближаючи активність АлАТ і АсАТ до рівня щурів з ВР. Введення КГЛ на фоні блокади холінорецепторів атропіном призводило до значного зниження активності амінотрансфераз, а повна блокада М- і Н-холінорецепторів повністю усувала стимулюючий вплив α -КГЛ у щурів обох груп, у тварин з ВР — найбільше у тканині підшлункової залози. Відома висока холінергічна залежність цього органа [3], що значною мірою впливає на його функціонування.

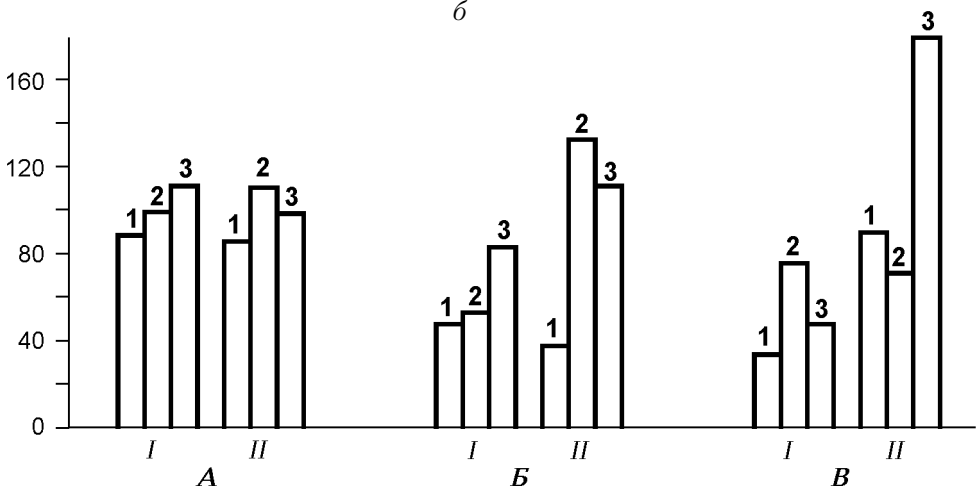
Істотний відсоток підвищення активності АлАТ отримано в групі тварин з НР при введенні α -КГЛ (до 185 % від контрольних значень, P < 0,01) у тканині слизової оболонки тонкої кишки, в той час як у групі щурів з ВР



a



б



в

цей показник становив лише 146 % ($P < 0,05$). Введення медіатору активувало активність АсАТ у щурів з НР (120 %, $P < 0,05$), проте не впливало на це значення у тварин з ВР. Блокада холінорецепторів атропіном і бензогексонієм усувала повністю стимульоване α -КГЛ підвищення активності ферментів переамінування, крім активності АсАТ у щурів з НР, яке знижувалося до 137 %, проте не наближалось до рівня контролю, що вказує на існування специфіки органа та неоднозначних взаємовідносин різних ланок регуляції в тваринному організмі при дії медіатору.

Отже, при збереженні адекватних фізіологічних умов у тварин з різним станом вегетативної регуляції виявлено неоднакову активність ферментів переамінування, що значною мірою відображає стан енергетичного постачання цих метаболітів у ЦТК. Проведені дослідження показали специфічність стимулюючого ефекту α -КГЛ на активність амінотрансфераз у тварин з ВР і НР до гіпоксії, що засвідчує різну силу впливу парасимпатичної ланки регуляції на процеси переамінування, розміщені у такій послідовності: печінка < підшлункова залоза < слизова оболонка тонкої кишки.

Активация амінотрансферазного механізму перетворення ендogenous α -КГЛ при введенні екзогенного супроводжується істотним зниженням активності СДГ — ферменту, що лімітує окислення такого енергетично важливого субстрату, як сукцинат.

На основі проведених експериментів встановлено: у печінці тварин з ВР цей шлях обміну сукцинату на 18,1 % є вищим, ніж у щурів з НР, що засвідчує активність СДГ за контрольних умов (див. таблицю). Введення α -КГЛ зумовлювало зниження активності вказаного ферменту у тканині печінки в обох досліджуваних групах. Проте якщо у щурів з ВР активність СДГ знизилася до 88,2 % ($P < 0,01$), то у тварин з НР подібне зниження було виражене сильніше: до 81,6 % ($P < 0,01$). Введення α -КГЛ на фоні блокади холінорецепторів атропіном зумовлювало підвищення активності СДГ до контрольного значення у щурів з ВР і становило 97,9 %, а для групи тварин з НР навіть виявилось вищим від норми на 8,1 %, проте не було достовірним (див. рисунок, в). Отже, на фоні блокади М-холінорецепторів інгібуючий ефект екзогенного α -КГЛ на активність СДГ нівельований, що засвідчує участь холінергічного механізму в реалізації впливу КГЛ.

Беручи до уваги високу залежність підшлункової залози від холінергічних впливів, ми отримали істотніше, порівняно з тканиною печінки, зниження активності СДГ в обох групах щурів. Це значною мірою корелювало з підвищенням активності ферментів переамінування: коефіцієнт кореляції $r = -0,680$ та $-0,749$ для активності АлАТ в обох групах тварин, і $r = -0,819$ для АсАТ у групи щурів з ВР. Слід зазначити, що саме в цьому органі

Вплив введеного в організм тварин з різною резистентністю до гіпоксії α -кетоглутарату Na (20 мг/100 г) на активність аланінамінотрансферази (а), аспаргатамінотрансферази (б) і сукцинатдегідрогенази (в) у тканинах травного тракту (в % щодо контролю): А — печінка, Б — підшлункова залоза, В — слизова оболонка тонкої кишки; I — високорезистентні до гіпоксії щури, II — низькорезистентні, 1 — введення α -кетоглутарату Na; 2 — введення α -кетоглутарату Na на фоні атропіну (0,5 мг/100 г маси); 3 — введення α -кетоглутарату Na на фоні атропіну та бензогексонію (0,5 мг/100 г).

введення КГЛ спричинило зниження активності СДГ майже вдвічі у щурів з ВР порівняно з контролем, яке становило 45,5 % ($P < 0,01$) і до 34,2 % ($P < 0,01$) у щурів з НР. Отже, введення медіатору в обох групах тварин істотно обмежувало прямий шлях СДГ. При введенні α -КГЛ на фоні атропіну, а також атропіну та бензогексонію спостерігали підвищення активності СДГ, однак у жодному випадку на тваринах з ВР не отримано повного зняття інгібування активності СДГ, що становила 51 % ($P < 0,01$) та 81 % ($P < 0,05$) порівняно з контролем. У групі щурів з НР виключення М-холінорецепторів атропіном призводило до значної активації шляху СДГ перетворення янтарної кислоти при введенні медіатору.

Таким чином, на тканині з вищою залежністю від парасимпатичного контролю отримано вираженіший гальмівний вплив КГЛ на активність СДГ в обох групах щурів, які по-різному переносять стан гіпоксії.

У тканині слизової оболонки тонкої кишки порівняно з тканиною печінки і підшлункової залози введення КГЛ тваринам з ВР призводило до вираженого зниження активності дегідрогенази сукцинату — до 33 % ($P < 0,01$), а в групі тварин з НР лише до 89 %. Це засвідчує різну міру обмеження пригнічення активності СДГ у двох групах тварин. Якщо блокада атропіном призводила до деякого підвищення активності даного ферменту при введенні КГЛ до 75 % ($P < 0,05$) у групі щурів з ВР, то введення медіатору на фоні повної блокади холінорецепторів за цих умов призводило до подальшого зниження значення показника (до 45 %; $P < 0,05$). Для групи тварин з НР введення КГЛ на фоні атропіну зумовлювало подальше зниження активності СДГ до 70 % ($P < 0,05$), а повна блокада холінорецепторів за аналогічних умов призводила до активації СДГ на 79 % ($P < 0,01$) порівняно з контролем (див. рисунок, *в*).

Отже, на тканині слизової оболонки тонкої кишки виявлено високий вплив порівняно з іншими досліджуваними органами, шляху, пов'язаного зі зниженням активності СДГ при введенні α -КГЛ, особливо вираженому у тварин з переважаючим тонусом парасимпатичної нервової системи, що краще переносять і гіпоксію. Різна міра блокади холінорецепторів у цих тварин не знімає інгібування процесів у даній групі, хоча й має значення для функціональної активності вказаного ферменту. А для групи тварин з НР при повній блокаді холінорецепторів атропіном і бензогексонієм введення КГЛ за аналогічних умов різко активує цей шлях перетворення сукцинату, що характерно для патологічних процесів, пов'язаних зі значним напруженням регуляторних механізмів.

Як встановив кореляційний аналіз, між підвищенням активності холінергічної ланки регуляції організму при введенні КГЛ двом групам щурів і змінами в енергетичному обміні існує тісний від'ємний кореляційний зв'язок. Так, коефіцієнт кореляції становить $r = -0,954$ між накопиченням вмісту ацетилхоліну і зниженням активності СДГ для групи тварин з ВР, для тварин з НР $r = -0,871$.

Результати дослідження свідчать: виявлена специфіка органів при дії α -КГЛ на досліджувані показники енергетичного обміну та систему ХЕ — ацетилхолін у тварин, які по-різному чутливі до гіпоксії, відображає вплив парасимпатичної ланки регуляції на окремі травні залози. Підвищення ак-

тивності АЛАТ та АсАТ (шляхів постачання субстратів у ЦТК) на фоні обмеження активації СДГ, дає можливість здійснити корекцію енергетичного обміну організму загалом, за допомогою активації холінергічних регуляторних механізмів.

N. M. Kurgalyuk, I. V. Shostakowskaya

**EFFECT OF SODIUM α -KETOGLUTARATE INJECTION
ON THE SUCCINATEDEHYDROGENASE
AND TRANSAMINATION ENZYMES ACTIVITY
IN RATS WITH DIFFERENT HYPOXIA RESISTANCE**

It has been found that intraperitoneal α -ketoglutarate injection (20 mg/100 g body weight) results in increase in the influence of cholinergic regulation mechanisms. It also results in increase of aminotransferase activity on background of the decrease of succinate dehydrogenase activity in liver and pancreas tissues and in small intestines mucous. Activity of transamination enzymes and succinate dehydrogenase activity is much higher in the case of rats with high hypoxia resistance, α -ketoglutarate injection results in increase of transamination enzymes activity in the organisms of rats with low resistance to hypoxia up to the control level of rats with high resistance, and simultaneously increases rats resistance to hypoxia. Effect of α -ketoglutarate injection on the energetical exchange in the tissues with different parasympathetic dependence taking from the animals with different hypoxia resistance is suppressed by blockade of M- and H-cholinoceptors.

I. Franko University, Ministry of Education, Lviv

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. *Абдулла Локаль, Доліба М.М., Ємчик Н.М., Кургалюк Н.М.* Роль альфа-кетоглутарової кислоти в попередженні постстресорних змін енергетичного обміну в мітохондріях міокарда // Механізм біологічної дії радіації та інших екстремальних факторів навколишнього середовища. — Львів: Світ, 1994. — С. 74-79.
2. *Березовський В.А.* Гипоксия и индивидуальные особенности реактивности. — К.: Наук. думка, 1978. — С. 216.
3. *Богер М.М.* Методы исследования поджелудочной железы. — Новосибирск: Наука, 1982. — С. 25-26.
4. *Вадзюк С.Н.* Особенности холинергической регуляции сердца у высоко- и низкоустойчивых к гипоксии крыс: Автореф. дис. ... канд. мед. наук. — Львов, 1983. — 14 с.
5. *Горчакова Л.А.* Исследование связи между устойчивостью крыс к острой гипоксической гипоксии и активностью микросомальной системы окисления печени // Физиол. журн. — 1987. — **33**, № 3. — С. 53-58.
6. *Горчакова Л.А.* Митохондриальное и микросомальное окисление в печени крыс с различной естественной устойчивостью к гипоксии // Актуальные проблемы современной физиологии. — К.: Наук. думка, 1986. — С. 163-164.
7. *Деркач М.П., Гумецкий Р.Я., Чабан М.Є.* Курс варіаційної статистики. — К.: Вища школа, 1977. — 207 с.
8. *Доліба М.М., Кургалюк Н.М., Музика Ф.В. та ін.* Синергізм дії α -кетоглутарату і ацетилхоліну на енергетичний обмін в мітохондріях // Физиол. журн. — 1993. — **39**, № 5-6. — С. 65-70.
9. *Ещенко Н.Д., Вольский Г.Г.* Определение количества янтарной кислоты и активности сукцинатдегидрогеназы. — В кн.: Методы биохимических исследований: Сб. научн. ст. — Л.: Изд-во Ленинград. ун-та, 1982. — С. 207-212.

10. *Музыка Ф.В.* Влияние α -кетоглутарата на энергетический обмен в митохондриях печени в зависимости от степени активации холинэргической нервной системы: Автореф. дис. ...канд. биол. наук. — Львов, 1992. — 18 с.
11. *Назаренко А.И.* Влияние острой кислородной недостаточности на тканевое дыхание высокоустойчивых и низкоустойчивых к острой гипоксии крыс. — В кн.: Кислородный гомеостазис и кислородная недостаточность. — К.: Наук. думка, 1978. — С. 93-98.
12. *Нилова Н.С.* Влияние ацетилхолина на активность аминотрансфераз и дегидрогеназ в митохондриальной фракции головного мозга // Укр. биохим. журн. — 1973. — **45**, № 6. — С. 688-692.
13. *Осадчая Л.М.* Определение активности аминотрансфераз в тканях // Методы биохимических исследований (липидный и энергетический обмен). — Л.: Изд-во Ленинград. ун-та, 1982. — С. 246-250.
14. *Hestrin S.* The reaction of Acetylcholine and other carboxylic acid derivatives with hydroxylamine and its analytical application // J. Biol. Chem. — 1949. — № 1. — P. 243-250.
15. *Kurgaljuk N.M.* Investigation of indices of energetical exchange in digestive glands and myocard of rats with different hypoxia resistance. — In: 9th European Bioenergetics Conference. EBEC short reports. August 17-22. — 1996. — **9**. — P. 179.
16. *Lowry O., Rosenbrough N., Farr A. et al.* Protein measurements with the Folin protein reagent // J. Biol. Chem. — 1951. — **193**. — P. 265-275.
17. *McDonald K.P., Gerber C., Nielson M.D.* Ultramicrodetermination of acetylcholine in cerebrospinal fluid // Harp. Hasp. Bull. — 1955. — № 25. — P. 1367.

*Львів. ун-т ім. І. Франка
М-ва освіти України*

*Матеріал надійшов
до редакції 31.10.97*