

*Кліх Л.В., Мельничук Д.О., акад. УААН та НАН України,
Мельникова Н.М., к.б.н.*

ВПЛИВ СТРОНЦІЄВОГО ОТРУЄННЯ НА ВМІСТ СУБСТРАТІВ ГЛІКОЛІЗУ І ЦИКЛУ ТРИКАРБОНОВИХ КИСЛОТ В ОРГАНІЗМІ ЩУРІВ

Національний аграрний університет, Київ

Екологічну ситуацію, в якій знаходиться наша цивілізація на даному етапі розвитку, можна охарактеризувати як кризову. Першоджерелом і першопричиною бурхливого розвитку глобальної екологічної кризи є, як вважають міжнародні експерти, демографічний вибух, тобто дуже швидке зростання населення нашої планети, що неодмінно супроводжується збільшенням темпів і обсягів знищення природних ресурсів, нагромадженням величезної кількості відходів виробництва і побуто, які людство поки що не може переробити, знищити або утилізувати, забрудненням довкілля, глобальними кліматичними змінами, хворобами, голодом [2,10].

Фахівці класифікують забруднення природного середовища на основі різних принципів, але загалом нині ці забруднення можна поділити на такі групи: механічні, хімічні, фізичні, біологічні. Одним з найбільш небезпечних видів забруднень навколишнього середовища є хімічне. Масштаби хімічних забруднень викликали появу комплексу наукових досліджень, що ціленаправлено вивчають вплив токсичних антропогенних речовин на екологічні системи і біосферу Землі [2, 3].

Серед хімічних забруднювачів навколишнього середовища важливе місце займають важкі метали та їх сполуки, які відносяться до групи токсикантів і є факторами небезпеки для організму людини і тварин. Враховуючи зростаючі масштаби забруднення довкілля важкими металами, їх високу токсичність, здатність до кумуляції в екосистемах і спричинення шкідливого впливу, навіть в досить низьких концентраціях, ці елементи відносяться до актуальних забруднювачів навко-

лишнього середовища [9,10].

Інтерес до вивчення особливостей поширення важких металів у біосфері та їх впливу на живі організми двоякий. По — перше, метали в малих дозах можуть виступати в ролі мікроелементів, що беруть активну участь у біологічних процесах; по — друге, ці ж метали в надмірних дозах справляють значний негативний вплив на функціонування живих систем. Окрім цього, важкі метали не піддаються трансформації, що властиво органічним речовинам, і, потрапивши в біогеохімічний цикл, дуже повільно залишають його. Більшість важких металів має високу біологічну активність, тому питання профілактики негативного впливу їх на здоров'я тварин і людей потребують знання як ступеня токсичності та характеру викликаних порушень у стані здоров'я, так і гігієнічних нормативів допустимого вмісту важких металів у об'єктах біосфери, кормах та продуктах харчування [8, 10].

Серед таких викидів значне місце зайняли ізотопи стронцію. Потрапляючи в ґрунт, цей елемент по харчових ланцюгах надходить в організм тварин та людини. Велика кількість досліджень українських та зарубіжних вчених присвячена вивченню шляхів проникнення, накопичення та способів виведення цього металу з організму тварин і людини, але досліджень по вивченню біологічної ролі іонів стронцію в організмі тварин не достатньо. Накопичення іонів цього елемента, ймовірно, може призводити до окремих змін в енергетичному обміні організму тварин і людини [2,3,10].

Метою даної роботи було вивчення впливу токсичних доз солей стронцію на стан окислювального

потенціалу в клітинах та на функціонування циклу Кребса і процесу гліколізу. Для досягнення вказаних цілей в тканинах печінки визначали концентрацію ізоцитрату, малату, лактату, пірувату, глутамату, α -кетоглутарату, оксалоацетату; в крові отруєних тварин визначали рівень глюкози, аміаку та концентрацію водневих іонів.

Матеріали і методи

Дослідження проводили на базі віварію кафедри біохімії тварин, якості та безпеки сільськогосподарської продукції Національного аграрного університету. Для досліджень використали молодих самців білих щурів лінії Вістар, масою 180-200 г. Отруєння щурів проводилось шляхом введення хлориду стронцію внутрішньо-черевинно, в дозах 1/15. Дослід тривав 14 діб. Дослідження були виконані на двох групах тварин, в кожену з яких було відібрано по 12 щурів; перша група — контрольна, друга — тварини, отруєні хлоридом стронцію. Декапітацію щурів проводили згідно норм біоетики, під легким ефірним наркозом. Для проведення біохімічних аналізів відбирали зразки печінки та крові [1].

Для визначення вмісту інтермедіатів гліколізу та ЦТК використовували методи ферментативного аналізу. В даних дослідженнях використовували препарати НАД⁺, НАДФ⁺, НАДН та НАДФН, виготовлені фірмами "Merkck" та "Reanal", та кристалічні ферменти лактатдегідрогеназу (ЛДГ (КФ 1.1.1.27)), ізоцитратдегідрогеназу (ІДГ (КФ 1.1.1.41)), малатдегідрогеназу (МДГ (КФ 1.1.1.37)), глутаматдегідрогеназу (ГлДГ (КФ 1.4.1.3)), аланінамінотрансферазу (АлАТ (КФ 2.6.1.2)) та аспартатамінотрансферазу (АсАТ (КФ 2.6.1.1)), виготовлені фірмами "Sigma", "Fluka", "Lachema". Щоб визначити вміст метаболітів, печінку вилучали негайно, після декапітації, розтирали її у скрапленому азоті. З розтертої маси готували безбілкові екстракти в 6% хлорній кислоті у відношенні 1:7. Екстракт нейтралізували насиченим розчином КОН, після чого в ньому визначали концентрацію ізоцитрату, малату, лактату, пірувату, глутамату, α -кетоглутарату, оксалоацетату з використанням хімічного аналізатора СФ-46 [1,5]. Рівень глюкози визна-

чали в крові з використанням хімічного аналізатора Мікролаб-200 (Нідерланди). Вміст аміаку визначали в крові за методом Силакової.

По концентрації окислених і відновлених субстратів лактат-, глутамат- і малатдегідрогеназних систем обраховували величину співвідношення [НАД⁺/ НАДН] та [НАДФ⁺/ НАДФН] в мітохондріях і цитоплазмі [9]. Одержані результати оброблені статистично.

Результати досліджень

Отримані нами дані, представлені в табл. 1, свідчать про те, що вміст глюкози в крові отруєних стронцієм тварин вищий, ніж у крові тварин контрольної групи, майже на 33%. Крім того, в печінці токсикованих шурів збільшується концентрація пірувату (на 38%), оксалоацетату (на 54%), α -кетоглутарату (на 53%) та глутамату (на 18%).

Підвищення вмісту стронцію в тканинах токсикованих шурів супроводжується зменшенням рівня аміаку (на 42%) в порівнянні з контролем, суттєво знижується рН крові. Спостерігається зниження вмісту лактату в печінці (на 19%), вміст малату та ізоцитрату не змінюється.

Отримані нами результати частково узгоджуються з наявними відомостями про особливості обміну речовин при отруєнні тваринного організму важкими металами, а саме: підвищення рівня глюкози в крові отруєних тварин при збільшенні концентрації водневих іонів може вказувати на інтенсифікацію про-

цесів гліюконеогенезу. Останнє можна пояснити тим, що в результаті отруєння, яке призводить до підвищення концентрації іонів Н⁺ в тканинах тварин дослідної групи, значно посилюються процеси гліюконеогенезу (de novo).

В результаті отруєння в печінці зменшується вміст лактату і збільшується рівень пірувату, тому можна припустити, що при інтоксикації хлоридом стронцію знижується об'єм перетворення глюкози по анаеробному шляху, порівняно з аеробним, що не суперечить нашим попереднім дослідженням [4], які підтверджують зниження активності ферменту лактатдегідрогенази в печінці отруєних шурів. Це припущення узгоджується також з результатами досліджень інших вчених [6,12].

Як видно з табл. 1, в печінці шурів дослідної групи не змінюється вірогідно вміст ізоцитрату, при цьому зростає вміст α -кетоглутарату, з чого можна зробити припущення про те, що вміст останнього в циклі Кребса не може збільшитися за рахунок дегідрогенізації ізоцитрату, а отже збільшується за рахунок інших джерел, наприклад за рахунок реакції окислювального дезамінування глутамату, підвищення рівня якого спостерігається у тварин дослідної групи [5].

Концентрація малату у печінці отруєних шурів залишається без змін у порівнянні з контролем, тому можна припустити, що солі стронцію у введеній концентрації,

очевидно, не впливають на зміну інтенсивності протікання реакції гідратації фумарату та дегідрогенізації малату на цьому відрізку ЦТК, що не суперечить нашим попереднім дослідженням, згідно яких активність МДГ, як НАД⁺-залежної, так і НАДН-залежної, залишаються без змін [4].

Надлишок оксалоацетату, що спостерігається в печінці отруєних стронцієм тварин, очевидно, обумовлюється посиленням карбоксилюванням пірувату, підвищений вміст якого спостерігається в печінці шурів дослідної групи (табл. 1).

Багаторівневий контроль клітинного метаболізму, який забезпечує підтримання гомеостазу в постійно змінних умовах зовнішнього середовища, включає, як один із основних факторів, регуляцію так званого окисно-відновного стану вільних нікотинамідних кофакторів в компартментах клітини, що виражається як співвідношення НАД⁺/НАДН і НАДФ⁺/НАДФН. Нами проведені розрахунки таких співвідношень з використанням номограмного способу розрахунку НАД⁺/НАДН і НАДФ⁺/НАДФН [8].

Як свідчать дані табл. 2, у тварин, отруєних хлоридом стронцію, збільшується величина співвідношення [НАД⁺/ НАДН] у цитоплазмі клітин на 48%, що може бути обумовлено активацією гліюконеогенезу або гальмуванням гліюлізу. Відсутність достовірних змін співвідношення [НАДФ⁺/НАДФН] в цитоплазмі печінки контрольної та дослідної

Таблиця 1

Вміст інтермедіатів гліюлізу та ЦТК в печінці здорових та токсикованих хлоридом стронцію шурів, (мкмоль/г, М $\pm$ м, n=8)

Інтермедіати	Контроль	Токсиковані тварини
Глюкоза	3,30 $\pm$ 0,53	4,92 $\pm$ 0,26*
Лактат	3,58 $\pm$ 0,18	2,91 $\pm$ 0,18*
Піруват	0,16 $\pm$ 0,01	0,26 $\pm$ 0,01*
Ізоцитрат	0,24 $\pm$ 0,01	0,20 $\pm$ 0,02
α — Кетоглутарат	0,13 $\pm$ 0,01	0,28 $\pm$ 0,02*
Глутамат	0,67 $\pm$ 0,03	0,82 $\pm$ 0,04*
Малат	0,23 $\pm$ 0,01	0,27 $\pm$ 0,02
Оксалоацетат	0,10 $\pm$ 0,01	0,21 $\pm$ 0,02*
Аміак	20,90 $\pm$ 1,35	12,16 $\pm$ 0,44*
рН	7,34 $\pm$ 0,01	7,23 $\pm$ 0,04*

Примітка в цій та табл. 2: *- р< 0,05 у порівнянні з контролем.

Співвідношення [НАД⁺/ НАДН] та [НАДФ⁺/ НАДФН] в мітохондріях і цитоплазмі здорових і отруєних хлоридом стронцію щурів ($M \pm m$, $n=8$)

Співвідношення	Контроль	Отруєні тварини
[НАД ⁺ / НАДН] цитопл.	400	780*
[НАД ⁺ / НАДН] мітохонд.	11	9,5*
[НАДФ ⁺ /НАДФН]цитопл.	0,033	0,036

груп, очевидно, може вказувати на те, що функціонування пентозного циклу за даних умов відбувається без особливих змін. З іншого боку, оскільки величина співвідношення [НАД⁺/ НАДН] в мітохондріях

клітин печінки отруєних стронцієм тварин зменшується на 13%, то це можна розглядати як факт помірного гальмування використання водню в обмінних процесах.

Отже надлишок важких металів, а саме стронцію хлориду, в організмі щурів помітно впливає на інтенсивність перебігу реакцій циклу Кребса і процесу гліколізу в тканинах печінки.

ЛИТЕРАТУРА

1. Асатиани В.С. Ферментативные методы анализа. — М.: Наука, 1969. — 739 с.
2. Білявський Г.О., Падун М.М., Фургуй Р.С. Основи загальної екології. — К.: Либідь, 1993. — 304 с.
3. Гудков І.М., Віннічук М.М. Сільсько-господарська радіобіологія. Навч. посібник. — Житомир, 2003. — 470 с.
4. Кліх Л.В., Мельничук Д.О., Мельникова Н.М. Вплив стронцію і цезію на активність деяких ферментів гліколізу та ЦТК в організмі щурів. II міжнародна наукова конференція студентів та аспірантів "Молодь і поступ біології". — Львів, 2006. — С. 55.
5. Комаров Ф.Н., Коровкин Б.Ф., Меньшиков В.В. Биохимические исследования в клинике. -Элиста: АПП Джангар, 1999. — 249 с.
6. Мари Р., Греннер Д., Мейес П., Родуелл В. Биохимия человека. В 2-х томах. — Москва: Мир, 1993. — 2000с.
7. Мельничук Д.А., Гулий М.Ф. Вплив бікарбонату натрію, іонів Mg, Mn і Zn на деякі обмінні процеси в зрізах печінки щурів// Укр. біохім. журнал. — 1968. — №3. — С.370 — 377.
8. Мельничук Д.А., Скорик Л.В., Сулима І.М. Номограмний спосіб розрахунку величин НАД(Ф)⁺/ НАД(Ф)Н в компартментах клітини. // Укр. біохім. журнал. — 1987. — Т. 59, № 4. — С. 59-63.
9. Москалев Ю.О. Минеральный обмен. — М.: Медицина, 1985. — 288 с.
10. Старикович Л.С., Великий Л.М. Структура та функції ферментів. — Львів: Видавн. центр ЛНУ ім. І.Франка, 2002. — 233 с.
11. Трахтенберг И.М., Колесников В.С., Луковенко В.П. Тяжелые металлы во внешней среде: современные гигиенические и токсикологические аспекты. -Минск: Наука и техника, 1994. — 284 с.
12. Трахтенберг И.М., Сова Р.Е., Шефтель В.О. Показатели нормы у лабораторных животных в токсикологическом эксперименте. — М.: Медицина, 1978. — 176 с.

Л.В.Клих, Д.А. Мельничук, Н.Н. Мельникова

ВЛИЯНИЕ СТРОНЦИЕВОГО ОТРАВЛЕНИЯ НА СОДЕРЖАНИЕ СУБСТРАТОВ ГЛИКОЛИЗА И ЦИКЛА ТРИКАРБОНОВЫХ КИСЛОТ В ОРГАНИЗМЕ КРЫС

В связи с активной деятельностью человека в окружающую среду интенсивно выбрасываются стабильные и радиоактивные изотопы стронция, которые, попадая в организм животных и человека, способствуют возникновению некоторых биохимических изменений.

Целью эксперимента было изучение влияния параэнтэрального стронциевого отравления на содержание субстратов гликолиза и ЦТК, и, соответственно, состояние окислительно-восстановительного потенциала клетки в печени отравленных крыс.

L.B.Klich, D.A. Melnychuk, N.N. Melnicova

THE INFLUENCE OF STRONTIUM POISONING ON ACCOMMODATE OF SUBSTANTIALS OF GLICOLIZOU AND CREBSA'S CYCLE IN ORGANISM THE RAT'S

In experiments on the rats poisoned by salts of strontium, their substantial influence is shown on the processes of glicolizou, Crebsa's cycle and the state of oxidizing-restoration potential in the cells of liver.