

УДК 577.164.2

DOI: 10.15587/2313-8416.2015.45970

РЕГУЛЯЦІЯ АСКОРБІНОВОЮ КИСЛОТОЮ АКТИВНОСТІ ЛАКТАТДЕГІДРОГЕНАЗИ В ОРГАНАХ ЩУРІВ ПРИ ГІПОКСІЇ ЗАМКНЕНОГО ПРОСТОРУ

© О. К. Будняк, С. А. Петров, С. С. Чернадчук, А. В. Сорокін, К. Ю. Ожерельєва,
В. В. Хмельницька, І. О. Кравчук

Проведено дослідження дії різних доз аскорбінової кислоти (АК) на активність лактатдегідрогенази (ЛДГ) в органах білих нелінійних щурів при гіпоксії замкненого простору (ГЗП). АК, яку вводили щурам за 30 хв. до створення ГЗП, різним чином зменшувала активність ЛДГ у всіх органах у порівнянні з показниками гіпоксичних тварин

Ключові слова: Гіпоксія замкненого простору, аскорбінова кислота, лактатдегідрогеназа

The research of the effects of different doses of ascorbic acid (AA) on activity of lactate dehydrogenase (LDG) in the organs of white nonlinear rats with hypoxia of closed space (HCS) has been conducted. Injections of AA to rats for 30 minutes of HCS reduced the LDG activity in all organs of hypoxic animals

Keywords: hypoxia of closed space, ascorbic acid, lactate dehydrogenase

1. Вступ

Відомо, що при дії гіпоксії в тканинах істотно порушується обмін вітамінів групи В та їх коферментних форм, змінюється співвідношення між активностями ферментів циклу Кребса і ПФЦ, та спостерігається зниження активності дегідрогеназ, залежних від НАД (Ф), наприклад ЛДГ, ізоцитратдегідрогенази і малатдегідрогенази (МДГ) та ін. [1, 2].

Лактатдегідрогеназа – (ЛДГ або L-лактат: NAD-оксидоредуктаза (LDH) 1.1.1.27) – фермент, який бере участь в реакціях гліколізу. Це фермент, який характеризує загальні напрямки енергоутворення під час різних метаболічних, екстремальних і патологічних станів. Відомі роботи стосовно регуляції активності цього фермента при різних формах гіпоксії різними сполуками, у тому числі і вітамінами [3]. Але вплив аскорбінової кислоти під час дії гіпоксії замкненого простору на активність лактатдегідрогенази майже не вивчено.

2. Постановка проблеми

Метою роботи було визначити вплив різних концентрацій аскорбінової кислоти на активність лактатдегідрогенази в органах щурів при дії гіпоксії замкненого простору.

3. Літературний огляд

Гіпоксія (циркуляторна, гіпоксична, гемічна, тканинна) є провідною ланкою переважної більшості патологічних процесів [4]. Під час дії "гіпоксії замкненого простору" вміст O_2 у середовищі поступово

зменшується, а концентрація CO_2 – збільшується, що викликає пригнічення газообміну. Накопичення вуглекислоти призводить до гіперкапнії, розвитку якої супроводжується пригніченням окисних процесів. Підвищення концентрації CO_2 викликає зменшення вмісту у крові лактата й пірувата, знижується вміст глікогену в мозку, відбувається порушення регуляції ферментів циклу Кребса [5].

Аскорбінова кислота впливає на активність багатьох ферментів завдяки її редуруючим властивостям, через які вона впливає на тіолові і дисульфідні групи білків, а також на валентність металів, наявних у ферментах [6]. Разом з тим коферментна функція у АК не встановлена [7, 8]. У морських свинок при недостатності вітаміну С спостерігається зниження активності фосфогексоізомерази, фосфофруктокінази, альдолази і лактатдегідрогенази. Разом з тим масивні дози аскорбінової кислоти (до 1 г) викликали достовірне зниження активності фосфоглюкомутази [9]. Проте дія великих доз АК на активність ЛДГ істотно не вивчалася, хоча враховуючи її антиокислювальні здібності слід очікувати її вплив на загальні процеси гліколітичного окиснення. Це дослідження є продовженням досліджень напрямку вивчення некоферментних функцій вітамінів та їх похідних при дії ГЗП, наприклад, [10].

4. Матеріали та методи досліджень

Експерименти проводили на кафедрі біотії ОНУ. Білих безпородних щурів масою 320-400 г. розділили на групи: Група № 1 – контроль. Група

№ 2 – шури, які знаходилися під дією гіпоксії замкненого простору. Група № 3, 4, 5 – шури, яким вводили аскорбінову кислоту, відповідно, з розрахунку 5, 50, 500 мг / кг ваги. Такі ж дози вітаміну отримали шури шостої, сьомої, восьмої груп. Цим шурам через 30 хв. після внутрішньоочеревинної ін'єкції вітаміну С викликали гіпоксію замкненого простору за [11]. Утримання тварин і проведення експериментів проводили у відповідності з міжнародними правилами дотриманням принципів гуманності, викладеними у директиві Європейської Спільноти [12]. У гомогенатах визначали активність лактатдегідрогенази за методом [13]. Отримані дані обробляли статистично за Стьюдентом. Обрахування розходжень між декількома групами робили використовуючи метод Ньюмена-Кейсла [14], за допомогою комп'ютерної програми БІОСТАТ.

5. Апробація результатів дослідження

З початку потрібно було виявити залежність активності ЛДГ у здорових шурів від дії різних концентрацій (доз) аскорбінової кислоти. Терапевтична доза віт С для дорослих складає 0,05–0,1 г 3–5 разів/добу, тобто 150–500 мг/добу, або по максимальній дозі 7,14 мг/кг ваги дорослої людини масою 70 кг.

[15, 16]. Але є і інші розрахунки, тому терапевтичну дозу ми прийняли як 5 мг/кг. Дози – 50 та 500 мг/кг – це підвищені дози аскорбінової кислоти. Ми використали їх у дослідях для того, щоб виявити нехарактерні – некоферментні ефекти вітаміну С на показник, який вивчали – активність ЛДГ.

Отримані дані, щодо дії різних доз АК на активність ЛДГ у контрольних тварин наведені на рис. 1. Введення аскорбінової кислоти в дозі 5 мг/кг здоровим шурам підвищувало активність ЛДГ у печінці на 10 %, а у серці на 37% у порівнянні з контролем. Проте у нирках та мозку активність ЛДГ зменшувалась, відповідно на 40 та 48%. Введення в/о аскорбінової кислоти у дозі 50 мг/кг зменшувало всі показники у всіх органах. Так, в печінці активність ЛДГ складала 85 % від рівню контролю, у нирках – 57, у мозку – 60, у серці – 16 %. Доза 500 мкг/кг викликала ще більше зменшення активності ЛДГ: у печінці вона складала 53 % від рівня контролю, у мозку – 12 %, у серці – 4 % від показника контролю, а у нирках вона майже не визначалася. Таким чином, дія терапевтичної дози АК була різноспрямованою, проте при високих дозах АК відбувалось істотне пригнічення активності ферменту у здорових шурів після одноразової ін'єкції.

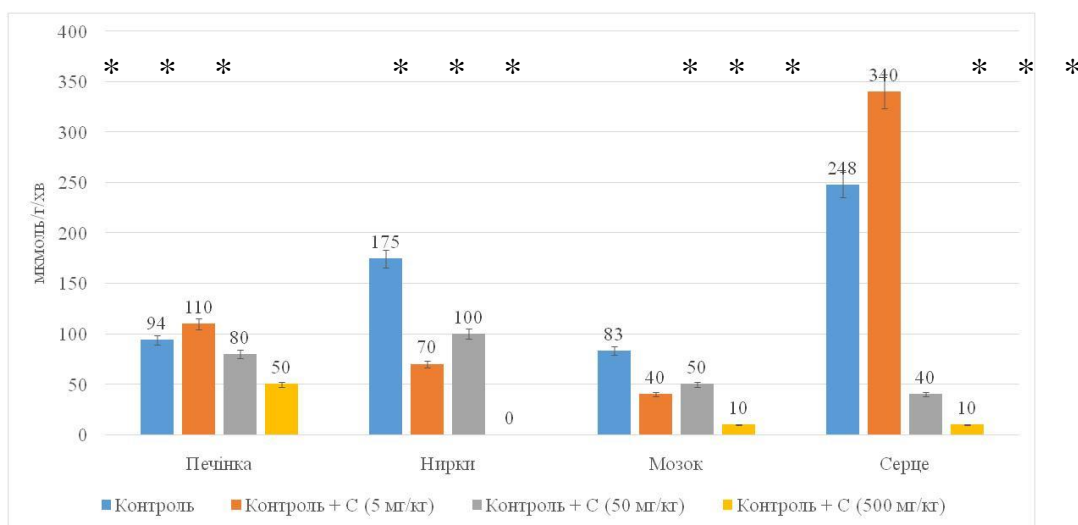


Рис. 1. Дія різних доз аскорбінової кислоти на активність лактатдегідрогенази в органах контрольних шурів (мкмоль НАДН/г/хв.), (n=5)

Примітка. Тут і далі: * – Різниця з показниками контрольних шурів- достовірна, p<0,05

Гіпоксія замкненого простору (рис. 2) викликала достовірно зменшення активності ЛДГ в нирках і серці, відповідно, на 31 % і 40 % у порівнянні з контролем. У мозку зменшення активності ферменту було незначним – на 7 %. Що стосується печінки, то активність ЛДГ в цьому органі, навпаки, підвищилася на 30 % у порівнянні з показником здорових тварин. Вищевикладені обставини можуть бути пояснені різною залежністю досліджуваних органів від кисню і відмінністю шляхів отримання енергії. Так, інтенсивність перебігу в різних органах гліколізу з'ясовна присутністю в них різних ізофермент-

них форм ЛДГ, що забезпечують синтез молочної кислоти з пірувату [2]. Таким чином, можна зробити висновок, що гіпоксія замкненого простору суттєво не змінює пропорційність роботи нирок та мозку, проте метаболічний внесок печінці серед органів при гіпоксії зростає, а метаболічний внесок серця – навпаки, зменшується. Ця перебудова метаболічної активності серед органів організму є наслідком дії ГЗП. Виходячи з місця печінки з точки зору її функцій у організму, можна вважати, що ГЗП викликає зміну певних метаболічних шляхів для компенсації уражень.

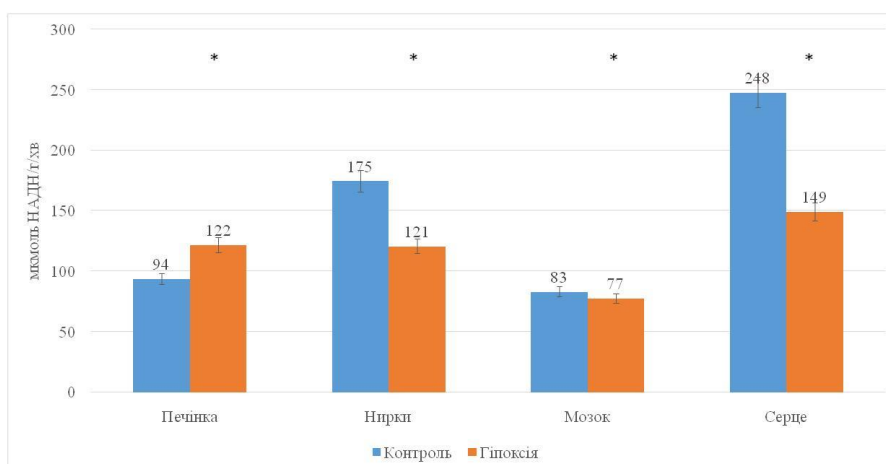


Рис. 2. Вплив гіпоксії замкнутого простору на активність лактатдегідрогенази в органах щурів (мкмоль НАДН/г/хв.), (n=5)

Дія різних доз аскорбінової кислоти на активність ЛДГ у щурів із гіпоксією замкнутого простору наведена на рис. 3. Введення аскорбінової кислоти щурам в дозі 5 мг/кг за 30 хв. до створення ГЗП, зменшувало активність ЛДГ у всіх органах у порівнянні з показниками гіпоксичних тварин. Так, у печінці активність ЛДГ зменшилася до 16 %, у нирках – 17 %, серці до 27 % у порівнянні з показниками щурів при ГЗП. У мозку активність ЛДГ також зменшувалася, але це зменшення було не таким ваговим – до 65 % від рівня щурів з ГЗП. Введення в/о аскорбінової кислоти у дозі 50 мг/кг також зменшувало всі показники у всіх органах, проте відбувалося деяке зменшення інгібуючого ефекту, особливо у печінці та нирках. Так, в печінці та нирках активність ЛДГ складала по 41 % від рівню контролю, у мозку – цей показник був на рівні 78 %, у серці – 34 %. Доза 500 мкг/кг викликала ще більше зменшення активності ЛДГ: у печінці вона складала 16 % від рівня контролю, у серці – 13 % від показника контролю, а у ни-

рках і мозку вона майже не визначалася. Таким чином, дія всіх доз АК на активність ЛДГ у щурів із ГЗП була односторонньою: відбувалося пригнічення активності ЛДГ у всіх дозах. При дії середньої дози ефект істотно зменшувався, проте при терапевтичній і особливо при великій дозі активність ЛДГ сильно пригнічувалася у всіх органах. Можливо щурам, які можуть власне синтезувати вітамін С екзогенне надмірне надходження аскорбінової кислоти дуже токсично.

Отримавши вищеописані дані стало цікаво порівняти активність ЛДГ із концентрацією саме аскорбінової кислоти в органах щурів після в/о введення аскорбінової кислоти у вищеперелічених дозах. Нами отримані коефіцієнти кореляції: загальної залежності активності ЛДГ від концентрації аскорбінової кислоти в органах щурів, кореляції показників вмісту АК та активності ЛДГ у органах здорових тварин, та кореляції показників вмісту АК та активності ЛДГ у органах хворих тварин. Дані наведені на рис. 4.

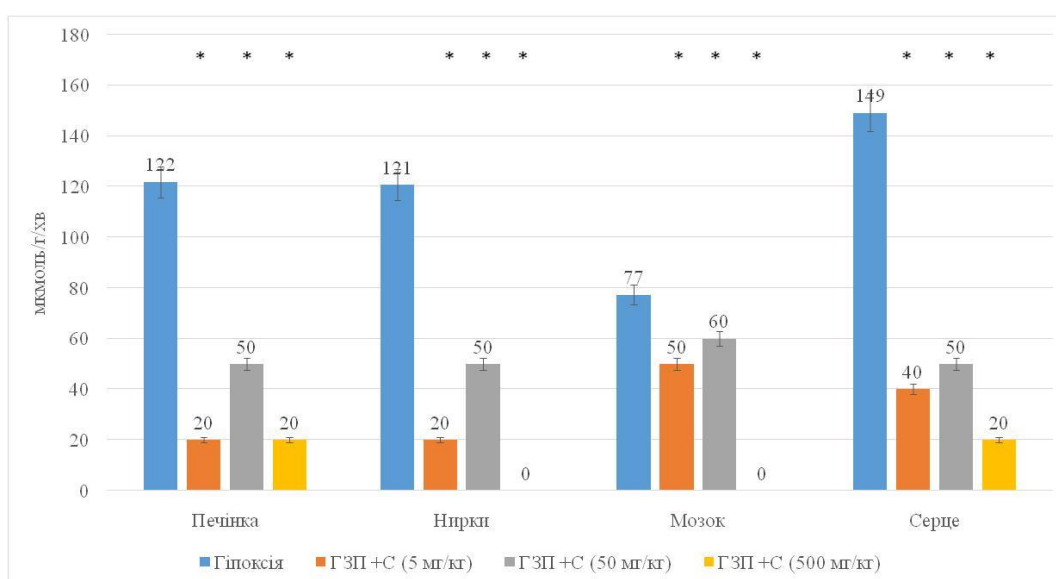


Рис. 3. Дія різних доз аскорбінової кислоти на активність лактатдегідрогенази в органах щурів із гіпоксією замкнутого простору (мкмоль НАДН/г/хв.), (n=5)

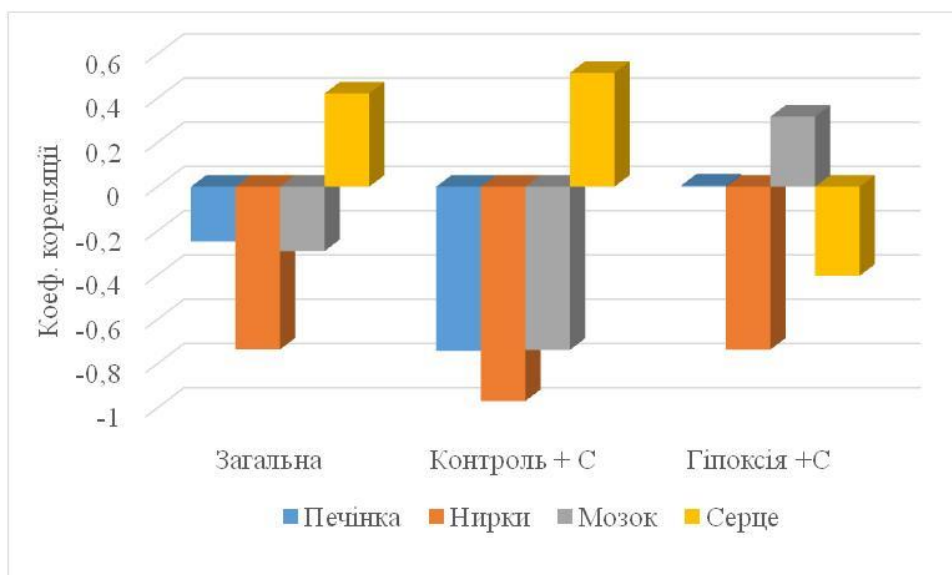


Рис. 4. Кореляційні залежності активності лактатдегідрогенази від концентрації аскорбінової кислоти в органах щурів: "Загальна" – розрахунок серед всіх груп тварин; "Контроль + C" – тільки серед контрольних тварин; Гі поксія + C - тільки серед гіпоксичних тварин

Загальна кореляція серед усіх вивчених варіантів мала негативний характер у всіх органах, крім серця. Більш вагомі результати розрахування коефіцієнту кореляції мали дані по окремих групам щурів – тільки здоровим, або тільки гіпоксичним на фоні введення АК. У здорових щурів негативна кореляція підвищувалася у всіх попередніх органах, проте у серці підвищувалася також позитивна кореляція. У хворих тварин дані розрахунку мали інший характер. У мозку коефіцієнт кореляції був негативним на рівні загального показника по всім групам щурів. Проте в інших органах з'явилися суттєві відмінності. Так у печінці коефіцієнт кореляції дорівнював 0,006, тобто був незначно більше нуля, у нирках він взагалі став позитивним, а у серці – навпаки з позитивного перетворився у негативний. Подібні зміни у кореляційних співвідносинах вмісту АК та активності ЛДГ у щурів із ГЗП можна пояснити впливом АК на загальний хід окисно-відновлювальних процесів у клітинах у тва-

рин за дією ГЗП. Тобто на фоні суттєвого пригнічення активності ЛДГ при підвищенні доз АК, що в/о вводилася за 30 хв. до дії ГЗП, регуляція окисних антиокиснювальних процесів при дії АК суттєво змінювалась. Але для встановлення більш тонких механізмів цих процесів необхідно подальше їх дослідження. На цьому фоні дія аскорбінової кислоти може вважатися для гіпоксичного організму більш позитивною, ніж негативною. Підвищення активності ЛДГ вважається негативним фактором, що може вказувати на підвищення ступеню розвитку гіпоксичних процесів. При цьому підвищується рівень лактата, а рівень пірувата зменшується, також зменшується співвідношення окиснених форм нікотинамідних коферментів до відновлених форм [2]. Аскорбінова кислота як антиокиснювач має діяти у протилежний бік. З цього приводу деяке підвищення тривалості життя щурів при дії АК перед створенням ГЗП має бути аргументом на користь вищесказаного (рис. 5).

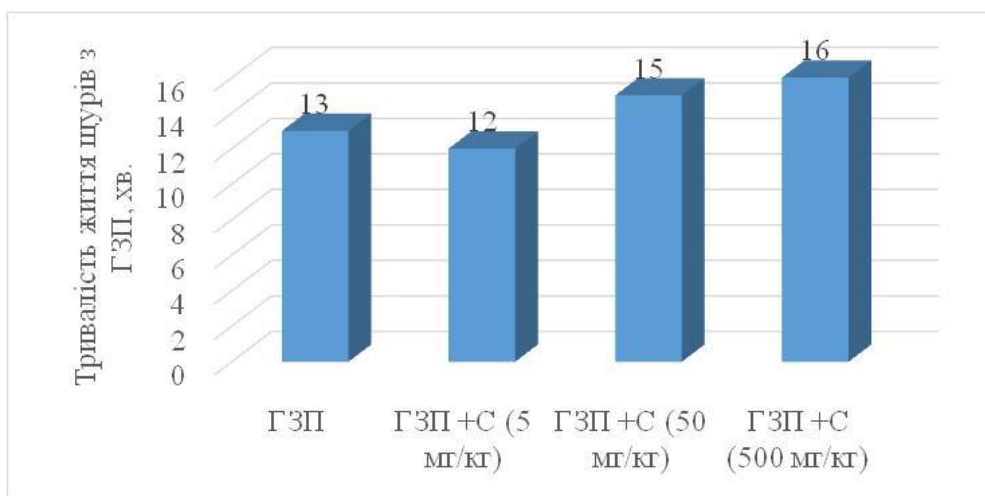


Рис. 5. Дія різних доз аскорбінової кислоти на тривалість життя щурів із гіпоксією замкненого простору (хв.), (n=5)

Так, середня тривалість життя у щурів при дії ГЗП в умовах дослідів, яким не вводили вітаміну С дорівнювала 13 хвилин. Терапевтична доза аскорбінової кислоти практично не впливала на цей показник. Проте підвищення дози до 50 мг/кг підвищувало тривалість життя щурів до 15 хв., а велика доза – до 16 хвилин. Можливим поясненням ефекту може бути можлива дія АК на останню ділянку дихального ланцюгу, тобто, можливо, вітамін С у тканинах щурів, може віддавати протони та електрони у дихальний ланцюг і стимулювати процес дихання та окисного фосфорильовання у SOS випадках.

6. Висновки

Введення аскорбінової кислоти (АК) в дозі 5 мг/кг здоровим щурам підвищувало активність ЛДГ у печінці та серці і зменшувало її у нирках та мозку, у порівнянні з контролем. Дози АК – 50 та 500 мг/кг зменшували активність ЛДГ у всіх органах. Гіпоксія замкненого простору (ГЗП) викликала достовірне зменшення активності ЛДГ в нирках і серці, відповідно, на 31 % і 40 %, а в печінці – підвищення на 30 % у порівнянні з контролем. Введення різних концентрацій аскорбінової кислоти щурам за 30 хв. до створення ГЗП різним чином зменшувало активність ЛДГ у всіх органах у порівнянні з показниками гіпоксичних тварин. Загальна кореляція та кореляція серед здорових щурів між вмістом АК та активністю ЛДГ в органах щурів мала негативний характер у всіх органах, крім серця. У мозку та серці піддослідних тварин коефіцієнт кореляції був негативним, а у нирках його значення було позитивним. Середня тривалість життя у щурів при дії ГЗП в умовах дослідів фактично збільшувалася при збільшенні дози аскорбінової кислоти з 12 хвилин до 16.

Література

1. Карпов, Л. М. Реализация специфической активности функционально связанных витаминов группы В, их производных и комплексов при различных состояниях организма [Текст]: дис. ... докт. биол. наук / Л. М. Карпов. – Одесса, 1994. – 505 с.
2. Сорокін, А. В. Взаємодія нікотинової кислоти з іншими вітамінами в реалізації функцій за різних станів тварин [Текст]: автореф. дис. ... канд. біол. наук / А. В. Сорокін. – Тавр. нац. ун-т ім. В.І. Вернадського, 2002. – 19 с.
3. Карпов, Л. М. Вплив вітамінних препаратів на стійкість тварин до гіпоксії [Текст] / Л. М. Карпов, Л. А. Шевченко, Н. В. Полтавцева, О. К. Будняк, А. В. Сорокін, О. М. Єршова, Афра Мохамед Абдул Рашид, Аполінарія Мукаруангва // Вісник Одеського державного університету. – 1998. – № 2. – С. 136–140.
4. Розанов, А. Я. Ферментативные процессы и их коррекция при экстремальных состояниях [Текст] / А. Я. Розанов, А. Н. Трещинский, Ю. В. Хмелевский. – К.: Здоров'я, 1985. – 208 с.
5. Лукьянова, Л. Д. Современные проблемы гипоксии [Текст] / Л. Д. Лукьянова // Вестник РАМН. – 2000. – № 9. – С. 3–12.
6. Шилов, П. И. Основы клинической витаминологии [Текст] / П. И. Шилов, Ф. М. Яковлев. – Ленинград: Медицина, 1974. – 343 с.
7. Морозкина, Т. С. Витамины: Краткое рук. для врачей и студентов мед., фармацевт. и биол. специальностей [Текст] / Т. С. Морозкина, А. Г. Мойсеенок. – Мн.: ООО «Асар», 2002. – 112 с.

8. Смирнова, М. И. Витамины [Текст] / под ред. М. И. Смирнова. – М.: Медицина, 1974. – С. 384–414.
9. Виноградова, Р. П. Молекулярные основы действия ферментов [Текст] / Р. П. Виноградова. – Киев: Вища школа, 1978. – 280 с.
10. Чернадчук, С. С. Активність амінотрансфераз в органах щурів при гіпоксії замкненого простору за дією тіамінброміду [Текст] / С. С. Чернадчук, С. А. Петров, О. К. Будняк, А. В. Сорокін, В. Є. Якименко, І. О. Кравчук // ScienceRise. – 2015. – Т. 5, № 1 (10). – С. 27–30. doi: 10.15587/2313-8416.2015.42749
11. Каркищенко, Н. Н. Руководство по лабораторным животным и альтернативным моделям биомедицинских технологий [Текст] / Н. Н. Каркищенко. – М., 2010. – 344 с.
12. Official Journal of the European Union L276/33 [Text]. – Directive 2010/63/EU of the European parliament and of the council of 22 September 2010 on the protection of animals used for scientific purposes. 86/609/EC.20.10.2010.
13. Методы биохимических исследований (липидный и энергетический обмен) [Текст]: учебник / под ред. М. И. Прохоровой. – Л.: Изд-во Ленингр. ун-та, 1982. – 272 с.
14. Гланц, С. Медико-биологическая статистика [Текст]: пер. с англ. / С. Гланц. – М.: Практика, 1998. – 459 с.
15. Нормативно-директивні документи МОЗ України. [Електронний ресурс]. – 2015. – Режим доступа: <http://mozdocs.kiev.ua/likiview.php?id=3119/> – Загл. с экрана.
16. Компедіум 2014 – лекарственные препараты [Текст] / под ред. В. Н. Коваленко. – К.: Морион, 2014.

References

1. Karpov, L. M. (1994). Realizacija specificheskoy aktivnosti funkcional'no svjazannyh vitaminov grupy B, ih proizvodnyh i kompleksov pri razlichnyh sostojanijah organizma [Implementation of the specific activity of functionally related B vitamins, their derivatives and complexes in different states of the organism]. Odessa, 505.
2. Sorokin, A. V. (2002). Vzaemodija nikotinovoi kisloti z inshimi vitaminami v realizacii funkcij za ruznih staniv tvarin [Interaction of Nicotinic Acid with other B vitamins in the realization of the functions of the different states of animals]. Taurida National V. I. Vernadsky University. Simferopol, 19.
3. Karpov, L. M., Shevchenko, L. A., Poltavceva, N. V., Budnjak, O. K., Sorokin, A. V., O. M. Yershova, O. M., Afra Mohamed Abdul Rashid, Apolinarija Mukaruranga (1998). Vpliv vitaminnih preparativ na stiykist tvarin do gipoksii [The effect of vitamin supplements on the resistance of animals to hypoxia]. Bulletin of the Odessa State University, 2, 136–140.
4. Rozanov, A. Ja., Treshhinskij, A. N., Hmelevskij, Ju. V. (1985). Fermentativnye processy i ih korrekciya pri jekstremal'nyh sostojanijah [Enzymatic processes and their correction in extreme conditions]. Kiev: Zdorov'ya, 208.
5. Lukyanova, L. D. (2000). Sovremennye problemy gipoksii [Modern problems of hypoxia]. Bulletin of RAMN, 9, 3–12.
6. Shilov, P. I., Jakovlev, F. M. (1974). Osnovy klinicheskoy vitaminologii [Fundamentals of Clinical vitaminology]. Leningrad, Russia: Medicine, 343.
7. Morozkina, T. S., Moiseenok, A. G. (2002). Vitaminy: Kratkoe ruk. dlja vrachej i studentov med., farmacevt. i biol. special'nostej [Vitamins: Quick hands for doctors and med. students. pharmacist. and biol. specialties]. Minsk: Asar, 112.
8. Smirnov, M. I. (1974). Vitaminy [Vitamins]. Moscow: Medicine, 384–414.
9. Vinogradova, R. P. (1978). Molekuljarnye osnovy dejstvija fermentov [Molecular basis of enzyme activity]. Kiev: Vishha shkola, 280.
10. Chernadchuk, S. S., Petrov, S. A., Budnjak, O. K., Sorokin, A. V., Jakimenko V. E., Kravchuk, I. O. (2015). Aktivnist' aminotferaz v organah shhuriv pri gipoksii

zamknjenogo prostoru za dieju tiaminbromidu [Aminotransferases activity in the organs of rats with hypoxia closed space by thiaminebromide action]. ScienceRise, 5/1 (10), 27–30. doi: 10.15587/2313-8416.2015.42749

11. Karkischenko, N. N. Rukovodstvo po laboratornym zhivotnym i al'ternativnym modeljam biomedicinskih tehnologij [Guide to laboratory animals and alternative models of biomedical technologies]. Moscow, 344.

12. Official Journal of the European Union L276 / 33. Directive 2010/63 / EU of the European parliament and of the council of 22 September 2010 on the protection of animals used for scientific purposes. 86/609 / EC.20.10.2010.

13. Prohorova, M. I. (1982). Metody biohimicheskikh issledovanij (lipidnyj i jenergeticheskij obmen) [Methods of biochemical tests (lipid and energy metabolism)]. Leningrad State University Press, 272.

14. Glants, S. (1998). Mediko-biologicheskaja statistika [Biomedical Statistics]. Moscow: Praktika, 459.

15. Normative-directive documents of Ministry of Public Health of Ukraine. Available at: <http://mozdocs.kiev.ua/likiview.php?id=3119/>

16. Kovalenko, V. N. (2014). Kompedium 2014 – lekarstvennye preparaty [Kompedium 2014 – drugs]. Kiev: Morion.

Дата находження рукопису 16.06.2015

Будняк Олександр Костянтинович, кандидат біологічних наук, доцент, кафедра біохімії, Одеський національний університет ім. І. І. Мечникова, вул. Дворянська, 2, м. Одеса, Україна, 65000
E-mail: budnyak2005@ukr.net

Петров Сергій Анатолійович, доктор біологічних наук, професор, кафедра біохімії, Одеський національний університет ім. І. І. Мечникова, вул. Дворянська, 2, м. Одеса, Україна, 65000

Чернадчук Сніжана Сергіївна, кандидат біологічних наук, доцент, кафедра біохімії, Одеський національний університет ім. І. І. Мечникова, вул. Дворянська, 2, м. Одеса, Україна, 65000
E-mail: chuk32@yandex.ru

Сорокін Андрій Вікторович, кандидат біологічних наук, доцент, кафедра біохімії, Одеський національний університет ім. І. І. Мечникова, вул. Дворянська, 2, м. Одеса, Україна, 65000

Ожерельсва Катерина Юріївна, аспірант, кафедра біохімії, Одеський національний університет ім. І. І. Мечникова, вул. Дворянська, 2, м. Одеса, Україна, 65000

Хмельницька Валерія Володимирівна, кафедра біохімії, Одеський національний університет ім. І. І. Мечникова, вул. Дворянська, 2, м. Одеса, Україна, 65000

Кравчук Ілона Олегівна, кафедра біохімії, Одеський національний університет ім. І. І. Мечникова, вул. Дворянська, 2, м. Одеса, Україна, 65000