

Okhrimenko S. M.

Influence of tryptophan on some indices of the rat's nitrogen metabolism under oxidative stress brought by cobalt and mercury salts

УДК 577.151:54–38

С. М. Охрименко

Харьковский национальный университет им. В. Н. Каразина

**ВЛИЯНИЕ ТРИПТОФАНА
НА НЕКОТОРЫЕ ПОКАЗАТЕЛИ АЗОТИСТОГО ОБМЕНА
У КРЫС ПРИ ОКСИДАТИВНОМ СТРЕССЕ,
ВЫЗВАННОМ СОЛЯМИ КОБАЛЬТА И РТУТИ**

Вивчено вплив триптофану на активність тирозинамінотрансферази та аргінази печінки щурів, а також на ступінь пероксидного гемолізу еритроцитів в умовах оксидативного стресу, що спричинений введенням до організму хлоридів кобальту або ртуті. Встановлено обмеження триптофаном підвищення активності аргінази, що спостерігалось при введенні обох солей, та посилення гемолізу еритроцитів при введенні хлориду кобальту. Активність тирозинамінотрансферази була підвищеною в усіх випадках. Обговорюються можливі механізми дії триптофану в умовах оксидативного стресу.

Influence of tryptophan on the tyrosine aminotransferase and arginase activities in a rat's liver and on the degree of erythrocytes peroxide hemolysis under oxidative stress induced by cobalt or mercury chloride was studied. Tryptophan restricts to arginase activity increase after the both salts introduction. The cobalt chloride intensifies erythrocytes hemolysis. The tyrosine aminotransferase activity increased in all cases. Possible mechanisms of the tryptophan action under conditions of oxidative stress are discussed.

Введение

Попадание в организм избыточных количеств соединений тяжелых металлов и металлов с переменной валентностью вызывает усиление процессов свободнорадикального окисления, накопление активных форм кислорода и, как следствие, разви-

© С. М. Охрименко, 2006

134

Вісник Дніпропетровського університету. Біологія, екологія.
Visnik Dnipropetrovs'kogo universitetu. Seriâ Biologiâ, ekologiâ
Visnyk of Dnipropetrovsk University. Biology, ecology.
Visn. Dnipropetr. Univ. Ser. Biol. Ekol.
2006. 14(2).
ISSN 2310-0842 print ISSN 2312-301X online
www.ecology.dp.ua

тие оксидативного стресса [3; 12; 13; 17]. При этом формируется ряд защитных реакций, направленных на сохранение гомеостаза в этих условиях. Ранее нами было показано, что введение в организм животных избыточных доз хлоридов кобальта или ртути вызывает развитие стресс-реакции, характеризующейся снижением содержания гликогена в печени, активацией липолиза и глюконеогенеза [5; 6; 11].

Для коррекции метаболических изменений при оксидативном стрессе используются различные антиоксиданты, однако роль ароматических аминокислот и их производных, способных претерпевать редокс-превращения, недостаточно изучена. В связи с этим цель настоящей работы – определить влияние триптофана на активность ферментов азотистого метаболизма при оксидативном стрессе, вызванном солями кобальта или ртути. В качестве показателя, отражающего изменение структурно-функционального состояния мембранных структур при оксидативном стрессе, использовали степень спонтанного гемолиза эритроцитов.

Материал и методы исследований

В работе использовали трехмесячных крыс-самцов линии Вистар, находившихся в стандартных условиях вивария Харьковского национального университета. Хлорид кобальта или хлорид ртути вводили внутривентриально в дозе 3 мг или 0,7 мг на 100 г массы тела соответственно [13; 18]. Триптофан вводили внутривентриально в дозе 20 мг на 100 г массы тела за 2 часа до инъекции соли металла. Все растворы готовили на физиологическом растворе. Контрольным животным вводили физраствор.

Животных брали в опыт через 4 часа после введения раствора хлорида кобальта или хлорида ртути. Кровь собирали и использовали для определения степени пероксидного гемолиза эритроцитов по методу Ягера [14]. Печень перфузировали охлажденным физиологическим раствором и готовили гомогенаты, из которых получали постмитохондриальную фракцию. В полученной фракции определяли активность тирозинаминотрансферазы (ТАТ) и аргиназы [16; 20]. Содержание белка определяли методом Лоури [18]. Статистическую обработку результатов проводили с использованием критерия Стьюдента.

Результаты и их обсуждение

В табл. 1 и 2 отражено влияние предварительно введенного триптофана на степень спонтанного гемолиза эритроцитов, вызванного хлоридами кобальта или ртути. Повышение степени гемолиза после введения животным солей данных металлов отражает лабилизацию мембранных структур клеток, связанную с особенностями биологического действия ионов кобальта и ртути. Ионы кобальта способны непосредственно инициировать процессы ПОЛ, вытеснять железо из гема и гемопroteинов, в то время как механизм действия ртути заключается в связывании *SH*-групп белковых и небелковых тиолов [10; 15]. Предварительно введенный триптофан частично ограничивает усиление спонтанного гемолиза эритроцитов, вызванное введением хлорида кобальта (табл. 1). Отсутствие такого эффекта в случае введения в организм хлорида ртути (табл. 2) свидетельствует о наличии другого механизма, видимо, связанного с высоким сродством ионов ртути к тиогруппам мембранных белков.

Повышение активности тирозинаминотрансферазы и аргиназы при введении хлоридов кобальта или ртути (табл. 3–6) отражает усиление азотистого метаболизма в условиях оксидативного стресса, связанное с активацией глюконеогенеза [1; 5; 6]. Триптофан, введенный перед хлоридом металла, неоднозначно влиял на активность ТАТ и аргиназы. Повышение активности аргиназы, вызванное введением хлоридов кобальта или ртути, полностью или частично блокировалось триптофаном (табл. 4 и

б), свидетельствуя об окислительном характере действия ионов кобальта и наличии дополнительного, неокислительного, механизма в действии ионов ртути.

Таблица 1

Влияние хлорида кобальта и триптофана на степень спонтанного гемолиза эритроцитов (%), $M \pm m$, $n = 6-9$)

Контроль	$CoCl_2$	$CoCl_2$ + триптофан	Триптофан
4,7 ± 1,0	23,8 ± 4,4*	12,2 ± 1,0*	5,8 ± 0,9

Примечание: * здесь и далее $p < 0,05$.

Таблица 2

Влияние хлорида ртути и триптофана на степень спонтанного гемолиза эритроцитов (%), $M \pm m$, $n = 6-10$)

Контроль	$HgCl_2$	$HgCl_2$ + триптофан	Триптофан
4,7 ± 1,0	15,1 ± 0,4*	23,1 ± 0,5*	5,8 ± 0,9

Таблица 3

Влияние хлорида кобальта и триптофана на активность ТАТ в печени крыс (нмоль *n*-гидроксибензилпирувата/мин. на мг белка, $M \pm m$, $n = 6-9$)

Контроль	$CoCl_2$	$CoCl_2$ + триптофан	Триптофан
5,7 ± 0,26	12,5 ± 1,10*	15,8 ± 0,88*	10,2 ± 0,63*

Активность ТАТ не только не снижалась при совместном введении соли металла и аминокислоты, но даже повышалась, отражая аддитивный характер действия использованных агентов. Повышение активности ферментов азотистого метаболизма в условиях оксидативного стресса, вызванного введением в организм животных солей кобальта и ртути, видимо, связано с их индукцией под действием глюкокортикоидов, содержание которых в крови возрастает в ходе развития стресс-реакции [8]. Ранее нами было показано, что повышение активности ТАТ при введении хлоридов кобальта или ртути происходит путем синтеза ферментного белка *de novo* [5; 6]. Триптофан известен как субстратный индуктор ТАТ [7], чем и можно объяснить обнаруженные нами эффекты совместного введения аминокислоты и соли металла (табл. 3 и 5).

Таблица 4

Влияние хлорида кобальта и триптофана на активность аргиназы в печени крыс (мкмоль мочевины/мин. на мг белка, $M \pm m$, $n = 5-9$)

Контроль	$CoCl_2$	$CoCl_2$ + триптофан	Триптофан
1,0 ± 0,08	2,3 ± 0,13*	1,2 ± 0,20	0,7 ± 0,15

Таблица 5

Влияние хлорида ртути и триптофана на активность ТАТ в печени крыс (нмоль *n*-гидроксибензилпирувата/мин. на мг белка, $M \pm m$, $n = 5-9$)

Контроль	$HgCl_2$	$HgCl_2$ + триптофан	Триптофан
4,5 ± 0,35	15,0 ± 2,19*	21,0 ± 5,03*	11,4 ± 1,60*

Таблица 6

Влияние хлорида ртути и триптофана на активность аргиназы в печени крыс (мкмоль мочевины/мин. на мг белка, $M \pm m$, $n = 5-10$)

Контроль	$HgCl_2$	$HgCl_2$ + триптофан	Триптофан
0,9 ± 0,04	2,0 ± 0,21*	1,3 ± 0,15*	0,7 ± 0,15

Результаты свидетельствуют о том, что триптофан, введенный животным перед хлоридом кобальта, способен ограничивать окислительные процессы в организме, что проявляется в снижении степени спонтанного гемолиза эритроцитов, повышенной при введении соли этого металла, а также в нормализации активности аргиназы, отражающей интенсивность азотистого метаболизма. Показана нормализация триптофаном активности ФДФазы, содержания гликогена и уровня неферментативного ПОЛ в печени, измененных при введении хлорида кобальта [1].

Введение животным триптофана совместно с хлоридом ртути оказало корректирующее действие на активность аргиназы, не отменяя полностью активирующее влияние ионов ртути, что подтверждает участие окислительного и неокислительного компонентов в механизмах действия этого металла на живые системы. В исследованиях на молодых и взрослых животных показана нормализация триптофаном показателей, измененных при введении хлорида ртути – ПОЛ и активности каталазы в печени и Г-6-Фазы в почках, АлАТ в печени [2; 9].

Механизм участия триптофана в системе защитных реакций организма при оксидативном стрессе, вероятно, представлен несколькими составляющими. С одной стороны, триптофан является предшественником никотиновой кислоты и серотонина, играющих важную роль в метаболизме. В то же время продукт деградации триптофана 3-гидроксиантралиловая кислота является коантиоксидантом для α -токоферола, предотвращая перекисное окисление липопротеинов низкой плотности и перекисное окисление в плазме [21]. Помимо этого, в условиях стресса в организме происходит индукция фермента метаболического превращения триптофана – триптофандиоксигеназы, или триптофанпирролазы, чувствительного к глюкокортикоидам. Триптофанпирролаза – гемсодержащий фермент. Усиление метаболизма триптофана, происходящее при поступлении аминокислоты в организм, сопровождается связыванием свободного гема апоферментом [4]. Учитывая, что свободный гем в организме является прооксидантом, можно прийти к выводу, что его участие в стабилизации триптофанпирролазы может влиять на редокс-статус организма, частично ограничивая свободнорадикальные процессы.

Вывод

Результаты наших экспериментов и данные литературы свидетельствуют об участии триптофана в формировании защитных реакций, направленных на сохранение окислительно-восстановительного гомеостаза, нарушенного при поступлении в организм солей кобальта и ртути.

Библиографические ссылки

1. **Влияние** хлорида кобальта и триптофана на некоторые показатели метаболизма у крыс разного возраста / Н. И. Буланкина, Г. В. Ганусова, С. М. Охрименко, М. Г. Яковенко // Биологические механизмы старения. Тез. докл. VI Междунар. симпозиума. – Харьков, 2004. – С. 74.
2. **Ганусова Г. В.** Вплив іонів ртуті та триптофану на активність деяких ферментів та перексидне окислення ліпідів у печінці та нирках щурів / Г. В. Ганусова, С. М. Охрименко, М. Г. Яковенко // Матеріали VIII Укр. біохім. з'їзду // Укр. біохім. журн. – 2002. – Т. 74, № 46 (дод. 2). – С. 214.
3. **Дубинина Е. Е.** Роль активных форм кислорода в качестве сигнальных молекул в метаболизме тканей при состояниях окислительного стресса // Вопр. мед. химии. – 2001. – Т. 47, № 6. – С. 561–581.

4. **Калиман П. А.** Роль гема в регуляции триптофан-2,3-диоксигеназной активности и содержания цитохрома P-450 в печени крыс / П. А. Калиман, И. В. Никитченко, С. П. Манадхар // Биохимия. – 1989. – Т. 54, № 10. – С. 54–62.
5. **Калиман П. А.** Влияние хлорида ртути на активность тирозинаминотрансферазы и некоторые стороны азотистого и углеводного обмена в печени крыс / П. А. Калиман, С. М. Охрименко // Актуальные проблемы медицины и биологии. – 2003. – № 1. – С. 416–422.
6. **Калиман П. А.** Цикл глюкоза – жирные кислоты при оксидативном стрессе у крыс, вызванном хлоридом кобальта / П. А. Калиман, С. М. Охрименко // Укр. біохім. журн. – 2005. – Т. 77, № 2. – С. 154–158.
7. **Курбанов Х. К.** Обмен тирозина и индукция тирозинаминотрансферазы при гипертермии. – Ашхабад, 1990. – 160 с.
8. **Мертвцов Н. П.** Регуляция экспрессии генов стероидными гормонами. – Новосибирск: Наука, 1990. – 262 с.
9. **Некоторые показатели** метаболической адаптации при оксидативном стрессе у животных разного возраста / Н. И. Буланкина, Г. В. Ганусова, С. М. Охрименко, М. Г. Яковенко // Биологические механизмы старения. Тез. докл. V Междунар. симпозиума. – Харьков, 2002. – С. 65–66.
10. **Оксидативний стрес** і регуляція антиоксидантного захисту в механізмах адаптації метаболізму в екстремальних умовах / П. А. Каліман, Т. В. Баранник, О. Ю. Боріков та ін. // Матеріали Міжнародної наукової конференції «Каразінські природознавчі студії». – Харків, 2004. – С. 228–229.
11. **Охрименко С. М.** Адаптация ферментов липидного и азотистого обмена у крыс при оксидативном стрессе, вызванном солями кобальта и ртути / С. М. Охрименко, Н. Ю. Гурьева, П. А. Калиман // Вестник Харьковского университета. Серия: биология. – 2005. – № 1–2. – С. 56–60.
12. **Саприн А. Н.** Окислительный стресс и его роль в механизмах апоптоза и развития патологических процессов / А. Н. Саприн, Е. В. Калинина // Успехи биол. химии. – 1999. – Т. 39. – С. 289–326.
13. **Содержание** и состав липопротеинов крови и печени крыс и некоторые показатели окислительного стресса при введении хлорида кобальта / П. А. Калиман, А. Л. Загайко, Р. В. Шаламов и др. // Укр. біохім. журн. – 1997. – Т. 69, № 5. – С. 138–148.
14. **Строев Е. А.** Практикум по биологической химии / Е. А. Строев, В. Г. Макарова. – М.: Высшая школа, 1986. – С. 208–211.
15. **Трахтенберг И. М.** Ртуть и ее соединения в окружающей среде / И. М. Трахтенберг, М. Н. Коршун. – К: Вища школа, 1990. – 231 с.
16. **Brown G.** Comparative biochemistry of urea synthesis. 1. Methods for the quantitative assay of urea cycle enzymes in liver / G. Brown, P. P. Cohen // J. Biol. Chem. – 1959. – Vol. 234. – P. 1769–1785.
17. **Girotti A. W.** Lipid hydroperoxide generation, turnover and effector action in biological systems // J. Lipid. Res. – 1998. – Vol. 39, № 8. – P. 1529–1542.
18. **Maines M. D.** Metals as regulators of heme metabolism / M. D. Maines, A. Kappas // Science. – 1977. – Vol. 198, № 4323. – P. 1215–1221.
19. **Protein measurement** with folin phenol reagent / O. H. Lowry, N. J. Rosebrough, A. L. Farr et al. // J. Biol. Chem. – 1951. – Vol. 193. – P. 265–275.
20. **Schepard B.** New Method for Assay of Tyrosine Transaminase // Analyt. Biochem. – 1969. – Vol. 30. – P. 443–448.
21. **Thomas S. R.** 3-Hydroxyanthranilic acid is an efficient cell-derived co-antioxidant for alpha-tocopherol, inhibiting human low density lipoprotein and plasma lipid peroxidation / S. R. Thomas, P. K. Witting, R. Stocker // J. Biol. Chem. – 1996. – Vol. 271. – P. 32714–32721.

Надійшла до редколегії 18.03.06.