

УДК 577.18+577.124+577.16]-092.9

О. В. Запорожченко¹, доц., Л. М. Карпов¹, проф., С. Г. Коломійчук²,
наук. співроб., О. О. Кокошкіна¹, асист., А. В. Сорокін¹, доц.,
О. І. Станєв¹, студ.

¹ Одеський національний університет ім. І. І. Мечникова,
кафедри біохімії та фізіології людини і тварин,
вул. Дворянська, 2, Одеса, 65026, Україна,

² Інститут очних хвороб та тканинної терапії ім. В. П. Філатова АМН
України, лабораторія біохімії,
Французський бульвар, 49/51, Одеса, 65061, Україна, sana33@ukr.net

ВМІСТ ЛАКТАТУ І ПІРУВАТУ В ОРГАНАХ ЩУРІВ ЗА УМОВ ІНГІБУВАННЯ БІОСИНТЕЗУ БІЛКА І ВВЕДЕННЯ ТВАРИНАМ ПОЛІВІТАМІНІВ

Визначали вміст лактату і пірувату, співвідношення лактату та пірувату, а також нефосфорильованих окиснених і відновлених нікотинамідних коферментів в органах щурів за умов інгібування біосинтезу білка. Встановлено, що при дії антибіотиків (хлорамфеніколу, актиноміцину) вміст лактату і пірувату в різній мірі змінюється в досліджуваних органах щурів, а співвідношення вільних НАД/НАДН зменшується. Введення полівітамінного препарату сприяє корекції зазначених змін.

Ключові слова: біосинтез білка, лактат, піруват, вітаміни.

Однією з важливих задач сучасної біології є з'ясування механізмів регуляції синтезу білка в нормі та при патологічних станах. Одним із шляхів з'ясування механізмів синтезу білків у клітинах є використання препаратів, що його стимулюють або інгібують. У лабораторній практиці досить часто застосовують хлорамфенікол і актиноміцин як специфічні інгібітори біосинтезу білка. Їх використовують для вивчення впливу порушеного синтезу білка на інші ланки метаболізму, в тому числі і на обмін енергії [1, 2, 3].

Відомо, що стан енергетичного метаболізму залежить не тільки від загального вмісту нікотинамідних коферментів у клітині, а й від співвідношення їх вільних форм в окремих компартментах [4, 5]. Окисно-відновний стан нікотинамідних коферментів відіграє важливу роль у клітинному метаболізмі, оскільки співвідношення вільних НАД/НАДН пар визначає швидкість і напрям зворотних реакцій оксидоредукції і контролює функціонування загальних метаболічних шляхів у клітині [5]. Отже, від зміни цього співвідношення залежить збільшення ролі анаеробного шляху окиснення глюкози, де лактат є кінцевим продуктом гліколізу, чи аеробного обміну, в якому лактат після перетворення в піруват окиснюється у циклі трикарбонових кислот [6, 7]. В організмі тварин піруват є одним з центральних метаболітів, що беруть участь у багатьох ферментативних реакціях [7, 8].

Встановлена залежність між наявністю аліментарного і метаболічного дефіциту вітамінів. Виявлено, що при аліментарному дефіциті вітаміну B_2 спостерігається зниження вмісту його коферментних форм, аскорбату і посилення інтенсивності процесів перекисного окиснення ліпідів. Крім того, вітаміни відіграють важливу роль у підтримці імунобіологічних реакцій організму. Виявлена залежність між забезпеченістю організму каротином, вітамінами Е, С, тіаміном, рибофлавіном і ніацином і розвитком патологічних станів [9, 10, 11]. Вони здатні також пом'якшувати або усувати побічну дію антибіотиків, сульфаніламідів та інших медикаментозних засобів [12, 13].

Метою дослідження було вивчення впливу вітамінів групи В на вміст лактату і пірувату, співвідношення лактату до пірувату та НАД/НАДН у цитоплазмі за умов інгібування біосинтезу білка.

Матеріали і методи

В дослідженнях використовували пацюків-самців лінії Вістар вагою 180—200 г. Для моделювання інгібування біосинтезу білка тваринам внутрішньочеревино (в/ч) за 24 і 48 годин до забою одноразово вводили хлорамфенікол (ХА) у дозі 8 мг/100 г. маси і актиноміцин (АМ) в дозі 1 мг/кг. Вітамінний препарат (ВП) вводили щурам внутрішньом'язово за 24 і 3 години до введення антибіотиків. При цьому дози вітамінів (мкмоль/кг маси) були такими: тіаміну (B_1) — 35,6, флавінмононуклеотиду (ФМН) — 8,7, пантотенату — Ca^{2+} (B_3) — 104,9, піридоксину (B_6) — 59,5, ліпоевої кислоти — 19,4, нікотинамід у — 327,5. Тварин у дослід брали через 72 години після першого введення ВП. Контрольні тварини отримували внутрішньом'язово відповідний об'єм фізіологічного розчину (ФР).

Вміст лактату в тканинах визначали за методом Хохорста [14], а піруват — методом Цока і Лампрехта [14].

Принцип методу полягає у визначенні екстинкції досліджуваного розчину, яка змінюється в процесі реакцій між лактатом та НАД, а також між піруватом та НАДН у присутності ферменту лактатдегідрогенази (ЛДГ). Внаслідок першої реакції за рахунок ферментативного окиснення лактату відбувається відновлення НАД, що має максимум поглинання при $\lambda = 340$ нм. У випадку пірувату відбувається його відновлення за рахунок окиснення НАДН, який реєструється спектрофотометрично при $\lambda = 340$ нм. Відношення цитоплазматичних НАД/НАДН визначали за формулою [15]:

$$\text{НАД/НАДН} = K_{\text{ЛДГ}}^{-1} \cdot \frac{[\text{піруват}]}{[\text{лактат}]}$$

де $K_{\text{ЛДГ}} = 1,11 \cdot 10^{-4}$ — константа рівноваги лактатдегідрогеназної реакції.

Результати оцінювали за загальноприйнятим t-критерієм Стьюдента [16].

Результати досліджень

Результати визначення вмісту лактату та пірувату, співвідношення лактат/піруват, а також співвідношення цитоплазматичних нефосфорильованих окиснених нікотинамідних коферментів до відновлених представлено у таблиці.

З'ясувалося, що за введення антибіотиків спостерігаються зміни вмісту лактату та пірувату в печінці, мозку, нирках та серці. Після введення АМ у серці вірогідно збільшувався вміст лактату — до 145 % у порівнянні з контролем.

Застосування полівітамінного препарату за умов введення антибіотиків сприяло, з одного боку, різноспрямованій зміні вмісту лактату в залежності від типу тканини, а з іншого боку — підвищенню вмісту пірувату в усіх досліджуваних органах.

За введення ВП та ХА спостерігалось вірогідне підвищення рівня пірувату у порівнянні з контролем та групою тварин, які отримували ХА. За цих умов у мозку зростання рівня пірувату складало 142,9 та 150,5 %, а у нирках — 157,3 та 176,7 % відповідно.

При введенні ВП та АМ у печінці і нирках спостерігалися аналогічні зміни. Так, у печінці рівень пірувату сягав 152,6 % по відношенню до групи тварин, що отримували АМ. У нирках за цих умов вміст лактату складав 158 %, а пірувату — 143,6 % по відношенню до контролю і 161,4 % відносно групи тварин, які отримували АМ.

За сумісного введення ВП, ХА та АМ спостерігалось вірогідне підвищення вмісту пірувату в нирках до 145,4 % відносно контролю, а у серці до 136,3 % — по відношенню до групи тварин, що отримували ХА та АМ.

При оцінці співвідношення лактат/піруват було з'ясовано, що за введення ХА і АМ цей показник підвищувався в усіх досліджуваних органах щодо контролю (таблиця). Подібний ефект спостерігався також за дії інших антибіотиків [17]. Виявлене збільшення співвідношення лактату до пірувату свідчить про активацію анаеробних процесів у гліколізі за дії антибіотиків. Введення полівітамінного препарату сприяло корекції зазначених змін у співвідношенні лактату до пірувату.

Аналіз співвідношення вільних НАД/НАДН у досліджуваних тканинах за умов введення тваринам антибіотиків виявив зменшення співвідношення цитоплазматичних окиснених нікотинамідних коферментів до відновлених порівняно з контролем. Слід зазначити, що навіть невеликі зміни співвідношення вільних цитоплазматичних нікотинамідних коферментів НАД/НАДН можуть викликати зміну напрямку потоку вуглецю як в бік гліколізу, так і в бік глюконеогенезу. Виявлене нами підвищення відновленості вільних НАД в тканинах щурів при моделюванні пригніченого біосинтезу білка може бути тим пусковим механізмом, що зумовлює, при накопиченні НАДН, інгібування процесів гліколізу і активацію глюконеогенезу [18, 19, 20]. Застосування полівітамінного препарату сприяло нормалізації або підвищенню співвідношення окиснених та відновлених нікотинамідних коферментів у групі тварин, які отримували антибіотики.

Вміст лактату і пірувату(мкмоль/г), співвідношення лактат/піруват та НАД/НАДН в органах щурів за умов інгібування біосинтезу білка, n = 7

Органи	Показники	Контроль (ін'єкції ФР)	ХА (ін'єкції хлорамфені- колу)	АМ (ін'єкції актиноміцину)	ХА+АМ	ВП +ХА	ВП +АМ	ВП +ХА +АМ
Печінка	ЛАКТАТ	2,169 ± 0,371	1,973 ± 0,246	1,907± 0,244	2,109 ± 0,302	2,248 ± 0,324	1,606 ± 0,245	1,802 ± 0,158
	ПІРУВАТ	0,238 ± 0,038	0,213 ± 0,029	0,192± 0,021	0,205 ± 0,026	0,273 ± 0,035	0,293 ± 0,034 **	0,197 ± 0,018
	Л/П	9,114	9,263	9,932	10,288	8,234	5,481	9,147
	НАД/НАДН	98,854	97,259	90,704	87,570	109,407	164,361	98,489
Мозок	ЛАКТАТ	1,883 ± 0,209	1,827 ± 0,111	2,047± 0,159	1,945 ± 0,199	1,895 ± 0,168	2,157 ± 0,288	2,049 ± 0,211
	ПІРУВАТ	0,317 ± 0,034	0,301 ± 0,0195	0,271± 0,028	0,267 ± 0,024	0,453 ± 0,0414 * **	0,305 ± 0,038	0,32 ± 0,039
	Л/П	5,940	6,070	7,554	7,285	4,183	7,072	6,403
	НАД/НАДН	151,665	148,424	119,269	123,671	215,360	127,387	140,697
Нирки	ЛАКТАТ	1,576 ± 0,086	1,605 ± 0,168	1,612± 0,222	2,16 ± 0,312	1,788 ± 0,289	2,49 ± 0,342 *	1,803 ± 0,220
	ПІРУВАТ	0,227± 0,017	0,202 ± 0,015	0,183± 0,013	0,241 ± 0,024	0,357± 0,047 * **	0,326 ± 0,036* **	0,33 ± 0,037 *
	Л/П	6,943	7,946	8,809	8,963	5,008	7,638	5,464
	НАД/НАДН	129,762	113,384	102,273	100,517	179,878	117,949	164,890

Закінчення таблиці

Органи	Показники	Контроль (ін'єкції ФР)	ХА (ін'єкції хлорамфені- колу)	АМ (ін'єкції актиноміцину)	ХА+АМ	ВП +ХА	ВП +АМ	ВП +ХА +АМ
Серце	ЛАКТАТ	4,312 ± 0,313	5,211 ± 0,359	6,254 ± 0,523 *	5,119 ± 0,321	4,607 ± 0,325	5,085 ± 0,400	4,400 ± 0,398
	ПІРУВАТ	0,527 ± 0,046	0,552 ± 0,031	0,609 ± 0,044	0,474 ± 0,041	0,596 ± 0,041	0,647 ± 0,043	0,646 ± 0,043 **
	ЛП	8,182	9,440	10,269	10,800	7,730	7,860	6,827
	НАД/НАДН	110,105	95,432	87,728	83,420	116,548	114,628	131,969

Примітки: * — різниця з контролем вірогідна ($p < 0,05$);** — різниця між групами тварин, які до введення антибіотиків отримували або не отримували ВП, вірогідна ($p < 0,05$).

Висновки

1. Після парантерального введення ХА і АМ у різних тканинах щурів з неоднаковою інтенсивністю змінюється вміст лактату та пірувату. Виявлений перерозподіл метаболітів НАД — дегідрогеназних систем, а саме лактату та пірувату, зумовлює підвищення співвідношення лактат/піруват у досліджуваних тканинах.
2. Введення антибіотиків хлорамфеніколу та актиноміцину викликає зменшення співвідношення вільних НАД/НАДН в цитоплазмі досліджуваних тканин.
3. Введення полівітамінів групи В сприяє корекції зазначених змін.

Література

1. Сазыкина Ю. О. Антибиотики как ингибиторы биохимических процессов. — М.: Наука, 1968. — С. 106—154.
2. *Kawashima Tsuyoshi, Nakazawa Tohru.* Transient increase in mitochondrial protein synthesis of starfish embryo before gastrulation // *Zool. Sci.* — 1989. — V. 6, № 4. — P. 800—804.
3. *Neetan M., Degani H.* Early estrogen - induced metabolic changes and their inhibition by actinomycin D and cycloheximide in human breast cancer cells: 31P and 13C NMR studies // *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.* — 1989. — V. 6, № 14. — P. 5585—5589.
4. *Леутский К. М.* Никотиновая кислота. Витамин РР. Львов: Изд-во Львовского ун-та, 1972. — С. 18—47, 181.
5. *Великий Н. Н., Пархомец П. К.* Роль окислительно — восстановительного состояния никотинамидных коферментов в регуляции клеточного метаболизма // *Витамины.* — 1976. — Вып. IX. — С. 3—15.
6. *Наградова Н. К.* Белок-белковые взаимодействия в функционировании НАД⁺-зависимых дегидрогеназ. — М.: Наука, 1990. — С. 34—35.
7. *Островский Ю. М., Величко М. Г., Якубчик Т. Н.* Пируват и лактат в животном организме. — Минск: Наука и техника, 1984. — С. 6—24.
8. *Методы биохимических исследований (липидный и энергетический обмен)* / Под ред. М. И. Прохоровой. — Л.: Изд-во ЛГУ, 1982. — 272 с.
9. *Rao P. V., Bhat K. S.* Influence of dietary riboflavin deficiency on lenticular glutathione redox cycle, lipid peroxidation and free radical scavengers in the rat // *J. Clin. Biochem. And Nutr.* — 1989. — V. 6, № 3. — P. 195—204.
10. *Leske M. C., Chylack L. T., Wu S. - Y.* The Lens Opacities Case Control Study // *Arch. Ophthalmol.* — 1991. — V. 109, № 2. — P. 244—251.
11. *Спиричев В. В.* Актуальные проблемы витаминологии // Тез. докл. Всесоюз. конф. — М., 1991. — Т. 2. — С. 33—35.
12. *Авакумов В. И., Ковлер М. А.* Лекарственные средства метаболической терапии на основе витаминов и коферментов. Тез. докл. Всесоюз. конф. "Клиническая витаминология". — М., 1991. — 241 с.
13. *Подорожный П. Г., Томашевский Я. И.* Клиническая витаминология. — М.: Мир, 1977. — С. 3—8.
14. *Bergmeyer H. U.* Methoden der enzymatischen Analyse / Herausgegeben von H. U. Bergmeyer. — Berlin, 1970. — S. 1536—1539.
15. *Великий Н. Н., Пархомец П. К.* Роль окислительно — восстановительного состояния никотинамидных коферментов в регуляции клеточного метаболизма // *Витамины,* — Вып. IX. — К.: 1976. — С. 3—4, 10.
16. *Кокунин В. А.* Статистическая обработка данных при малом числе опытов // *Укр. биохим. журн.* — 1975. — Т. 47, № 6. — С. 776—791.
17. *Хоменко А. Г., Высочина И. В., Ефимова Л. Н., Кузьмина Н. В.* Компоненты гликолиза и активность некоторых ферментов углеводного обмена в крови при длительном действии рифампицина и изониазида // *Бюл. эксп. биол. и мед.* — 1982. — № 4. — С. 54—57.

18. Greenbaum A. L., Guma K. A., Mclean P. The distribution of hepatic metabolites and the control of the pathways of carbohydrate metabolism in animals of different dietary and hormonal status. // Arch. Biochem. and Biophys. — 1971. — 143, № 2. — P. 617—663.
19. Великий Н. Н., Пархомец П. К., Симонова Н. Я. и др. Гипогликемический эффект никотинамида при аллоксановом диабете у крыс // Пробл. эндокринологии. — 1978. — 24, № 1. — С. 83—88.
20. Великий Н. Н., Кучмеровская Т. М., Пархомец П. К. Окислительно — восстановительное состояние свободных никотинамидных коферментов и синтез фосфоенолпирувата в печени крыс и морских свинок // Укр. биохим. журн. — 1981. — Т. 53, № 1. — С. 60—66.

О. В. Запорожченко, Л. М. Карпов, С. Г. Коломийчук, О. А. Кокошкина, А. В. Сорокин, А. И. Станев

Одесский национальный университет им. И. И. Мечникова, кафедры биохимии и физиологии человека и животных,
ул. Дворянская, 2, Одесса, 65026, Украина, sana33@ukr.net

Институт глазных болезней и тканевой терапии им. В. П. Филатова АМН Украины, лаборатория биохимии,
Французский бульвар, 49/51, Одесса, 65061, Украина, sana33@ukr.net

СОДЕРЖАНИЕ ЛАКТАТА И ПИРУВАТА В ОРГАНАХ КРЫС ПРИ ИНГИБИРОВАНИИ БИОСИНТЕЗА БЕЛКА И ПРИ ВВЕДЕНИИ ПОЛИВИТАМИНОВ

Резюме

Определяли содержание лактата и пирувата, соотношение лактата к пирувату, а также НАД к НАДН в органах крыс при ингибировании биосинтеза белка. Установлено, что при действии антибиотиков (хлорамфеникола, актиномицина) содержание лактата и пирувата изменяется в исследуемых органах крыс в различной степени, а соотношение свободных НАД/НАДН уменьшается. Введение поливитаминного препарата способствовало коррекции отмеченных изменений.

Ключевые слова: биосинтез белка, лактат, пируват, витамины.

**A. V. Zaporozhchenko, L. M. Karpov, S. G. Kolomiychuk,
O. A. Kokoshkina, A. V. Sorokin, A. I. Stanev**

Odessa Mechnikov National University, Department of Biochemistry and Human and Animal Physiology,
Dvoryanska st., 2, 65026, Odessa, Ukraine

Filatov Institute of AMS of Ukraine, laboratory biochemistry,
49/51 Frantsuzky boulevard, 65061, Odessa, Ukraine, sana33@ukr.net

CONTENT OF LACTATE AND PYRUVATE IN ORGANS OF RATS AT PROTEIN BIOSYNTHESIS INHIBITION AND AT INJECTION OF THE POLIVITAMINS

Summary

It was determined the content of lactat and pyruvate, lactat/pyruvate ratio of free oxidited and reduced nicotinamide coenzymes NAD/NADH in organs of rats at protein

biosynthesis inhibition. It has been revealed that the content of lactate and pyruvate researched in rat organs changes to different degree at the effect of antibiotics (aktinomicin, chloramfenikol), and the ratio of free NAD/HADH decreases. Injection of the polivitamin complex promoted to correction of the noted changes.

Keywords: protein biosynthesis, lactate, pyruvate, vitamins.