

УДК 616.36-099:546.264]-092.9

## ВПЛИВ КАРНІТИНУ ХЛОРИДУ НА ВМІСТ ОКИСНЕНО МОДИФІКОВАНИХ БІЛКІВ ТА СТАН АНТИОКСИДНОЇ СИСТЕМИ У ЩУРІВ РІЗНОГО ВІКУ З ТОКСИЧНИМ УРАЖЕННЯМ ТЕТРАХЛОРМЕТАНОМ

Кліщ І.М.

Тернопільська державна медична академія ім. І.Я. Горбачевського, м. Тернопіль

**Ключові слова:** токсичне ураження печінки, тетрахлорметан, окиснювальна модифікація білків, антиоксидна система, карнітину хлорид

**Вступ.** Порушення окиснювальних процесів відіграють важливу роль у патогенезі токсичних уражень печінки. Посилене продукування активних форм кисню (АФК) до яких відносяться супероксидний аніон-радикал ( $O_2^-$ ), пероксид водню ( $H_2O_2$ ) та гідроксильний радикал (ОН) спостерігається при дії на організм багатьох ксенобіотиків [1, 4, 12, 16, 17]. Як самі АФК, так і продукти вільнорадикального окиснення мають негативний вплив на стан мембранних фосфоліпідів та біополімерів (білків, нуклеїнових кислот) [1, 12, 16, 17]. Роль перекисного окиснення ліпідів (ПОЛ) у перебігу фізіологічних процесів та патогенезі ряду захворювань досить детально вивчена [2,5,7,8,14].

Дослідження окиснювальної модифікації білків (ОМБ) поки що лише поодинокі і детальні механізми цього процесу та шляхи їх регуляції потребують подальшого вивчення. Встановлено активацію ОМБ за ряду патологічних станів, зокрема дії певних гепатотоксичних агентів [1, 4, 12, 16, 17]. Важливу роль у дії АФК на білки відіграє також стан антиоксидної системи (АОС), зокрема доведено активацію даного процесу за умов пригнічення функціональної активності системи антирадикального захисту [4].

За даними ряду авторів, існують вікові особливості перебігу окиснювальних процесів в організмі



[13]. З віком змінюється також активність факторів антиоксидного захисту [3, 10].

Останнім часом з'явилися повідомлення про позитивний вплив карнітину хлориду на перебіг вільнорадикальних процесів за умови їх активації різноманітними факторами [14].

Виходячи з вищевказаного, ми поставили собі за мету вивчити ступінь окиснювальної модифікації білків та стан деяких ферментів антиоксидного захисту у тварин різного віку за умов токсичного ураження тетрахлорметаном, а також ефективність застосування карнітину хлориду з метою корекції їх порушень.

**Матеріали та методи.** Дослідження проведені на 54 нелінійних щурах-самцях трьох вікових періодів: статеві недозрілі, молоді (3-х міс., маса 70-100 г), статеві дозрілі, дорослі (8-10 міс., маса 180-220 г) та старі (18-24 місячні, масою 300 г і більше), які утримувались на стандартному раціоні виварію. Тварин розділили на 3 групи: I – інтактні; II – контрольні (уражені тетрахлорметаном); III – ліковані (тетрахлорметан+карнітину хлорид). Токсичне ураження печінки викликали внутрішньоочеревинним уведенням тетрахлорметану в дозі 0,2 мл/100 г маси тіла у вигляді 50 % олійного розчину. Інтактні тварини отримували ідентичний об'єм рослинної олії. Фармакопейний 20% розчин карнітину хлориду розводили в 10 разів ізотонічним розчином натрію хлориду і вводили внутрішньоочеревинно в дозі 50 мг/кг на протязі всього терміну дослідження. Ступінь окиснювальної модифікації білків плазми крові визначали за взаємодією утворених в процесі окиснення радикалів аліфатичних амінокислот альдегідних і ке-

тонних груп з 2,4-динітрофенілгідразином, що супроводжується утворенням 2,4-динітрофенілгідразонів, які мають характерний спектр поглинання. Альдегідо- і кетонпохідні нейтрального характеру реєстрували при  $\lambda=370$  нм (ОМБ<sub>370</sub>), а основного – при  $\lambda=430$  нм (ОМБ<sub>430</sub>) [12]. У гомогенаті печінки визначали активність СОД за методом [15], каталази – за методом [6], та глутатіонпероксидази (ГП) [9]. Тварин декапітували під легким ефірним наркозом через 24 год, 3 та 7 діб від моменту введення тетрахлорметану. Усі експериментальні дані підлягали статистичній обробці з використанням t-критерію Стьюдента.

**Результати досліджень та їх обговорення.** Отримані нами результати, як і дані інших дослідників [12, 17] вказують на підвищення чутливості білків до окиснювальної модифікації в процесі старіння, що видно із зростання концентрації окиснено-модифікованих білків у плазмі крові тварин 18-24-х місячного віку у порівнянні з іншими віковими групами. Це може бути наслідком зміни структурної організації білкових молекул, порушення співвідношення металів зі змінною валентністю, а також зниження активності компонентів першої ланки антиоксидантної системи організму [12]. Проведені нами дослідження активності антиоксидних ферментів підтверджують це. Так, активність СОД у печінці старих тварин становила 83,3 % у порівнянні з молодими та 89,7 % - з дорослими тваринами. Каталазна активність печінки відрізнялась ще більше і була нижчою відповідно на 28,6 % та 23,3 %.

Таблиця 1

Концентрація альдегідо- та кетонпохідних нейтрального /ОМБ<sub>370</sub>/ і основного /ОМБ<sub>430</sub>/ характеру у плазмі крові щурів різних вікових груп з токсичним ураженням печінки тетрахлорметаном та корекції карнітину хлоридом (M±m)

Вік	Показник (моль/кг б-ка)	Група тварин						
		Інтактні, n=6	Уражені тетрахлорметаном			Тетрахлорметан + карнітину хлорид		
			1 доба, n=6	3 доба, n=6	7 доба, n=6	1 доба, n=6	3 доба, n=6	7 доба, n=6
3 міс.	ОМБ <sub>370</sub>	0,76±0,02	1,33±0,07*	1,28±0,08*	1,14±0,06*	1,21±0,06	1,16±0,05	0,92±0,05**
	ОМБ <sub>430</sub>	0,48±0,01	0,97±0,02*	0,82±0,03*	0,84±0,02*	0,88±0,04**	0,76±0,05	0,68±0,04**
8-10 міс.	ОМБ <sub>370</sub>	0,81±0,04	0,98±0,04*	0,92±0,03	0,85±0,04	0,83±0,05**	0,85±0,04	0,80±0,03
	ОМБ <sub>430</sub>	0,50±0,02	0,66±0,02*	0,69±0,02*	0,65±0,03*	0,60±0,04	0,58±0,03**	0,54±0,04**
18-24 міс.	ОМБ <sub>370</sub>	0,92±0,04	1,18±0,04*	1,32±0,05*	1,22±0,06*	1,07±0,05	1,22±0,05	1,14±0,04
	ОМБ <sub>430</sub>	0,61±0,02	0,98±0,03*	0,96±0,04*	0,92±0,02*	0,92±0,05	0,88±0,06	0,85±0,04

Примітка: \* - різниця достовірна у порівнянні з інтактними тваринами відповідного вікового періоду ;

\*\* - різниця достовірна у порівнянні з тваринами, ураженими ССl<sub>4</sub>.



Активність антиоксидантних ферментів у щурів різних вікових груп з токсичним ураженням печінки тетрахлорметаном та корекції карнітину хлоридом ( $M \pm m$ )

Вік	Показник	Група тварин						
		Інтактні, n=6	Уражені тетрахлорметаном			Тетрахлорметан+ карнітину хлорид		
			1 доба, n=6	3 доба, n=6	7 доба, n=6	1 доба, n=6	3 доба, n=6	7 доба, n=6
3 міс.	СОД, ум.од/мг б-ка	0,60±0,02	0,35± 0,04*	0,41± 0,03*	0,50± 0,04*	0,42± 0,03	0,46± 0,05	0,55± 0,06
	Каталаза, мкат/кг	4,82±0,11	2,71± 0,09*	2,09± 0,11*	2,17± 0,14*	3,18± 0,12**	3,31± 0,05**	3,66± 0,11**
	ГП, ммоль/кг·хв	28,27±1,55	15,52± 1,39*	17,44± 1,52*	22,91± 1,98	20,59± 1,33**	22,28± 0,74**	23,35± 1,01
8-10 міс.	СОД, ум.од/мг б-ка	0,56±0,02	0,35± 0,02*	0,40± 0,03*	0,51± 0,03	0,44± 0,03**	0,49± 0,02**	0,53± 0,05
	Каталаза, мкат/кг	4,49±0,14	2,98± 0,16*	2,46± 0,08*	2,11± 0,04*	3,36± 0,12**	3,22± 0,08**	3,35± 0,08**
	ГП, ммоль/кг·хв	29,83±1,43	18,64± 0,91*	19,21± 1,19*	24,60± 0,99	23,76± 0,76**	24,05± 1,41**	25,82± 0,92
18-24 міс.	СОД, ум.од/мг б-ка	0,50±0,02	0,31± 0,06*	0,35± 0,04*	0,37± 0,05*	0,35± 0,05	0,38± 0,05	0,39± 0,04
	Каталаза, мкат/кг	3,49±0,15	2,26± 0,05*	2,28± 0,16*	2,13± 0,18*	2,39± 0,34	2,64± 0,12	3,21± 0,14**
	ГП, ммоль/кг·хв	23,69±1,38	13,75± 0,98*	15,21± 1,14*	18,97± 0,98*	17,13± 1,29	18,27± 1,16	21,69± 0,98

Введення тетрахлорметану викликало значну активацію процесів окиснювальної модифікації білків у тварин всіх вікових категорій, однак можна прослідкувати і певні особливості. Якщо через 24 год після введення отрути вміст ОМБ<sub>370</sub> у дорослих тварин зріс на 20,9 %, старих – на 28,2 %, то у статевонедозрілих щурів він перевищував аналогічний показник здорових тварин на 75,4 %. Концентрація альдегідо- і кетонпохідних основного характеру (ОМБ<sub>430</sub>) зростала у молодих тварин у 2 рази, тоді як у старих – в 1,6, а дорослих – в 1,3 рази. Такі зміни можна пояснити особливостями метаболізму тетрахлорметану. Як відомо [7], CCl<sub>4</sub> зазнає модифікації на молекулі цитохрому Р-450 за участю мікосомальних монооксигеназ. У результаті цих перетворень можуть утворюватися радикали двох типів – малоактивний CCl<sub>3</sub> та високоактивний CClO<sub>3</sub>. Зважаючи на те, що активність окиснювальних процесів у мікосомах молодих тварин значно вища, ніж у дорослих та старих, на що вказують ряд дослідників [13], можна припустити, що й інтенсивність радикалоутворення у них переважає. Знешкодити активні радикали можуть ферменти першої ланки системи антиоксидантного захисту, однак, як показали наші дослідження, їх активність у тварин, отруєних тетрахлорметаном, значно знижується, причому найбільш виражено у молодих тварин. Так, активність СОД у цій віковій групі становила 58,1 %, каталази – 56,2 %, а ГП – 54,9 % у порівнянні з інтактними тваринами. У дорослих тварин ці показники становили відповідно 67,8 %, 66,3 % та 62,5 %, а старих – 62,0 %, 64,7 % та 56,3 %.

На 3-ю та 7-у доби експерименту спостерігалось деяке зниження концентрації окиснено модифікованих білків порівняно з 1-ю добою. Найбільш виражено це відбувалось у дорослих тварин. До 7-ї доби вміст ОМБ<sub>370</sub> у них становив 104,9 % а ОМБ<sub>430</sub> – 130, 0 %. Дещо менше зниження нами відмічено у старих та молодих тварин, де аналогічні показники становили відповідно 132,6 та 150,8 % (у старих) і 150,0 та 175,1% (у молодих). Активність СОД у печінці молодих тварин зростала і до 7-ї доби становила 83,3 % порівняно зі здоровими. У дорослих цей показник був ще вищим і лише на 9,0 % відрізнявся від інтактних щурів. У старих тварин нормалізація активності ензиму проходила повільніше, становлячи до 7-ї доби лише 74 % від норми. Каталазна активність навпаки, знижувалась і до кінця експерименту становила у старих тварин 61,0 %, дорослих – 46,9 %, а молодих – 45,0 % від рівня здорових тварин. Це може бути наслідком вираженого пригнічувального впливу на даний фермент активних форм кисню, оскільки металоензими, які мають у своєму активному центрі металозв'язувальну ділянку і містять іони із змінною валентністю найбільше піддаються окиснювальній модифікації [12, 17]. Активність ГП на протязі експерименту поступово зростала і становила на 7-у добу у молодих тварин 81,0 %, дорослих – 82,2 %, а старих – 80,1 % від рівня здорових щурів.

Застосування карнітину хлориду мало позитивний вплив на досліджувані нами показники. Ми зафіксували зниження інтенсивності процесів окиснювальної модифікації білків у тварин різних вікових категорій. Концентрація похідних нейтра-



льного характеру у плазмі крові молодих тварин на 1-у добу експерименту становила 90,9 %, 3-ю – 90,6 % а до 7-ї знизилась до 80,4 %, що достовірно нижче, ніж у контрольних тварин. Похідні основного характеру зазнавали аналогічних змін і були достовірно нижчими на 1-у та 7-у доби дослідження, однак до рівня інтактних тварин не наближались. У тварин віком 8-10 міс. нами також зафіксовано достовірне зниження  $OMB_{370}$  на 1-у добу експерименту, а до 7-ї доби цей показник знижувався до рівня інтактних тварин. Поступово нормалізувалась також концентрація  $OMB_{430}$  і до 7-ї доби лише на 8 % перевищувала рівень здорових тварин. У 18-24-х місячних тварин також спостерігалась тенденція до зниження концентрації окиснено модифікованих білків, однак зміни були не достовірними у порівнянні з ураженими тваринами, яким корекція не проводилась.

Інтенсивність вільнорадикальних процесів у значній мірі визначається здатністю компонентів системи антиоксидного захисту протидіяти накопиченню токсичних продуктів вільнорадикального окиснення та їх похідних. Нами отримано позитивні результати впливу карнітину хлориду на показники активності деяких ферментів, які беруть безпосередню участь у знешкодженні АФК. У 3-х місячних тварин достовірно, у порівнянні з ураженими щурами, на протязі всього експерименту зростала активність каталази, а зростання глутатіонпероксидазної активності спостерігалось на 1-у та 3-ю доби експерименту. Аналогічна тенденція активності цих ферментів спостерігалась і у дорослих тварин. У щурів 18-24-х місячного віку суттєвої нормалізації каталази та глутатіонпероксидази не виявлено. Активність СОД достовірно зростала лише у дорослих тварин, причому до 7-ї доби

показник наближався до рівня інтактних. У печінці 3-х та 18-24-х місячних щурів підвищення активності ензиму під впливом карнітину хлориду було не достовірним.

За даними деяких авторів [8], основна роль у пригніченні активності антиоксидних ферментів за умов дії тетрахлорметану належить активації ПОЛ та пригніченню білкового синтезу внаслідок ковалентного зв'язування з макромолекулами. Карнітину хлорид стимулює синтез білка, а також має антиоксидантні властивості [14], що лежить в основі його позитивної дії. Відмічені нами вікові особливості впливу препарату зумовлені, на нашу думку, тим, що значна активація вільнорадикальних процесів у 3-х місячних тварин не може компенсуватись у достатній мірі як ендогенними антиоксидантами, так і карнітину хлоридом і призводить до накопичення цитотоксичних продуктів вільно радикальних реакцій. У тварин 18-24-х місячного віку менша ефективність препарату, ймовірно, пояснюється нижчими можливостями гепатоцитів синтезувати білок, що не дозволяє компенсувати його втрати внаслідок токсичної дії тетрахлорметану.

**Висновки.** 1. Існує зворотній зв'язок між активністю ферментів першої ланки антиоксидного захисту та інтенсивністю окиснювальної модифікації білків.

2. Застосування карнітину хлориду призводить до підвищення активності ферментів системи антиоксидного захисту та зниженню інтенсивності окиснювальної модифікації білків.

3. Вікові відмінності в ефективності карнітину хлориду обумовлені особливостями токсичної дії тетрахлорметану на метаболічні процеси у печінці тварин різних вікових категорій.

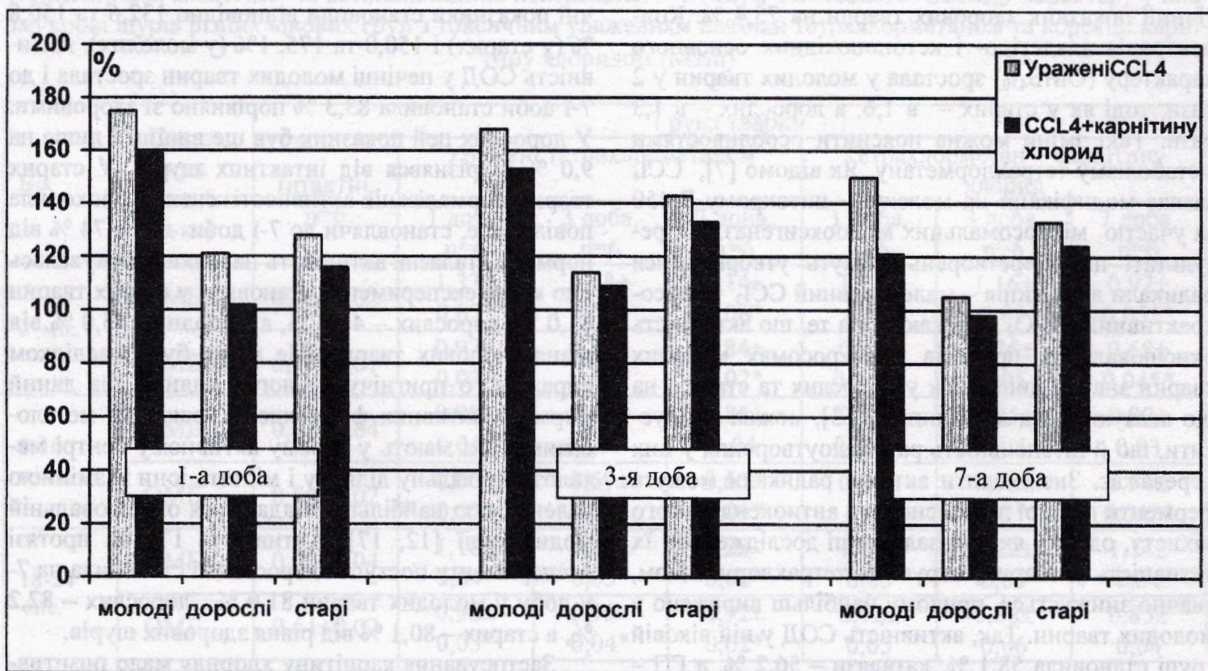


Рис. 1. Динаміка показників  $OMB_{370}$  у плазмі крові щурів різного віку з токсичним ураженням тетрахлорметаном та корекції карнітину хлоридом. (за 100 % прийняті показники інтактних тварин відповідних вікових категорій)



## ЛІТЕРАТУРА

1. Арчаков А.И., Михосоев И.М. Модификация белков активным кислородом и их распад // Биохимия. - 1998. - Т. 54, №2. - 179 - 186.
2. Барабой В.А., Сутковой Д.А. Окислительно-окислительный гомеостаз в норме и патологии. - Наукова думка, 1997. - 420 с.
3. Возрастные изменения активности супероксиддисмутазы и глутатионпероксидазы в цитозоле и митохондриях печени крыс / В.З Ланкин, А.К Тихазе, В.В. Лемешко и др. //Бюл. эксперим. биологии и медицины. - 1981. - №9. - С. 310-311.
4. Григор'єва Н.П., Яремій І.М., Мешишен І.Ф. Окислювальна модифікація білків та активність деяких антиоксидантних ферментів крові щурів за умов опромінення та дії настоянки арніки гірської / Мед. хімія. - 2000. - т.2, №1. - С.70 - 72.
5. Зборовский И.А., Банникова М.В. Антиоксидантная система организма, ее значение в метаболизме. Клинические аспекты // Вестн. РАМН. - 1995. - № 6. - С. 53-59.
6. Королук М.А., Иванова Л.И., Майорова Н.Г. Метод определения активности каталазы // Лаб. дело. - 1988. - №1. - С. 16 - 19.
7. Костюк В.А. Роль ковалентного связывания и перекисного окисления липидов в повреждении печени четыреххлористым углеродом // Биохимия. - 1991. - Т. 56, вып. 10. - С. 1878-1885.
8. Костюк В.А., Потапович А.И., Маслова Г.Т. Состояние антиокислительной защитной системы печени крыс при воздействии четыреххлористого углерода // Укр. биохим. журн. - 1992. - Т. 64, № 3. - С. 111-115.
9. Кругликова Г.О., Штутман І. М. Глутатионпероксидазна та глутатионредуктазна активність печінки щурів після введення селеніту натрію // Укр. біохім. журн. - 1976. - № 2. - С. 227-233.
10. Матолінець О.М. Вікові особливості антиоксидантної системи у тварин з кадмієвим токсикозом // Мед. хімія. - 2000. - Т. 2, № 1. - С. 44-48.
11. Мешишен І.Ф. Метод визначення окислювальної модифікації білків плазми ( сироватки) крові // Буковин. мед. вісник. - 1998. - 2, №1. - С.156 - 158.
12. Мешишен І.Ф., Польовий В.П. Механізм окислювальної модифікації білків // Буковин. мед. вісник. - 1999. - 3, №1. - С. 158 - 168.
13. Парамонова Г.И. Возрастные особенности системы микросомального окисления печени крыс: Автореф. дисс. ... канд биол. наук. - Киев, 1983. - 24 с.
14. Сидорик Н.Г., Волгин Д.В. Влияние L-карнитина на пероксидное окисление липидов и липидный состав сыворотки крови при гемической гипоксии // Укр. биохим. журн. - 1996. - Т.68, № 5. - С. 54-58.
15. Чевари С., Чаба И., Секей И. Роль супероксиддисмутазы в окислительных процессах клетки и метод ее определения в биологических материалах // Лаб. дело. - 1985. - № 11. - С. 678-681.
16. Ciolino H.P., Levine R.L. Modification of proteins in endothelium cell death during oxidative stress // Free Radic. Biol. Med. - 1997. -22, № 7. - P. 1277 - 1282.
17. Stadtman E.R., Oliver C.N. Metal-catalyzed oxidation of proteins. Physiological consequences // J. Biol. Chem. - 1991. - V. 266. - P. 2005-2008.

## SUMMARY

THE EXPRESSIVENESS OF THE OXIDIZING MODIFICATION OF PROTEINS AND THE STATE OF ANTIOXIDATION SYSTEM AT RATS OF DIFFERENT AGE WITH A TOXIC DEFEAT OF LIVER BY A TETRACHLORMETHANE

Klishch I.M.

On the model of a toxic defeat of liver by a tetrachlormethane at male rats of different age periods 3 monthly, (young, preadolescent, weight 70-100 g); 8-10 monthly (puberal, weight 180-220 g); 18-24 monthly (old, weight 300 g and more) is investigated an intensity of oxidizing updating of proteins of a blood plasma and the activity of enzymes of the 1-st link of antioxidation protection. It is fixed, that under the influence of a tetrachlormethane is most intensive to an oxidizing the protein of the 3 monthly animals, a little bit smaller - old give in, and the oxidizing updating at the adult animals is expressed least. The activity of antioxidation enzymes – superoxidisedismutase, glutathioneperoxidase and catalase has an inversely proportional character with a degree of the oxidation of proteins. The carnitine chloridum raises activity of antioxidation enzymes and reduces concentration of oxidatived modificationed proteins. The most expressed effect of work of drugs was observed at adult animals. The deduction about interdependence of a degree of oxidated updating of protein from the activity of antioxidation enzymes and the effectivity of application of carnitine chloridum for normalization of these exponents was made.

**Key words:** a toxic defeat of a liver, tetrachlormethane, oxidizing updating of proteins, antioxidation system, correction