



Биолог. журн. Армении, 2 (70), 2018

ВЗАИМОСВЯЗЬ АКТИВНОСТИ АДЕНОЗИНДЕЗАМИНАЗЫ И СОДЕРЖАНИЯ ЛАКТАТА В УСЛОВИЯХ ГИПОДИНАМИИ

Н.К. АЙРАПЕТЯН, М.А. ХАЧАТРЯН, А.А. ТРЧУНЯН

Ереванский госуниверситет, кафедра биохимии, микробиологии и биотехнологии
nn.hayrapetyan@ysu.am

Исследована активность ключевого фермента пуринового метаболизма – аденозиндезаминазы в сыворотке крови и тканях органов кролика при гиподинамии, установлена активация катаболизма аденозина. Выявлена взаимосвязь содержания субстрата аденозиндезаминазы аденозина и концентрации молочной кислоты в сыворотке крови животных, подвергнутых гиподинамии. Полученные результаты свидетельствуют о негативном влиянии гиподинамии на организм животных.

Гиподинамия – аденозиндезаминаза – лактат – сыворотка крови

Զետազոտվել է պորինային փոխանակության առանցքային ֆերմենտի՝ ադենոզինդեզամինազի ակտիվությունը ճագարի արյան շիճուկում և օրգանների հյուսվածքներում հիպոդինամիայի պայմաններում: Հիպոդինամիայի ենթարկված կենդանիների արյան շիճուկում բացահայտվել է ադենոզինի և կաթնաթթվի կոնցենտրացիաների փոխկապակցվածություն: Ստացված տվյալները վկայում են հիպոդինամիայի բացասական ազդեցության մասին:

Հիպոդինամիա – ադենոզինդեզամինազ – կաթնաթթու – արյան շիճուկ

The activity of adenosine deaminase – the key enzyme of purine metabolism – in blood serum and tissues of rabbit's organs during hypodynamia has been studied and activation of adenosine catabolism has been established. The interrelation between the content of adenosine deaminase substrate and the concentration of lactic acid in the blood serum of animals subjected to hypodynamia has also been revealed.

Hypodynamia – adenosine deaminase – lactate – blood serum

Ограничение двигательной активности (гиподинамия) является одним из мощных стрессорных воздействий на организм и может вызывать развитие разнообразных патологических процессов [15, 23]. Исследование воздействия гиподинамии особенно актуально в связи с тем, что терапия многих заболеваний подразумевает определенную степень ограничения повседневной двигательной активности человека.

Показано, что состояние гиподинамии сопряжено с нарушением процессов поступления и утилизации кислорода в ткани и органы и может привести к клеточной гипоксии [12, 20]. Поскольку вследствие клеточной гипоксии меняется уровень энергообеспеченности процессов, начинает преобладать анаэробный гликолиз с накоплением лактата как конечного продукта, то повышение содержания лактата мо-

жет сигнализировать о возникшем в результате стрессового воздействия кислородном дефиците. Так как выявлена зависимость между содержанием лактата и степенью развития различных патологий, в том числе стрессовых, некоторые авторы указывают на возможность применения колебаний содержания лактата в качестве маркера для индикации стрессового воздействия [13, 16, 17, 19].

В настоящее время также представляет интерес изучение влияния лактата на течение патологических, стрессовых состояний через изменение активности некоторых ферментов, в частности ключевого фермента пуринового обмена аденозиндезаминазы (КФ 3.5.4.4) [5, 6]. Анализ экспериментального и клинического материалов в области различных патологий и стрессовых состояний свидетельствует о немалом диагностическом значении определения аденозиндезаминазы (АДА) – фермента достаточно чувствительного к различным физиологическим изменениям организма [16]. Есть предположения, что изменения активности АДА при стрессе свидетельствуют об адекватной реакции организма на стрессовый фактор [2]. Аденозиндезаминаза необратимо дезаминирует аденозин и его различные аналоги, включая фармакологически активные, в инозин и его соответствующие малоактивные аналоги путем гидролитического замещения NH-групп на OH-группу в положении 6-го остатка пурина или другого гетероцикла [7]. Изучение активности аденозиндезаминазы представляет интерес в связи с тем, что его субстрат аденозин в зависимости от концентрации в 2-10 раз усиливает выход лактата по сравнению с контролем (без аденозина) [13]. А транспорт аденозина из клетки усиливается в условиях ацидоза, возможно, обусловленного избытком лактата [1, 22].

Исследование изменений активности АДА и содержания лактата является перспективным направлением для понимания степени нарушения функций организма в стрессовом состоянии, механизмов развития адаптационного синдрома, способствующим выявлению и возможности коррекции этих состояний.

Целью данной работы является изучение изменений концентрации лактата, активности АДА в динамике стрессорного воздействия (гиподинамии), а также в динамике стрессорного воздействия на фоне применения фитосбора.

Материал и методика. *Лабораторные животные.* Исследование проводили на кроликах самцах (домашний кролик, *Oryctolagus cuniculus*). Животные содержались в обычных условиях вивария, при стандартном режиме освещения и температуры (в помещении с температурой воздуха 22 °С, с 12-часовым циклом свет/темнота), имели свободный доступ к воде и пище.

Моделирование эксперимента. Стресс вызывали путем принудительного ограничения двигательной активности (гиподинамии). Нами был разработан временной период проведения эксперимента. Окончательный режим воспроизведения стрессорного воздействия был установлен на основании проведенных многочисленных вариаций (как с изменением продолжительности эксперимента, так и продолжительности стрессорного воздействия). Выяснилось, что длительность эксперимента 16 дней и ежедневная 3-часовая гиподинамия позволяют получать достоверные и исчерпывающие данные по изучаемому вопросу. Формирование стресс-фактора вызывали путем горизонтальной фиксации животных на доске (16 дней, по 3 часа ежедневно). Влияние гиподинамии как классического стрессорного раздражителя на активность АДА, содержание лактата исследовали в сыворотке крови и тканях различных органов кроликов. Показатели определяли в первый и далее каждый 3 день моделирования стресса. Для исследований животные были разделены на 3 группы. Контролем служили интактные животные (I группа, n=4), экспериментальной группой (группа II, n=6) служили животные, подвергающиеся повторным воздействиям стресса, группой сравнения (группа III, n=6) – животные, подвергающиеся гиподинамии с введением адаптогена для оценки возможностей воздействия на физиологические изменения, развивающиеся при стрессе. В качестве адаптогенного препарата использовался 5%-ный водный экстракт фитосбора (*Calendula officinalis* L., *Salvia officinalis* L., *Glycyrrhizae radix*, *Echinacea*

purpurea). Экстракцию проводили при $t = 70^{\circ}\text{C}$, в течение 20 мин. Экстракт применяли в дозировке 40 капель на 1 прием в день.

Определение биохимических показателей крови. Для исследований брали венозную кровь в силиконированную пробирку с гепарином каждый 3-й день стрессорного воздействия. Активность АДА в сыворотке крови определяли по методике Гуисти и Галанти [10], основанной на колориметрическом определении аммиака с фенолгипохлоритом. Активность фермента выражали в мкмоль/мл. Молочную кислоту определяли по реакции Уффельмана [4].

Извлечение биологического материала. Для исследования последствий стресса на органы сразу после последнего сеанса стрессорного воздействия животных выводили из опыта декапитацией. Ткани органов (мозг, печень) гомогенизировали в стеклянном гомогенизаторе Поттера–Эльведжейма в соотношении 1:10 (масса/объем) в K^+ -фосфатном буфере (рН 7.4). Гомогенаты центрифугировали 10 мин при 1500 g. Активность АДА в гомогенатах тканей органов определяли методом Зелингсона в модификации Силаковой [11]. Активность фермента выражали в мкмоль/г.

Обработка результатов. Достоверность полученных различий оценивали с использованием t-критерия Стьюдента [3]. Статистически достоверными считали изменения при $p < 0.05$.

Результаты и обсуждение. Интенсивность метаболических изменений, происходящих при гиподинамии, оценивали по содержанию лактата и активности аденозиндезаминазы в сыворотке крови кроликов. В первый день стрессорного воздействия в сыворотке крови животных, подвергшихся гиподинамии (II группа), было выявлено снижение активности АДА относительно контрольной группы (I группа). Отмечалось различие показателей активности с исходными показателями на 26 % ($p < 0.05$). Тенденция к снижению продолжалась, и на 4 день стресса было зарегистрировано различие с контрольной группой на 35% ($p < 0.05$). Казалось, по мере увеличения стрессорного воздействия активность фермента должна еще более отклоняться от уровня активности фермента интактных животных, однако далее наблюдалась динамика повышения активности фермента, и на 7-й день воздействия показатель АДА сыворотке крови достиг контрольных значений, а далее повышался (на 16 сутки относительно контрольной группы на 49%, $p < 0.05$) (рис. 1).

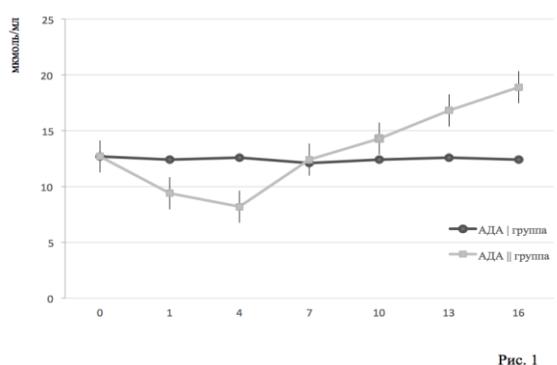


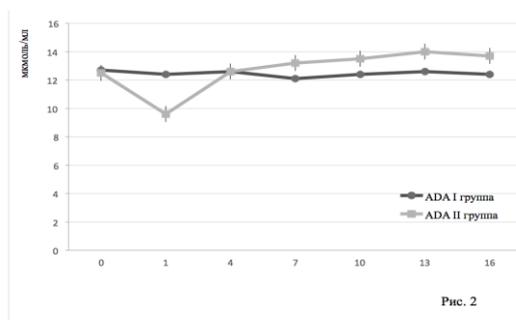
Рис. 1
*- достоверно по отношению к контрольной группе животных ($p < 0.05$)

Рис.1. Динамика активности аденозиндезаминазы сыворотки крови кроликов, подвергнутых гиподинамии

Таким образом, при гиподинамии имеет место изменение активности аденозиндезаминазы, зависящее от степени (частоты) стрессорного воздействия.

Для оценки возможностей воздействия на развивающиеся при стрессе физиологические изменения был использован адаптогенный препарат (см. материа-

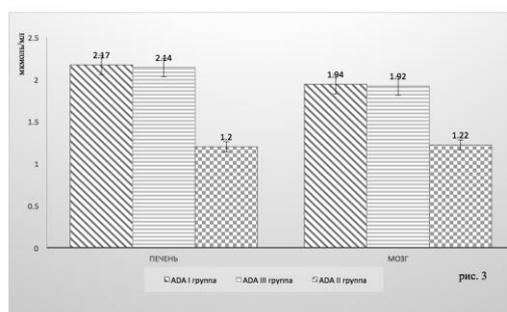
зиологические изменения, был использован адаптогенный препарат (см. Материал и методика). В первый день стресса активность АДА в сыворотке крови кроликов, подвергнутых стрессу с одновременным принятием экстракта (III группа), снизилась относительно контрольной группы на 23% ($p < 0.05$). Средние значения активности в группе с применением адаптогена соответствовали показателям в группе без коррекции. Однако активность АДА сыворотки крови животных, получавших адаптоген, через 7 дней после введения фитосбора превысила исходные показатели на 27.3% ($p < 0.05$), далее закономерность изменений активности фермента во II и в III группах сохранялась, но наблюдалось расхождение в уровне активности. К концу эксперимента показатели активности АДА во второй группе значительно превысили показатели III группы (рис. 2).



*- достоверно по отношению к контрольной группе животных ($p < 0.05$)

Рис. 2. Динамика активности аденозиндезаминазы сыворотки крови кроликов, подвергнутых гиподинамии на фоне применения адаптогена

Поскольку гиподинамия затрагивает жизнедеятельность всего организма [21], целесообразно было рассмотреть ее влияние на биохимические процессы во внутренних органах. Надо отметить, что практически отсутствуют сведения о реакциях различных органов и тканей на стрессорные воздействия. Серия экспериментов по определению активности АДА в гомогенатах тканей печени, головного мозга кроликов на фоне гиподинамии указала на значительные изменения активности фермента в органах кролика (рис. 3). На 16-е сут с момента стресса по сравнению с контрольной группой у животных II группы активность АДА ткани мозга снизилась на 37% ($p < 0.05$), а ткани печени – на 44.7% ($p < 0.05$) (рис. 3).

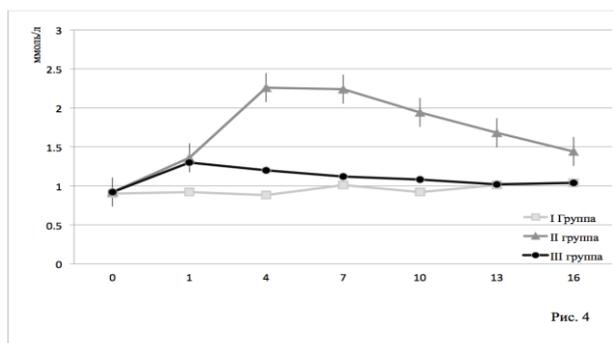


*-достоверно по отношению к контрольной группе животных ($p < 0.05$)

Рис.3. Зависимость активности аденозиндезаминазы тканей различных органов кролика от гиподинамии

Существенные изменения активности АДА могут быть результатом относительного замедления катаболических процессов в тканях органов в условиях гиподинамии. У животных III группы значимых отклонений от исходных значений не было зарегистрировано и показатели находились в пределах физиологической нормы (активность АДА в гомогенатах тканей печени и мозга снижена на 1.4% и 1.03%, соответственно).

Параллельно исследованию ферментативной активности было рассмотрено влияние гиподинамии на концентрацию лактата в сыворотке крови лабораторных кроликов. Полученные данные свидетельствуют, что в первый день стрессового воздействия изменения концентрации лактата сыворотки крови в экспериментальных группах идентичны: как во II, так и в III группе животных концентрация лактата повысилась в 1,5 раза по сравнению с контрольными показателями ($p < 0,05$) (рис. 4). Дальнейшая динамика повышения концентрации лактата в группе без применения фитосбора не соответствовала показателям группы, получавшей фитосбор. На 4-й день гиподинамии отмечалось расхождение в показателях (во II группе содержание лактата повысилось в 2,5 раза относительно интактной пробы, в III группе в 1,3 раза, $p < 0,05$).



*-достоверно по отношению к контрольной группе животных ($p < 0.05$)

Рис. 4. Содержание лактата в сыворотке крови кролика под воздействием гиподинамии

В группе без коррекции на 16-е сут выявлено увеличение концентрации лактата на 56,5% относительно физиологической нормы ($p < 0,05$), в группе с введением фитосбора на 11,1 % ($p < 0,05$).

Установлено, что при стрессах неизбежны дополнительные энергетические траты, которые являются так называемой “ценой адаптации” [9]. Одной из важнейших адаптивных реакций организма является мобилизация энергетических ресурсов, активация гликогенолиза, сопровождающаяся накоплением продуктов расщепления глюкозы – лактата и пирувата. Увеличение содержания лактата в клетке при стрессе свидетельствует о недостаточном снабжении клеток кислородом, приводящем к клеточной гипоксии и увеличению доли анаэробного метаболизма глюкозы. Увеличение содержания лактата подтверждает, что стрессорное воздействие провоцирует нарушение гликолиза у животных, что снижает роль углеводов в энергетике организма.

С другой стороны, накопление лактата может усилить выход аденозина из клеток, и повышение активности АДА можно объяснить ацидозом. Но, возможно, изменения активности АДА есть результат изменения содержания аденозина, являющегося универсальным регулятором различных физиологических функций, в том числе энергетического обмена [18].

Таким образом, можно констатировать, что при гиподинамии в сыворотке крови наблюдается активация катаболизма аденозина, а также увеличение содержания лактата, что, возможно, характеризует активацию основных защитных систем организма.

Обнаруженные изменения активности АДА позволят создать комплекс профилактических мероприятий по предотвращению развития последствий влияния гиподинамии на организм. Полученные результаты могут служить основанием для рассмотрения возможности применения использованного нами фитосбора в качестве средства, предотвращающего неблагоприятные патологические эффекты при острых и хронических стрессогенных воздействиях.

ЛИТЕРАТУРА

1. Алабовский В.В., Винокуров А.А., Хамбуров В.В. Некоторые механизмы защитного действия аденозина при кальциевом парадоксе. Рос. физиол. журн., 7, с. 889-901, 2004.
2. Ильдербаев О.З., Шапеева Н.Л., Ильдербаева Г.О. и др. Оценка действия радиационного фактора в отдаленном периоде на активность ферментов метаболизма пуриновых нуклеотидов в различных органах и тканях в эксперименте. Мед. Науки, 12, 21, с. 69-72, 2015.
3. Кобзарь А.И. Прикладная математическая статистика. Физматлит, с. 816, 2006.
4. Кушманова О.Д. и др. Руководство к лаб. занятиям по биол. химии. медицины, 1983, с. 97-100.
5. Шатова О.П., Хомутов Е.В., Сташкевич М.А. и др. Участие лактата в парадоксе Хелстрёма. Патология, 2, с. 3-5, 2011.
6. Anitha G., Mahaboob R., Obulesu G. Study of adenosine deaminase levels in the diagnosis of tuberculous pleural effusion. Intern. Arch. of Integrated Medicine, 3, 7, p. 353-357, 2016.
7. Bartzoka F., Venetsanou K., Clonis Y. Adenosine reagent-free detection by co-immobilization of adenosine deaminase and phenol red on an optical biostrip.. Biotech. J., 10, 1, p. 136-142, 2015.
8. de Groot M.J., Coumans W.A., van der Vusse G.J. The nucleotide metabolism in lactate perfused hearts under ischaemic and reper fused conditions. Mol. Cell Biochem., 118, p. 1-14, 1992.
9. Detka J, Kurek A., Kucharczyk M. et al Brain glucose metabolism in an animal model of depression. J. Neuroscience, 295, p. 198-208, 2015.
10. Giusti, G., Galanti, B. Colorimetric method, Methods of enzymatic analysis. 3rd ed. Weinheim: Verlag chemie, 4, p. 315-323, 1984.
11. Kanamori K., Parivar F., Ross B. ISN NMR study of in vivo cerebral glutamine synthesis in hyperammonic rats. Biomed, 6, p. 21, 1993.
12. Kaushal K.S., Kumar R. Stress, Oxidative Injury and Disease. Indian J. of Clinical Biochemistry, 30, p. 3-10, 2015.
13. Mekitarian F.E., Horita S.M., Gilio A.E. et al. Cerebrospinal fluid lactate level as a diagnostic biomarker for bacterial meningitis in children. Int. J. Emerg. Med., 7, p. 14, 2014.
14. Mello P., Filippi-Chiela E., Nascimento J. et al. Adenosine uptake is the major effector of extracellular ATP toxicity in human cervical cancer cells. Molecular Biology of the Cell., 25, 19, p. 2905-2918, 2014.
15. Nayanatara A.K., Tripathi Y., Nagaraja H.S. et al. Effect of chronic immobilization stress on some selected Physiological, biochemical and lipid parameters in Wistar Albino rats. Research J. of Pharmaceutical, Biol. and Chemical Sciences, 3, p. 34-42, 2012.
16. Philp A., Macdonald A.L., Watt P.W. Lactate – a signal coordinating cell and systemic function. The J. Exp. Biol., 208, p. 4561-4575, 2005.
17. Proia P., Di Liegro C.M., Schiera G. et al Lactate as a metabolite and a regulator in the central nervous system. Int. J. Mol. Sci., 17, 9, p. 1450, 2016.

18. *Randhawa P.K., Jaggi A.S.* Unraveling the role of adenosine in remote ischemic preconditioning-induced cardioprotection. *Life Sciences*, 155, p. 140-146, 2016.
19. *Richard A.H., Tindale L., Lone A. et al.* Aerobic glycolysis in the frontal cortex correlates with memory performance in wild-type mice but not the APP/PS1 mouse model of cerebral amyloidosis. *J. Neurosci.*, 36, 6, p. 1871-1878, 2016.
20. *Roef M.J., de Meer K., Kalhan S.C. et al.* Gluconeogenesis in humans with hyperlactatemia during low-intensity exercise. *Am. J. Physiol.*, 284, p. 1162-1171, 2003.
21. *Sangishetti V.P., Ghongane B.B., Nayak B.B.* Effect of immobilization stress on organ indices, sperm quality, and testosterone level in rats: role of N-acetyl cysteine. *J. of Chemical and Pharmaceutical Research*, 8, 5, p. 845-851, 2016.
22. *Sitkovsky M.V., Kjaergaard J., Lukashev D. et al.* Hypoxia-adenosinergic immunosuppression: tumor protection by T-regulatory cells and cancerous tissue hypoxia. *Clin. Cancer Res.*, 14, 19, p. 5947-5952, 2008.
23. *Vaibhav W.* Influence of stress and fluoxetine on immobility period of mice in tail suspension test and forced Swim test. *Asian J. of Pharmaceutical and Clinical Research*, 9, p. 302-305, 2016.

Поступила 12.02.2018