

УДК: 577.152.181:577.125:616 – 092.9

Влияние солей кобальта на показатели энергетического обмена в митохондриях нефроцитов крыс

С.Н.Мартынова¹, Т.В.Горбач²

¹Харьковский национальный университет имени В.Н.Каразина (Харьков, Украина)

²Харьковский национальный медицинский университет (Харьков, Украина)

Изучено содержание некоторых металлов в ткани почек, интенсивность перекисного окисления в митохондриях и активность некоторых митохондриальных ферментов в нефроцитах крыс, которым внутривенно вводился раствор хлорида кобальта. Установлено, что в почках увеличивается содержание кобальта и кальция при снижении концентрации меди, магния, цинка. В митохондриях активируется неферментативное перекисное окисление, снижаются активности пируватдегидрогеназы, сукцинатдегидрогеназы, изоцитратдегидрогеназы. Сделан вывод о влиянии повышенной концентрации кобальта на окислительные процессы в митохондриях.

Ключевые слова: медь, кобальт, нефроциты, перекисное окисление липидов, пируватдегидрогеназа, изоцитратдегидрогеназа, сукцинатдегидрогеназа.

Вплив солей кобальту на показники енергетичного обміну в мітохондріях нефроцитів щурів

С.М.Мартынова, Т.В.Горбач

Вивчено вміст деяких металів у тканині нирок, інтенсивність перекисного окислення в мітохондріях та активність деяких мітохондріальних ферментів у нефроцитах щурів, яким внутрішньошлунково введено розчин хлориду кобальту. Встановлено, що у нирках підвищується вміст кобальту та кальцію при зниженні концентрації міді, магнію, цинку. У мітохондріях активується неферментативне перекисне окислення, знижується активність піруватдегідрогенази, сукцинатдегідрогенази, ізоцитратдегідрогенази. Зроблено висновок про вплив підвищеної концентрації кобальту на окислювальні процеси у мітохондріях.

Ключові слова: мідь, кобальт, нефроцити, перекисне окислення ліпідів, піруватдегідрогеназа, ізоцитратдегідрогеназа, сукцинатдегідрогеназа.

The influence of cobalt salts on the energy metabolism indicators in mitochondria of rats nephrocytes

S.N.Martynova, T.V.Gorbach

Concentration of some metals in kidney tissue, intensity of peroxidation in mitochondria and activity of some mitochondrial enzymes in nephrocytes of rats injected intragastrically with cobalt chloride solution have been investigated. It was ascertained that level of cobalt and calcium increased in kidneys with decrease of cuprum, magnesium and zinc level. Unenzymical peroxidation in mitochondria activated, activity of pyruvate dehydrogenase, succinate dehydrogenase, isocitrate dehydrogenase decreased. Conclusion has been made about influence of increased concentration of cobalt on oxidative processes in mitochondria.

Key words: cuprum, cobalt, nephrocytes, lipid peroxidation, pyruvate dehydrogenase, succinate dehydrogenase, isocitrate dehydrogenase.

Введение

За последнее время в нашей стране значительно увеличилось число заболеваний почек, возникающих в результате длительного поступления в организм экотоксикантов (экодетерминированная нефропатия) (Игнатова, 1996).

Многие ксенобиотики, поступающие в организм с воздухом, водой, пищей, выводятся почками, при этом возможно их повреждающее действие. Токсикантами, поражающими почку, нередко оказываются различные металлы. Одновалентные металлы почти полностью фильтруются в клубочке и активно реабсорбируются в канальцах, конкурируя с ионами K^+ и Na^+ . Двухвалентные металлы (кадмий, цинк, свинец и др.) связываются с сульфгидрильными группами специфических и неспецифических белков, выполняющих транспортную функцию (Iwata et al., 2003). Транспортные белки могут обусловить нефротоксичность металлов при их избыточном поступлении в организм, так как при этом образуется комплекс металл-протеин, который, являясь транспортной формой металла, способствует его фильтрации и повышенной абсорбции в почечной ткани (Нефрология, 2000). В экспериментальных исследованиях установлено, что кобальт (Co) может депонироваться в матричке

лизосом в результате комплексообразования с анионными группами и конкурировать с ионами Ca^{2+} и Mg^{2+} за связывание с активными центрами протонной помпы (Кудрин и др., 2000). Показано, что Co индуцирует ПОЛ, подавляет синтез ДНК в лимфоцитах, индуцирует синтез ФНО- α (Theocharis, 1994). Введение ионов Co приводит к увеличению апоптоза (Theocharis, 1994). В эксперименте на животных показано, что введение высоких доз кобальта приводит к окислительному стрессу (Калиман, Охрименко, 2005), который сопровождается повреждением различных биологических макромолекул, мембранных структур, изменением содержания восстановленного глутатиона и макроэргических соединений в клетке (Охрименко и др., 2005). Избыточное поступление кобальта приводит к аллергическим реакциям (Хаитов и др., 1995). Хроническая интоксикация кобальтом приводит к заболеваниям верхних дыхательных путей и к развитию кардиомиопатии (Хаитов и др., 1995). Сведений о влиянии солей кобальта на метаболические процессы в почках нет. Однако функциональное состояние почек непосредственно связано с деятельностью иммунной системы, поэтому можно ожидать, что повышенные концентрации кобальта могут оказать влияние на функции почек. Установлено, что Co в повышенной концентрации оказывает ферментотоксическое и цитотоксическое действие (Кудрин и др., 2000). Цитотоксическое воздействие кобальта во многом связано с влиянием на митохондрии клеток (Игнатова и др., 2004). Однако энергетические процессы в почечной ткани при действии на организм солей Co не изучены. Можно ожидать их существенного нарушения, что связано преимущественно с митохондриальным распределением металлов в клетках. Также не изучено влияние поступающих в организм избыточных количеств кобальта на содержание в ткани почек других биогенных элементов.

Целью нашей работы явилось изучение содержания некоторых металлов в ткани почки и показателей энергетического обмена в митохондриях нефроцитов крыс при внутрижелудочном введении раствора хлорида кобальта.

Материалы и методы

Исследования проведены на 3-месячных крысах-самцах линии Вистар, содержащихся в стандартных условиях вивария на сбалансированном питании. Животным на протяжении месяца ежедневно внутрижелудочно вводили раствор хлорида кобальта (3 мг/мл, из расчета 1 мл на 100 г массы тела). Контрольной группе животных ежедневно в течение месяца вводили физ. раствор (по 1 мл). Через 15 дней и через 30 дней животных выводили из эксперимента путем декапитации под легким эфирным наркозом. Почки быстро извлекали и охлаждали 3–5 минут на «сахарозном льду», содержащем 0,25 М замороженную сахарозу. Митохондрии получали по методу (Kamatch, Narayan, 1972) в модификации Лемешко (Лемешко, 1980). Активность пируватдегидрогеназы [К.Ф.1.2.4.1.] определяли по скорости накопления в инкубационной среде восстановленной пируватдегидрогеназным комплексом формы НАД, измеряемой спектрофотометрически при длине волны 340 нм (Методы биохимических исследований, 1982). Активность НАД-зависимой изоцитратдегидрогеназы [К.Ф.1.2.4.1.] определяли по скорости окисления изолимонной кислоты, которое сопровождается восстановлением эквимольных количеств НАД⁺. Увеличение количества восстановленной формы НАД в инкубационной среде регистрируется спектрофотометрически при длине волны 340 нм (Прохорова, 1982). Активность сукцинатдегидрогеназы [К.Ф.1.3.99.1.] определяли по восстановлению феррицианида калия до ферроцианида калия сукцинатом под действием сукцинатдегидрогеназы. Содержание ферроцианида калия определяли спектрофотометрически при длине волны 420 нм (Прохорова, 1982). Перекисное окисление липидов митохондрий почек исследовали в разных средах (с добавлением 0,5 мМ аскорбата, 0,4 мМ НАДФН) при концентрации белка митохондрий – 1 мг/мл (Владимиров, Арчаков, 1972).

Для изучения содержания биогенных элементов в почечной ткани одну из почек озольяли в муфельной печи при 800°C. Зола затем растворяли в дистиллированной воде, содержание металлов в ней определяли методом атомно-адсорбционной спектрофотометрии на приборе «Сатурн» (Брицке, 1982).

Результаты и обсуждение

Как видно из полученных нами данных, внутрижелудочное введение кобальта приводит к изменению содержания биогенных элементов в ткани почки (табл. 1).

На 15-е сутки с момента начала введения кобальта концентрация металла в ткани увеличивается почти в 2 раза, достоверно увеличивается содержание Ca , а концентрации Zn и Mg значительно снижаются. Ca принимает участие во всех этапах активации клеток. Поэтому установленное нами увеличение содержания Ca можно расценить как признак гиперактивации нефроцитов. Дефицит Zn и Mg , по современным данным, ассоциируется с наличием аутоиммунных заболеваний (Prentice, 1999; Sanstead, 1991). Возможно, накопление Co в почках приводит к появлению в организме антипочечных антител. Zn и Mg являются кофакторами многих ферментов,

необходимых для протекания ряда метаболических процессов, поэтому установленное нами снижение содержания этих металлов может быть причиной нарушения метаболизма в ткани. Снижение уровня Zn, вероятно, приводит к уменьшению активности супероксиддисмутазы в цитозоле и межмембранном пространстве митохондрий. От уровня Mg зависит активность митохондриальной СОД. Поэтому уменьшение содержания Zn и Mg можно расценивать как признак снижения активности антиоксидантной системы, что может стать причиной нарушения протекания окислительных процессов в митохондриях.

Таблица 1.
Содержание биогенных элементов в почках крыс при внутрижелудочном введении соли кобальта (мкг/г)

Группы животных	Cu	Ca	Zn	Mg	Co
Контрольная	3,05±0,17	29,26±1,34	13,96±0,98	14,87±1,03	6,81±0,48
Введение CoCl ₂ 15 суток	3,27±0,22 p>0,05	34,79±1,85 p<0,05	10,12±1,02 p<0,05	9,68±0,83 p<0,02	12,96±1,07 p<0,001
Введение CoCl ₂ 30 суток	2,31±0,12 p<0,05	50,68 ±2,37 p<0,001	9,15±0,63 p<0,01	8,02±0,62 p<0,001	30,42±1,84 p<0,001

На 30-е сутки с момента начала введения Co происходит дальнейшее снижение уровня Zn и Mg, при увеличении концентрации Ca и Co. В этот период также достоверно снижается концентрация меди (табл. 1). Медь входит в состав целого ряда ферментов: цитохромоксидазы, полифенилоксидазы, дофамингидролазы, ксантинооксидазы, диаминооксидазы и др. Снижение ее уровня, безусловно, отразится на протекании энергетических процессов в митохондриях, т.к. цитохромоксидаза – ключевой фермент тканевого дыхания. Снижение уровня Mg может существенным образом отразиться на синтезе нуклеотидов, липидов, энергетических процессах. Увеличение содержания Ca может также оказать влияние на окислительные процессы в митохондриях: при увеличении уровня Ca митохондрии накапливают Ca, снижая синтез АТФ.

Изучение активности митохондриальных ферментов показало, что через 15 дней после введения раствора хлорида кобальта достоверно снижается активность пируватдегидрогеназы и изоцитратдегидрогеназы при сохраненной активности сукцинатдегидрогеназы (табл. 2).

Таблица 2.
Активность митохондриальных ферментов в нефроцитах крыс через 15 дней с момента начала введения хлорида кобальта

Группы животных	Пируватдегидрогеназа, миллимоль НАДН ₂ минхг белка	Изоцитратдегидрогеназа, мкмоль НАДН ₂ минхг белка	Сукцинатдегидрогеназа, мкмоль сукцината минхг белка
Контрольная n=15	20,74±2,02	13,83±1,22	7,23±0,55
Экспериментальная (введение CoCl ₂) n=15	15,28±1,07 p<0,02	10,16±0,96 p<0,02	7,59±0,49 p>0,05

Пируватдегидрогеназа относится к числу наиболее сложных по своей структуре мультиэнзимных комплексов. Строгая упорядоченность структуры пируватдегидрогеназного комплекса обеспечивает максимальную эффективность биохимических реакций и создает предпосылки для функционирования механизмов регуляции. Скорость окисления пирувиноградной кислоты контролируется несколькими регуляторными факторами – концентрацией ионов Mg²⁺ и Ca²⁺, неорганического фосфата, отношением окисленных и восстановленных форм пиридиновых нуклеотидов и т.д. По-видимому, снижение активности пируватдегидрогеназы связано с установленным нами снижением содержания магния при введении в организм солей кобальта.

Окисление изоцитрата, катализируемое НАД-изоцитратдегидрогеназой, как и цитратсинтазная реакция, относится к наиболее медленным этапам ЦТК и может лимитировать общую скорость потоков метаболитов через цикл. Поэтому установленное в наших экспериментах снижение активности фермента может свидетельствовать о существенном снижении скорости синтеза АТФ. Возможной причиной снижения активности фермента является снижение концентрации ионов Mg²⁺, вызванное конкуренцией с Co²⁺ за транспортные белки.

Сукцинатдегидрогеназа (СДГ) входит в состав комплекса цепи переноса электронов и локализована во внутренней мембране митохондрий. СДГ обладает большим запасом каталитической мощности, который может быть реализован в процессе ее активации в различных физиологических состояниях организма. В связи с этим СДГ, не являясь лимитирующим ферментом цикла трикарбоновых кислот, выполняет важные регуляторные функции в системе энергетического метаболизма клетки. Вероятно, именно значительный запас каталитической мощности обеспечивает сохранение активности фермента при введении в организм солей кобальта.

Через месяц с момента начала введения солей кобальта отмечается дальнейшее снижение активности ферментов (табл. 3). Наиболее значительные изменения – в активности пируватдегидрогеназы. Установленные нами изменения в активности ферментов свидетельствуют о снижении скорости синтеза АТФ и, вследствие этого, развитии энергодефицитного состояния. Выявленные нами особенности энергетического обмена могут быть связаны не только с перераспределением ионов металлов в тканях, но и с активацией перекисного окисления липидов, вызванной введением Со. Изучение скорости накопления малонового диальдегида (МДА) при перекисном окислении липидов митохондрий почек показало, что на 15-й день с момента начала эксперимента аскорбат- и НАД-зависимые процессы перекисного окисления липидов несколько повышаются, однако изменения недостоверны, т.е. можно говорить лишь о тенденции активации ПОЛ в митохондриях (табл. 4). На 30-е сутки с момента начала эксперимента НАД-зависимое перекисное окисление достоверно снижается, а аскорбатзависимое (неферментативное) – значительно усиливается. Активация неферментативного ПОЛ, по-видимому, приводит к дестабилизации мембран митохондрий, что может стать причиной установленного нами снижения активности ферментов цикла Кребса.

Таблица 3.

Активность митохондриальных ферментов в нефроцитах крыс на 30-е сутки с начала эксперимента

Группы животных	Пируватдегидрогеназа <u>милимошь НАДН₂</u> минхг белка	Изоцитратдегидрогеназа <u>мкмошь НАДН₂</u> минхг белка	Сукцинатдегидрогеназа <u>мкмошь сукцината</u> минхг белка
Контрольная n=15	20,74±2,02	13,83±1,22	7,23±0,55
Экспериментальная n=15	10,00±0,93 p<0,001	9,08±0,53 p<0,001	6,41±0,24 p<0,02

Таблица 4.

Скорость накопления МДА в митохондриях почек крыс (нмошь МДА×мин⁻¹×мг белка⁻¹)

Группы животных	Исходный уровень		15 дней		30 дней	
	НАДФ-завис.	Аскорбат-завис.	НАДФ-завис.	Аскорбат-завис.	НАДФ-завис.	Аскорбат-завис.
Контрольная n=10	0,45±0,03	0,72±0,05	0,42±0,04	0,75±0,06	0,47±0,04	0,74±0,04
Экспериментальная n=10	0,45±0,03	0,72±0,05	0,47±0,04 p>0,05	0,82±0,06 p>0,05	0,34±0,02 p<0,02	1,12±0,07 p<0,01

Полученные результаты позволяют сделать следующие **выводы**:

1. Введение в организм животных кобальта приводит к накоплению его в ткани почки и достоверному изменению концентрации меди, цинка, магния, кальция, что может стать причиной нарушения метаболических процессов.

2. Одним из важных эффектов повышения концентрации кобальта в почечной ткани является увеличение содержания кальция, которое может стать причиной снижения синтеза АТФ в митохондриях.

3. Внутрижелудочное введение крысам раствора хлорида кобальта приводит к активации неферментативного и снижению ферментативного ПОЛ в митохондриях на 30-е сутки эксперимента.

4. Увеличение концентрации кобальта в организме животных приводит к снижению активности ключевых ферментов цикла Кребса уже на 15-е сутки с момента начала эксперимента.

5. Наиболее чувствительным к действию повышенной концентрации кобальта ферментом является пируватдегидрогеназа.

Список литературы

- Брицке М.Э. Атомно-абсорбционный спектрохимический анализ. – Москва, 1982. – 280с.
- Владимиров Ю.А., Арчаков И. Перекисное окисление липидов в биологических мембранах. – М.: Наука, 1972. – 252с.
- Игнатова С.И., Игнатова М.С. Терапевтические подходы к эктопатологии у детей // Лечение соматических заболеваний у детей. – М.: Стар Ко, 1996. – С. 38–44.
- Игнатова М.С., Харина Е.А., Солбирова Т.Н. и др. Нефропатии в регионе, загрязненном солями тяжелых металлов, возможности лечебно-профилактических мероприятий // Терапевтический архив. – 2004. – №1. – С. 33–37.
- Калиман П.А., Охрименко С.М. Цикл глюкоза – жирные кислоты при оксидативном стрессе у крыс, вызванном хлоридом кобальта // Укр. біохім. журн. – 2005. – Т.77, №2. – С. 154–158.
- Кудрин А.В., Скальный А.В., Жаворонков А.А. и др. Иммунофармакология микроэлементов. – Москва: Издательство КМК, 2000. – 537с.
- Лемешко В.В. Система микросомального окисления при развитии и старении организма // Биохимия. – 1980. – Т.45, №11. – С. 1964–1966.
- Охрименко С.М., Гурьева Н.Ю., Калиман П.А. Адаптация ферментов липидного и азотистого обмена у крыс при оксидативном стрессе, вызванном солями кобальта и ртути // Вісник Харківського національного університету імені В.Н.Каразіна. Серія: біологія. – 2005. – Вип.1–2, №709. – С. 56–60.
- Методы биохимических исследований / Под ред. М.И.Прохоровой. – Ленинград: Изд-во Ленинградского университета, 1982. – 271с.
- Нефрология / Под ред. Н.Е.Тареевой. – М.: Медицина, 2000. – 688с.
- Хаитов Р.М., Пилегин Б.В., Истаков Х.И. Экологическая иммунология. – М., 1995. – 218с.
- Iwata K., Saito H., Moriyama M. Renal tubular function after reduction of environment cadmium exposure: A ten years follow-up // Arch. Environ. Health. – 2003. – Vol.48/3. – P. 157–163.
- Kamatch S.A., Narayan K.A. Interaction of Ca²⁺ with endoplasmic reticulum of rat liver: a standard procedure for the isolation of rat liver microsomes // Anal. Biochem. – 1972. – Vol.48, №1. – P. 53–61.
- Prentice A.M. Accelerated thymus involution in magnesium-deficient rats is related to enhanced apoptosis and sensitivity to oxidative stress // B. J. Nutr. – 1999. – Vol.81, №5. – P. 405–411.
- Sanstead H.H. Zink deficiency. A public health problem? // Am. Dis. Child. – 1991. – Vol.145. – P. 853–859.
- Theocharis A.V. Trace element and apoptosis // Trace Elem. Biol. Med. – 1994. – №3. – P. 17–27.

Представлено: **В.І.Жуковим**

Рекомендовано до друку: **В.В.Мартиненко**

© С.М.Мартинова, Т.В.Горбач, 2009