

Міністерство освіти і науки України
ЛЬВІВСЬКИЙ НАЦІОНАЛЬНИЙ УНІВЕРСИТЕТ
ІМЕНІ ІВАНА ФРАНКА

На правах рукопису

Остапів Роман Дмитрович

УДК 575.854: 577.121.7

ВПЛИВ ТАУРИНУ НА ЕНЕРГЕТИЧНІ ПРОЦЕСИ
У КЛІТИНАХ ТВАРИН

03.00.13 – Фізіологія людини і тварин

Дисертація

на здобуття наукового ступеня кандидата біологічних наук

Науковий керівник:
доктор біологічних наук,
професор Манько В. В.

ЛЬВІВ–2016

Зміст

ВСТУП	7
РОЗДІЛ 1. ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ.....	12
1.1. Енергетичні процеси у клітинах тварин	12
1.1.1. Складові ланки енергетичних процесів	12
1.1.2. Гліколіз.....	13
1.1.3. Лактатдегідрогеназа.....	15
1.1.4. Цикл трикарбонових кислот	16
1.1.5. Дихальний ланцюг	18
1.1.6. Ензиматична система антиоксидантного захисту	22
1.1.7. Глюкозо-6-фосфатдегідрогеназа	25
1.1.8. Ензими переамінування.....	26
1.2. Фізіологічна роль таурину у організмі	28
1.2.1. Утворення, утилізація та обмін таурину	28
1.2.2. Роль таурину у обміні глюкози	30
1.2.3. Регуляція окисного метаболізму таурином.....	31
РОЗДІЛ 2. МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕНЬ.....	34
2.1. Дослідження впливу таурину <i>in vivo</i>	34
2.1.1. Схема досліджень впливу таурину <i>in vivo</i>	34
2.1.1. Дослідження фізіологічних показників щурів.....	36
2.1.1.1. Дослідження поведінкової активності щурів.....	36
2.1.1.2. Дослідження кількості еритроцитів	36
2.1.1.3. Дослідження вмісту гемоглобіну	37
2.1.1.4. Дослідження концентрації глюкози	37

2.1.1.5. Визначення інтенсивності споживання кисню мітохондріями та сперміями	38
2.1.2. Визначення показників антиоксидантного захисту тканин щурів	39
2.1.2.1. Визначення загальної активності супероксиддисмутази та розрахованої активності її ізозимів.....	39
2.1.2.2. Визначення активності каталази та розрахованої активності її ізоформ.....	41
2.1.2.3. Визначення активності глутатіонпероксидази	43
2.1.2.4. Визначення вмісту ТБК-активних продуктів.....	44
2.1.2.5. Визначення активності глюкозо-6-фосфатдегідрогенази.....	45
2.1.3. Визначення загальної активності лактатдегідрогенази та розрахованої активності її ізозимів.....	45
2.1.4. Визначення активності аланін- та аспартатамінотрансфераз	47
2.2. Дослідження впливу таурину <i>in vitro</i>	47
2.3 Статистично-математичне опрацювання результатів експериментів.....	49
РОЗДІЛ 3. РЕЗУЛЬТАТИ ДОСЛІДЖЕНЬ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ	50
3.1.Вплив таурину на фізіологічні показники тварин.....	50
3.1.1. Маса тіла та маса окремих органів щурів за тривалого перорального введення таурину.....	50
3.1.2. Вплив перорального введення таурину на показники крові щурів	52
3.2. Функціонування мозку щурів за тривалого введення таурину.....	60
3.2.1. Зміна поведінкової активності тварин під впливом таурину	60

3.2.2. Активність ензимів трансамінування та лактатдегідрогенази у мозку піддослідних тварин	63
3.2.3. Інтенсивність дихання мітохондрій мозку піддослідних тварин	66
3.2.4. Активність ензимів антиоксидантного захисту мозку піддослідних тварин	68
3.3. Вплив таурину на репродуктивну функцію самців	75
3.3.1. Фізіологічні показники сперміїв бугаїв за інкубації з таурином	75
3.3.2. Вплив тривалого введення таурину на репродуктивні показники самців щурів	79
3.3.2.1. Активність ензимів трансамінування та лактатдегідрогенази сім'яників піддослідних щурів	79
3.3.2.3. Інтенсивність дихання мітохондрій сім'яників піддослідних тварин	83
3.2.2.4. Активність ензимів антиоксидантного захисту сім'яників піддослідних тварин	85
3.4 Вплив тривалого введення таурину на енергетичне забезпечення стегнових м'язів щурів	92
3.4.1 Активність ензимів трансамінування та лактатдегідрогенази стегнових м'язів щурів	92
3.4.2. Інтенсивність дихання мітохондрій стегнових м'язів піддослідних тварин	95
3.4.3. Активність ензимів антиоксидантного захисту стегнових м'язів піддослідних тварин	97
3.5. Адаптивні процеси у печінці щурів за високих доз таурину	102
3.5.1. Маркерні ензими функціонування печінки	102

3.5.2. Інтенсивність дихання мітохондрій печінки за тривалого введення таурину	105
3.5.3. Активність ензимів антиоксидантного захисту печінки піддослідних тварин	108
РОЗДІЛ 4. УЗАГАЛЬНЕННЯ	114
ВИСНОВКИ.....	126
СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ.....	128

ПЕРЕЛІК УМОВНИХ СКОРОЧЕНЬ І ТЕРМІНІВ

- АОЗ – антиоксидантний захист
АЛТ – аланінамінотрансфераза
АСТ – аспартатамінотрансфераза
АТФ – аденозин-три-фосфат
АФО – активні форми кисигену
ДНК – дезоксирибонуклеїнова кислота
Г-6-ФДГ – глюкозо-6-фосфатдегідрогеназа
ГПО – глутатіонпероксидаза
Г-SH / Г-SS-Г – глутатіон: відновлена / окиснена форми
КАТ – каталаза
кДа – кілодальтон
 α -КГ – α -кетоглутарат
ЛДГ – лактатдегідрогеназа
ЛЖГР – лактозо-жовтково- гліцериновий розріджувач
НАД – нікотинаденіннуклеотид
НАДФН – нікотинаденіннуклеотидфосфат
ПААГ – поліакриламідний гель
ПОЛ – пероксидне окислення ліпідів
РНК – рибонуклеїнова кислота
СОД – супероксиддисмутаза
ЦТК – цикл трикарбонувих кислот
ФАД – флавінаденіндинуклеотид
ФСБ – фосфатно-сольовий буфер

ВСТУП

Актуальність теми. Таурин – похідна сірковмісних амінокислот, яка відіграє важливу роль у регулюванні багатьох фізіологічних процесів у організмі тварин [3]. Він регулює надходження Ca^{2+} у клітину [143], стимулює використання вуглеводів аеробним шляхом окиснення [123], збільшує активність лактатдегідрогенази [108]. Одночасно таурин підтримує рН у мітохондріях, що забезпечує фізіологічний перебіг процесів ресинтезу АТФ [91]. Також вказана сполука здатна взаємодіяти з НАДН-дегідрогеназою і відновлювати транспорт електронів у ланках ланцюга дихання мітохондрій після інгібування синтетичним неспецифічним конкурентним інгібітором MPP^+ [108]. Крім того, таурин бере участь у синтезі мітохондріальної РНК та є невід’ємним її компонентом [148]. Він проявляє антиоксиданту дію у клітинах та забезпечує функціонування ланок антиоксидантного захисту: неензиматичної – підвищуючи концентрацію відновленої форми глутатіону та вітаміну Е [62], і ензиматичної – стимулюючи активність супероксиддисмутази, каталази та глутатіонпероксидази [24, 25]. Таурин здатний нормалізувати обмін речовин, а за дії токсинів – забезпечувати їх утилізацію та виведення з організму. Сполуки, до складу яких він входить (N-олеїлтаурин та N-ацилтаурин), активують апоптоз у клітинах аденокарциноми простати [41]. Пероральне введення таурину покращує лікувальний ефект за мітохондріальної міопатії, енцефалопатії та лактозного ацидозу, які характеризуються зниженим споживанням кисню, продукції АТФ і активністю ензимів антиоксидантного захисту [148, 162]. Пероральне введення таурину нормалізує продукцію АТФ та знижує вміст малонового діальдегіду – основного кінцевого продукту пероксидного окиснення [132, 133].

Отже, ефекти таурину на перебіг клітинних процесів є багатогранні і у значній мірі спрямовані на підтримання енергетичного забезпечення клітин на певному рівні. Описані факти дозволяють рекомендувати використання таурину з метою корекції чи й лікування різноманітних патологій. Як наслідок, ця

сполука входить до складу багатьох продуктів харчової та косметичної промисловості. Проте вплив таурину на фізіологічно-біохімічні процеси у здоровому організмі за тривалого введення не достатньо досліджений. Встановлення механізмів впливу таурину на енергетичне забезпечення за такого введення, а також його ролі у фізіологічних процесах як клітин, так і окремих органів має важливе фундаментальне і прикладне значення.

Зв'язок роботи з науковими програмами, планами, темами. Дисертаційна робота виконана в межах держбюджетної теми кафедри фізіології людини і тварин Львівського національного університету імені Івана Франка «Вплив таурину на функціонування Ca^{2+} -транспортувальних систем і мітохондріальне дихання секреторних клітин» (№ держреєстрації 01112U001264, 2012–2013 рр.).

Мета і завдання дослідження. Дослідити вплив таурину на енергетичне забезпечення клітин різних тканин та інтенсивність окисних і антиоксидантних процесів в організмі тварин.

Для досягнення мети вирішували завдання:

З'ясувати вплив таурину на фізіологічні показники тварин.

Виявити вплив тривалого введення таурину на функціонування мозку щурів.

Дослідити репродуктивну функцію самців за впливу таурину.

Виявити вплив тривалого введення таурину на енергетичне забезпечення стежнових м'язів щурів.

Дослідити вплив високих доз таурину на адаптивні процеси у печінці щурів.

Об'єкт дослідження: енергетичне забезпечення, проокисні та антиоксидантні процеси у тваринних клітинах.

Предмет досліджень: фізіологічні показники організму тварин, інтенсивність дихання мітохондрій, активність ензимів антиоксидантного захисту, тра-

нсамінування, лактатдегідрогенази та глюкозо-6-фосфатдегідрогенази у тканинах щурів.

Методи дослідження: фізіологічні, препаративні, полярографічні, мікроскопічні, біохімічні, спектрофотометричні, описової та порівняльної статистики.

Наукова новизна отриманих результатів. Вперше досліджено, що за перорального введення таурину виникає гіпоксичний стан за рахунок зниження кількості гемоглобіну у еритроцитах, який компенсується зростанням числа червоних кров'яних тілець. Уперше описано і отримані дані про механізм зростання поведінкової активності щурів за тривалого перорального введення таурину – підвищується продукція глутамату цитоплазматичною аспаратамінотрансферазою. Уперше встановлено, що внаслідок тривалого перорального введення таурину зростає активність лактатдегідрогенази і відбувається перерозподіл її ізозимів у різних тканинах щурів. Досліджено, що інтенсивність дихання мітохондрій різних тканин щурів залежить від дози таурину та інтенсивності окисного метаболізму у тканинах щурів. Пероральне введення таурину спричиняє зростання процесів пероксидного окиснення ліпідів і ензиматичної ланки антиоксидантного захисту. За таких умов, в залежності від тканини, змінюється розрахована активність різних ізозимів супероксиддисмутази та каталази. Виявлено, що тривале пероральне введення таурину спричиняє підвищення енергетичних процесів у головному мозку, печінці, сім'яниках та м'язах стегна внаслідок інтенсифікації мітохондріального дихання так і зростання активності лактатдегідрогенази та глюкозо-6-фосфатдегідрогенази.

Практичне значення отриманих результатів. На основі оцінювання дії таурину на статеві клітини розроблено і впроваджено «Спосіб підвищення виживання сперміїв» (№ патенту 84569, опубліковано 25.10.2013 р.). Отримані результати тривалого введення таурину на фізіологічні та біохімічні показники організму і тканин щурів та їх інтерпретація можуть бути використані для прогнозування впливу таурину на організм людини за розроблення нових харчових

добавок та косметичних засобів. Експериментальні дані впроваджені у навчальний процес і використовуються при викладанні спеціалізованих курсів «Фізіологія травлення» та «Біоенергетика».

Особистий внесок здобувача. Усі експериментальні дослідження, підбір і аналіз даних літератури, статистичну обробку, теоретичне обґрунтування отриманих результатів, їхній опис та інтерпретацію здійснено автором особисто за методологічної допомоги наукового керівника.

Апробація результатів дисертації. Результати досліджень дисертаційної роботи доповідали на підсумковому міжкафедральному семінарі «Вплив таурину на енергетичне забезпечення клітин тварин» (30 жовтня 2015 р.), семінарах кафедри фізіології людини і тварин Львівського національного університету імені Івана Франка та лабораторії високоефективної хроматографії ДНДКІ ветеринарних препаратів та кормових добавок (2012–2015 рр.), звітних наукових конференціях біологічного факультету Львівського національного університету імені Івана Франка (2013–2015 рр.), а також конференціях: VIII–XI Міжнародній науковій конференції студентів та аспірантів «Молодь і поступ у біології» (Львів, 2012–2015 рр.), Міжнародній конференції «Актуальні проблеми сучасної біології, тваринництва та ветеринарної медицини» (Львів, 2014 р.) і Міжнародній конференції «Механізми функціонування фізіологічних систем» (Львів, 2014 р.).

Публікації. За результатами роботи опубліковано 6 статей у фахових журналах та тези 6 доповідей на міжнародних та всеукраїнських наукових конференціях.

Структура та обсяг дисертації. Дисертація складається з розділів «Вступ», «Огляд літератури», «Матеріали та методи досліджень», «Результати досліджень та їх обговорення», «Узагальнення», «Висновки» та «Список використаних джерел». Робота викладена на 146 сторінках друкованого тексту, проілюстрована 26 рисунками та 24 таблицями. Список цитованих джерел включає 175 найменувань.

РОЗДІЛ 1. ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ

1.1. Енергетичні процеси у клітинах тварин

1.1.1. Складові ланки енергетичних процесів

Енергетичні процеси – це низка реакцій, метою яких є отримання чи використання енергії, що запасається у вигляді макроергічного зв'язку АТФ. У більшості ссавців енергія використовується на утворенні вуглеводів, білків, жирів та нуклеїнових кислот. Тваринний організм отримує енергію у вигляді АТФ з гліколізу, окиснення жирних кислот, циклу трикарбонових кислот, дихального ланцюга мітохондрій. У більшості хребетних тварин отримання енергії починається з гліколізу, у якому глюкоза розщеплюється до пірувату [80].

Гліколіз – це низка необоротних реакцій, де одна молекула глюкози розщеплюється до двох молекул пірувату [104]. Джерелом пірувату можуть також служити жирні кислоти, які розщеплюються шляхом β -окиснення. За достатнього вмісту кисню, піруват декарбоксилюється і поступає у цикл Кребса, а за анаеробних умов перетворюється у лактат лактатдегідрогеназою [27]. Цикл трикарбонових кислот, є, в свою чергу, основним продуцентом відновних еквівалентів (електронів та протонів), які, за допомогою НАДН та ФАДН₂, поступають у дихальний ланцюг, ензими якого розташовані на внутрішній мембрані мітохондрій [104]. Різниця між концентрацією протонів між внутрішньомембранним та міжмембранним простором створює протонний градієнт [87], який використовує АТФ-синтаза для приєднання фосфату до АДФ і створення макроергічного зв'язку. Електрони ж передаються від одного протеїну-переносника на інший, з'єднуючись у кінці процесу з молекулярним киснем [66].

Однак процеси синтезу АТФ тісно пов'язані з утворенням активних форм кисню, які є фізіологічно нормальним явищем у організмі хребетних тварин. Однак зростання вмісту активних форм кисню приводить до неконтрольованого окиснення ліпідів, білків та нуклеїнових кислот, що у свою чергу спричиняє руйнування мембран органел та клітин, ушкодження ензиматичних систем, РНК та ДНК. Для знешкодження активних форм кисню існує система антиоксидантного захисту [59].

Таким чином, енергетичні процеси хребетних тварин складаються з двох нерозривно пов'язаних частин: ресинтезу АТФ та вільнорадикального окиснення. Ці два процеси взаємозалежні: зростає утворення АТФ, підвищується і продукція активних форм кисню. Однак, якщо процеси пероксидного окиснення неконтрольовано ростуть, то утворення АТФ зменшується [155].

1.1.2. Гліколіз

Глюкоза займає центральне місце у метаболізмі хребетних тварин завдяки великій потенційній енергії, що виділяється при повному розщепленні до води та карбон діоксиду (2,840 кДж/моль). Початковим етапом розщеплення глюкози є гліколіз – десять реакцій, у результаті яких з однієї молекули субстрату утворюється чотири молекули АТФ, та по дві НАДН та пірувату [80].

Гліколіз умовно поділяється на дві стадії: підготовчу, у якій витрачається дві молекули АТФ, та стадію віддачі енергії. Підготовча стадія починається транслюкуванням фосфату з АТФ на глюкозу. Реакція відбувається за допомогою ензиму гексокінази, з утворенням глюкозо-6-фосфат та АДФ [137]. Далі глюкозо-6-фосфат ізомеризується у фруктозу-6-фосфат під дією глюкозофосфатізомерази, або ж може окиснюватись глюкозо-6-фосфатдегідрогеназою і використовуватись у пентозофосфатному циклі для синтезу пентоз [60]. У третій реакції підготовчого етапу під дією фосфофруктокінази проходить фосфорилування фруктози-6-фосфат до фруктози-1,6-біфосфат [144]. Продукт реакції під

дією ензиму альдолази розщеплюється на дві фосфотріози: дигідроксиацетонфосфат та гліцеральдегід-3-фосфат [157]. У другий етап може вступити тільки гліцеральдегід-3-фосфат, тому остання реакція підготовчого етапу, що каталізується тріозофосфатізомеразою, перетворює дигідроксиацетонфосфат у нього [96].

Друга стадія гліколізу розпочинається з окиснення та фосфорилування гліцеральдегіду-3-фосфат. Реакцію каталізує ензим гліцеральдегід-3-фосфатдегідрогеназа, коензимом якого є НАД, що у процесі реакції відновлюється до НАДН [137]. Утворений 1,3-бісфосфогліцерат дефосфорилується фосфогліцераткіназою з утворенням АДФ до 3-фосфогліцерату. Реакція утворення АДФ називається субстратним фосфорилуванням, оскільки перенесення фосфату на АДФ відбувається внаслідок розщеплення субстрату [38]. В подальшому 3-фосфогліцерат ізомеризується фосфогліцератмутазою до 2-фосфогліцерату, який дегідратується до фосфоенолпірувату енолазою [104]. Продукт реакції дефосфорилується піруваткіназою до пірувату з утворенням АДФ. Для проходження реакції необхідні йони K^+ та Mg^{2+} , або Mn^{2+} . Піруват за наявності кисню декарбоксилюється і вступає у цикл трикарбонових кислот. Якщо ж кисень відсутній, або організм знаходиться у гіпоксичних умовах, то піруват лактатдегідрогеназою перетворюється у лактат [87].

Регуляція гліколізу здійснюється декількома факторами. Наявністю субстратів (субстратна регуляція) – чим менше субстрату для реакцій, тим нижчою є активність ензимів. У печінці протікання гліколізу тісно зв'язане з глюконеогенезом [80]. За низьких концентрацій глюкози проміжні продукти гліколізу можуть включатись у синтез цієї гексози [146]. Концентрація продуктів реакції також може модулювати швидкість перебігу розпаду глюкози. Так, велика концентрація глюкозо-6-фосфату інгібує гексокіназу, а високий вміст пірувату – піруваткіназу [22]. Крім цього, швидкість гліколізу залежить і від концентрації АДФ – за високих концентрацій сполуки інактивуються піруваткіназа та фосфофруктокіназа [124]. Ксилулозо-5-фосфат також регулює швидкість гліколізу

– він активує фосфопрофосфатазу, яка підвищує активність фосфофруктокінази [174]. Відповідно, концентрація фруктозо-2,6-біфосфату зростає, що стимулює гліколіз. Приймає участь у регуляції гліколізу й лактатдегідрогеназа. Так, за підвищення активності цього ензиму, шляхом над експресії генів, знижується рівень глюкози, тобто активуються ензими гліколізу, та зростає вміст лактату та пірувату у середовищі культивування [21].

1.1.3. Лактатдегідрогеназа

Лактатдегідрогеназа – ензим, що бере участь у зворотному перетворенні пірувату у лактат, для перебігу реакції необхідний коензим НАД. Реакція утворення лактату проходить в більшості хребетних тварин за умов нестачі кисню. За достатнього вмісту кисню та НАДН у клітині, лактат перетворюється у піруват [85].

Лактатдегідрогеназа – тетрамер, що складається з різних комбінацій двох субодиниць, які важать приблизно по 35 кДальтон: М «muscle» – вперше знайдена у скелетних м'язах, яка більш споріднена з піруватом, та Н «heart» вперше знайдена у серцевому м'язі, більш споріднена з лактатом. Відповідно, кожний тип субодиниці кодує свій ген LDHA – М субодиницю, LDHB – Н [94].

Існує п'ять ізозимів лактатдегідрогенази: LDH1 – складається з чотирьох Н субодиниць, LDH2 – з трьох Н та одної М, LDH3 з двох Н та двох М, LDH4 з одної Н та трьох М, а LDH5 з чотирьох М. Відповідно, LDH1 та LDH2 найбільш споріднені до лактату, а LDH4 та LDH5 до пірувату [86]. LDH3 найбільш лабільний ізозим, який з однаковою ефективністю перетворює піруват в лактат і навпаки [117]. Вміст кожного ізозиму залежить від типу тканини, так найтяжчий LDH5 домінує в м'язах та печінці людини, LDH4 – в сім'яниках, плаценті та нирках, LDH3 – в легенях, LDH2 – в лейкоцитах, а LDH1 – в серці [92]. У тканинах щурів тканиноспецифічність інша, так у тканині печінки та м'язах домінує LDH4, у серці та нирках LDH1 [32].

У фізіологічно нормальних тканинах існує динамічна рівновага між ізо-зомами лактатдегідрогенази. Так, за гіпоксичних умов зростає вміст LDH4 у скелетних м'язах, а у мозку – LDH3. У серці знижувався вміст LDH1, а зростав LDH4 [82].

Впродовж розвитку плоду відношення М та Н субодиноць лактатдегідрогенази змінюється [125]. На початку розвитку плоду вміст М субодиноці є найвищим у всіх органах і знижується до початку народження. У печінці найвища кількість М субодиноці на мг тканини спостерігається на 1–10 добу, й знижується до рівня дорослої особини на 35 добу розвитку плоду. У нирках діафрагми та серці рівні М та Н субодиноць найвищі на 10–15 добу, а у скелетних м'язах на 5 добу. У великих півкулях мозку вміст М та Н субодиноць й загальна активність ензиму висока впродовж 20–30 доби, що співпадає з інтенсивним розвитком нервової системи. Протилежна картина у середньому мозку, де пік активності ензиму і вмісту ізозимів припадає на 5–20 добу [125].

Ракові клітини бідні на мітохондрії, й піруват не утилізується у циклі Кребса. Накопичення пірувату приводить до зростання вмісту ізозиму LDH5 та зменшенню всіх інших. Через це LDH5 може слугувати маркером неоплазії у тканині [27]. За зниження активності LDH5 зростає інтенсивність споживання кисню мітохондріями, потенціал їх мембрани та збільшується оксидативний стрес. Це веде до зниження проліферації ракових клітин та підвищує чутливість до хіміотерапії [27].

1.1.4. Цикл трикарбонових кислот

Цикл трикарбонових кислот (цикл лимонної кислоти; цикл Кребса) – циклічна послідовність ензимативних реакцій, у результаті яких ацетил-КоА окислюється до двоокису вуглецю. Ензими циклу Кребса локалізовані в мітохондріях та функціонально та біохімічно спряжені з електронтранспортним ланцюгом у який поступають електрони та протони від НАДН та ФАДН₂ [158].

Першою реакцією циклу Кребса є утворення лимонної кислоти (цитрату) за рахунок конденсації ацетил-КоА з щавлевооцтовою кислотою (оксалоацетатом). Реакція каталізується цитратсинтазою [163].

Другою реакцією є перетворення (ізомеризація) цитрату у ізоцитрат. Реакція каталізується ензимом аконітазою і складається з двох етапів. Перший етап починається дегідратацією лимонної кислоти з утворенням цис-аконітової кислоти (цис-аконітату). Другий етап полягає у гідратації цис-аконітату [50].

Третьою реакцією циклу трикарбонових кислот є дегідрування та декарбоксілювання ізоцитрату. Реакція каталізується ізоцитратдегідрогеназою і призводить до утворення α -кетоглутарової кислоти (α -кетоглутарату). Для реакції необхідні іони Mg^{2+} чи Mn^{2+} та НАД. Ізоцитратдегідрогеназа є регуляторним ензимом циклу трикарбонових кислот, активатором якого служать великі концентрації АДФ, а інгібітором – НАДН [48].

Четверта реакція – окислювальне декарбоксілювання α -кетоглутарату з утворенням сукциніл-КоА. Ця стадія ЦТК каталізується мультиензимним α -кетоглутарат-дегідрогеназним комплексом для нормальної роботи якого потрібно 5 коензимів: тіаміндифосфат, ліпоєву кислоту, коензим А, НАД⁺ та ФАД [44].

Утворений сукциніл-КоА вступає у п'яту реакцію – деацилювання сукцинілтіюкіназою, в результаті утворюється сукцинат. У результаті розщеплюється макроергічний зв'язок у молекулі сукциніл-КоА, за рахунок вивільненої енергії утворюється нова макроергічна сполука гуанозинтрифосфат (ГТФ). Він може передавати свою кінцеву фосфатну групу на АДФ, цю реакцію каталізує нуклеозиддифосфокіназа [166].

П'ятою реакцією циклу лимонної кислоти є окислення сукцинату до фумарової кислоти (фумарату). Вона каталізується ФАД-залежним ензимом сукцинатдегідрогеназою, що локалізована на внутрішній мембрані мітохондрій і входить до дихального ланцюга [97].

Шоста реакція циклу трикарбонових кислот полягає у перетворенні

фумарової кислоти на яблучну кислоту (малат) внаслідок гідратації фумарату. Реакція каталізується фумаратгідратазою (фумаразою). Це високостереоспецифічний ензим, який каталізує гідратацію подвійного зв'язку транс-типу [119].

Сьомою реакцією циклу лимонної кислоти є окислення малату до оксалоацетату (щавлевооцтової кислоти). Реакція каталізується НАД-залежним ензимом – мітохондріальною малатдегідрогеназою. Малатдегідрогеназна реакція завершує цикл трикарбонових кислот. Оксалоацетат, який є продуктом даної реакції, здатний до взаємодії з ацетил-КоА [169].

Регуляція інтенсивності проходження реакцій циклу трикарбонових кислот визначається цитратсинтазою. Активність цього ензиму гальмується аденозинтрифосфатом (АТФ), НАДН, сукциніл-КоА, а активується ацетил-КоА та оксалоацетатом [88]. Крім цього, ізоцитратдегідрогеназу та α -кетоглутаратдегідрогеназу активує збільшення концентрації вільного Ca^{2+} [163].

Біохімічний підсумок циклу трикарбонових кислот полягає в утворенні двох молекул CO_2 (в ізоцитратдегідрогеназній та α -кетоглутаратдегідрогеназній реакціях) і відновленні 3 НАД⁺ та 1 ФАД. Ці коензими поступають, після відновлення, поступають у дихальний ланцюг, у результаті окислення НАДН утворюються 2,5 молекули АТФ, а за ФАДН₂ 1,5 молекули АТФ. Крім того, одна молекула АТФ утворюється в субстратному фосфорилуванні за перетворення сукциніл-КоА в сукцинат. Таким чином, при повному окисненні однієї молекули ацетил-КоА до CO_2 та H_2O в циклі трикарбонових кислот генерується 12 молекул АТФ. [104].

1.1.5. Дихальний ланцюг

Ланцюг перенесення електронів (дихальний ланцюг; електронтранспортний ланцюг) це ряд протеїнів вмонтованих у внутрішню мембрану мітохондрій та допоміжних транспортерів, які передають електрони від донорів до акцепто-

рів за допомогою окислювально-відновних реакцій [66]. При цьому, переніс електронів спряжений з викачуванням протонів у міжмембранний простір. Електрони поступають у дихальний ланцюг з ЦТК. Електронтранспортний ланцюг забезпечує окисне фосфорилування, що спряжене з процесом переносу електронів: електрони високоенергетичного відновленого донора переносяться проміжними транспортерами до термінального акцептора з утворенням низькоенергетичного продукту [134, 135]. У процесі переходу електронів через систему дихального ланцюга відбувається поступове виділення вільної енергії (вона запасується в хімічних зв'язках АТФ при поетапному проходженні електронів), і до кисню електрони переносяться вже енергетично збіднілими [58].

У складі дихального ланцюга знаходяться: піридинзалежні дегідрогенази (містять НАД⁺); флавінзалежні дегідрогенази (ФАД- та ФМН-вмісні) цитохроми (b, c, c₁, a, a₃); залізо-сірковмісні білки, що містять негемове залізо (FeS); вільний коензим – убіхінон (коензим Q). Кінцевим акцептором електронів у дихальному ланцюзі є молекулярний кисень. В результаті сполучення кисню з електронами та протонами утворюється вода [134].

Комплекс перший: (КФ 1.6.5.3; НАДН-дегідрогеназа; НАДН: убіхінон оксиредуктаза) передає два електрони з НАДН розчинному в ліпідах мембрани транспортеру убіхінону. НАДН-дегідрогеназа є одним із комплексів дихального ланцюга, де можуть утворюватись супероксид аніони [175].

Перенесення електронів з I комплексу дихального ланцюга відбувається в декілька стадій. Спочатку нікотинаміддинуклеотид окиснюється відновлюючи при цьому флавінмононуклеотид, який в дві стадії здійснює передачу електронів на убіхінон. Флавінмононуклеотид може окиснюватись тільки через семіхіноновий посередник [104].

Специфічним інгібітором першого комплексу транспорту електронів у ланцюгу дихання є ротенон – ізофлаваноїд, який формується у листках деяких тропічних рослин, зв'язується з сайтом убіхінону. Подібні властивості блокування перенесення електронів проявляє періцидин А, який є за структурою го-

мологом до убіхінону. Перешкоджає окисненню НАДН аденозиндифосфатрибоза [135].

Комплекс другий (КФ 1.3.5.1; сукцинатдегідрогеназа) – флавопротеїн, для роботи якого необхідний коензим ФАД. Цей ензим окиснює сукцинат, відновлює ФАД, а він, у свою чергу, транспортує два атоми водню ($2\text{H}^+ 2\text{e}^-$) на коензим Q [39].

Сукцинатдегідрогеназа складається з чотирьох субодиниць: SDHA, SDHB, SDHC та SDHD. Дві з цих одиниць є гідрофільними, дві – гідрофобні. Одна з гідрофільних субодиниць містить місце взаємодії з флавінаденіндинуклеотидом, інша містить три Fe – S кластери, для передачі електронів на убіхінон. Гідрофобні субодиниці існують для прикріплення до внутрішньої мембрани мітохондрій [156].

Встановлено дві групи інгібіторів сукцинатдегідрогенази. Для першої групи характерною є взаємодія і зв'язування з сайтом субстрату, для другої – зв'язування з сайтом убіхінону. Сукцинатподібні інгібітори включають малонат, оксалоацетат, малат. Убіхінонподібні інгібітори: карбоксин, теноїлтрифлуорацетон [58].

Коензим Q (убіхінон) – ліпідорозчинний хінон з ізопреноїдним бічним ланцюгом, що містить у тканинах ссавців десять п'ятиуглецевих ізопреноїдних залищків (Q_{10}). Убіхінон виконує функцію колектора відновлювальних еквівалентів, акцептуючи протони та електрони не тільки від ФМН-залежної НАДН-дегідрогенази, а й від ФАД-залежних дегідрогеназ мітохондрій. Відновлений продукт CoQH_2 , завдяки гідрофобності, може вільно переміщуватись крізь мембрану [39].

Комплекс третій (КФ 1.10.2.2; Коензим-Q-цитохром-С-редуктаза; убіхінолдегідрогеназа) – складається з цитохрому b, FeS-протеїну та цитохрому c_1 і забезпечує перенесення електронів від убіхінону на четвертий комплекс дихального ланцюга [42].

Комплекс цитохромів $b - c_1$ забирає в кілька стадій на себе два електрони з убіхінону. Спочатку електрони потрапляють на цитохром b , а потім вони послідовно передаються на дві молекули цитохрому c_1 , з якого, своєю чергою, транспортуються на цитохром c . В процесі перенесення електронів комплекс цитохромів $b-c_1$ забезпечує формування протонного градієнту і перенесення їх на зовнішню поверхню мембрани [160]. Коли інтенсивність транспорту електронів знижується, що може бути викликано високим мембранним потенціалом, точковими мутаціями чи інгібіторами, вони можуть безпосередньо зв'язуватися з молекулярним киснем і утворювати радикал супероксиду, який є високотоксичним і може спричинити різні види патологій [101].

Інгібіторами третього комплексу є міксотіазол та стигмателін, що зв'язуються з сайтами відновлення цитохрому b . Міксотіазол зв'язується з білковим компонентом біля гемової групи, а стигмателін з сульфуром гемової групи [66].

Комплекс четвертий (КФ 1.9.3.1; Цитохром c -оксидаза) – складається з цитохромів a й a_3 . Ці ензими здійснюють останню стадію біологічного окиснення – відновлення електронами ($2e^-$) молекулярного кисню: $2e^- + \frac{1}{2} O_2 \rightarrow O^{2-}$. Відновлений кисень O^{2-} реагує з вільними протонами ($2H^+$) матриксу. В результаті реакції утворюється ендогенна, або метаболічна вода: $2H^+ + O^{2-} \rightarrow H_2O$ [74].

Інгібіторами четвертого комплексу є ціанід, сульфід, азид, карбонмонооксид, мурашина кислота. Вони зв'язуються з цитохромоксидазою, повністю гальмуючи транспорт електронів до кисню [134].

АТФ-синтаза (КФ 3.6.3.14) – це ензим, який деякі автори відносять до електронтранспортного ланцюга і називають п'ятим комплексом [34].

У структурно-функціональному плані АТФ-синтаза складається з двох великих фрагментів, що позначаються символами F_1 і F_0 [102]. Перший з них (фактор сполучення F_1) звернений у бік матриксу мітохондрії і помітно виступає з мембрани у вигляді сферичного виступу висотою 8 нм і шириною 10 нм.

Він складається з дев'яти субодиниць, представлених п'ятьма типами білків [171]. Мембранна частина АТФ-синтетази, яка називається фактором спряження F_0 , являє собою гідрофобний білковий комплекс, який пронизує мембрану наскрізь і має всередині себе два півканали для проходження протонів водню. Всього до складу комплексу F_0 входить одна білкова субодиниця типу А, дві копії субодиниці В, а також від 9 до 12 копій малої субодиниці С [28].

Відповідно до прийнятої моделі синтезу АТФ (також званої моделлю не-постійного каталізу), градієнт електричного поля, спрямований поперек внутрішньої мітохондріальної мембрани і зумовлений електронтранспортним ланцюгом, змушує протони проходити крізь мембрану через АТФ-фазний компонент F_0 . Частина компонента F_0 (кільце з c -субодиниць) обертається, коли протони проходять через мембрану. При кожному оберті γ -субодиниці на 360° синтезуються три молекули АТФ. При цьому, у різних організмів з міжмембранного простору в матрикс проходить від 10 до 14 протонів [36].

У механізмі зміни ділянки зв'язування задіяна β -субодиниця, яка послідовно проходить через три стани. У «відкритому» стані АДФ і фосфат підходять до β -субодиниці. Наступна зміна форми протеїну «притискає» молекули один до одного, що призводить до формування АТФ. Після утворення макроерга β -субодиниця знову переходить у "відкритий" стан, звільняє АТФ, після чого цикл синтезу АТФ повторюється. ККД АТФ-синтази близький до 100% [31].

За певних умов каталітична реакція може протікати в зворотному напрямку, при цьому гідроліз АТФ викликає прокачування протонів через мембрану [33].

1.1.6. Ензиматична система антиоксидантного захисту

Антиоксидантний захист – це система, що відповідає за регуляцію інтенсивності утворення радикалів та знешкодження продуктів пероксидації [138]. Завдання системи антиоксидантного захисту – підтримання балансу між інтен-

сивністю утворення радикалів та потребами організму у синтезі біологічно-активних речовин, регуляції проникності мембрани, детоксикації [175].

Система антиоксидантного захисту поділяється на неензиматичну – водорозчинні та жиророзчинні хімічні речовини, що реагують з радикалами оксигену та їх похідними, знешкоджуючи їх, та ензиматичну – ензими, що каталізують деградацію активних форм оксигену [101].

До ензимів антиоксидантного захисту відносяться супероксиддисмутаза, що інактивує супероксиданіон радикал; каталаза, що розкладає гідроген пероксид (H_2O_2), а також глутатіонова система, функція якої полягає у розкладі H_2O_2 та гідроксильного аніону та відновленні глутатіону [71].

Супероксиддисмутаза (КФ 1.15. 1. 1.; СОД) ензим, що каталізує реакцію дисмутації супероксиданіон радикалу в гідроген пероксид. Відноситься до класу оксидоредуктаз і є металопротейном [49]. У клітинах еукаріот існує три види ізозимів. Mn-вмісний – локалізується виключно в матриксі мітохондрій і його молекулярна маса становить 80 кДа [109]. Cu/Zn-вмісні ізозими знаходяться у цитоплазмі еукаріотичних клітин, димер, молекулярна маса 32 кДа [100]. Існує й позаклітинний ізозим – Cu,Zn-вмісний, який має молекулярну масу 135–140 кДа і є глікопротеїном, що має високу спорідненість до певних глікозаміногліканів, таких як гепарин та гепарансульфат [173]. Марганецьвмісний ізозим складається з чотирьох ідентичних субодиниць з молекулярною масою 20 кДа. Цинк/купрумвмісні ізозими складаються двох ідентичних субодиниць, молекулярна маса яких 16 кДа. Вони зв'язані між собою гідروفобними та електростатичними взаємодіями. Позаклітинний ізозим є гомотетрамером, субодиниця має молекулярну масу близько 35 кДа [49].

Активність Cu,Zn-вмісного ізозиму не залежить від рН середовища, і лежить в межах 5–9, а активність Mn-вмісного ізозиму знижується при значеннях рН нижче нейтральних. Гідроген пероксид інгібує Cu/Zn-вмісний ізозим, а Mn-вмісний ізозим стійкий до дії H_2O_2 [154].

Встановлено, що є декілька Cu,Zn-вмісних ізозимів, однак вони не відрізняються за фізико-хімічними властивостями і проявляють супероксиддисмутазну активність, хоча розділяються у поліакриламідному гелі [79].

Каталаза (КФ 1.11.1.6, H₂O₂: H₂O₂-оксидоредуктаза; КАТ) – ензим, який належить до класу оксидоредуктаз. Основною функцією каталази є каталіз реакції перетворення гідроген пероксиду на воду. Ензим активується коли концентрація H₂O₂ є значно вища за фізіологічну норму [67]. Існує декілька типів каталаз: гемові, які наявні в більшості клітин ссавців, негемові, які властиві для бактерій та рослин і мінорні [106, 107]. Гемові каталази поділяються на два типи: перший тип здатний утилізувати гідроген пероксид; другий тип може діяти і як пероксидаза [105]. Каталаза знаходиться переважно в пероксисомах клітин ссавців, але наявна і в мітохондріях, цитозолі та у позаклітинному просторі.

Гемові каталази першого типу складаються з чотирьох ідентичних субодиниць (молекулярна маса ензиму ~ 60 кДа), кожна з яких зв'язана з молекулою гему та НАДФН [170]. Гемові каталази другого типу є гетеротетрамерами, вони складаються з двох типів субодиниць: легкої молекулярною масою 60 кДа та важкої – 70–75 кДа [69]. Обидва типи каталази ссавців активні при рН 4–11. Купрум та цинк є неконкурентними інгібіторами каталази, а ціаніди – конкурентними, утворюючи з гемом стабільний комплекс [67].

Глутатіонова система антиоксидантного захисту включає три глутатіон-залежних ензими: глутатіонпероксидаза, глутатіонредуктаза, глутатіонтрансфераза. Центральний метаболіт системи – трипептид глутатіон, глутамілцистеїнілгліцин (G-SH) володіє власною антиоксидантною активністю й функціонує у якості кофактора, донора протонів, метаболіту й субстрату з ензимами системи, а також із супероксиддисмутазою і каталазою [167].

Глутатіонпероксидаза (КФ 1.11.1.9; ГПО) – це протеїн з молекулярною масою 76–99 кДа, близько 70% його міститься в цитозолі і приблизно 20% – в мітохондріях клітин ссавців. Ензим каталізує окиснення глутатіону і деактивує гідроген пероксид. Спорідненість глутатіонпероксидази до H₂O₂ є вищою, ніж у

каталази, що має значення при захисті від низьких концентрацій гідроген пероксиду, які виникають частіше [64].

Різні форми глутатіонпероксидаз, які відрізняються за локалізацією в організмі, кодуються декількома генами. Структурно ензими даної родини представлені у вигляді тетрамерних глікопротеїнів [29].

Глутатіонпероксидаза є двох типів: тип I – селензалежна; тип II – селеннезалежна. Активність знешкодження продуктів ПОЛ ізозимами глутатіонпероксидази першого та другого типів є взаємозалежною; так, при дефіциті Se активність другої ізоформи зростає. Слід зауважити, що хоч антиоксидантна активність глутатіонпероксидази другого типу і переважає в печінці, однак вона не каталізує розщеплення H_2O_2 . У процесах забезпечення стабільності біофізичних і біохімічних характеристик мембран роль глутатіонпероксидази є набагато більша, ніж каталази та супероксиддисмутази [56].

Глутатіонтрансфераза (КФ 2.5.1.18) – це ензим, що складається з мультифункціональних білків, які використовують відновлений глутатіон для захисту організму від оксидативного стресу шляхом відновлення гідропероксидів жирних кислот і нуклеотидів [59].

Глутатіонредуктаза (КФ 1.8.1.7) – це флавопротеїд, який локалізується в мітохондріальному матриксі та цитозолі, каталізує реакцію відновлення глутатіону. Це підтримує сталу концентрацію відновленого глутатіону, а значить і активність глутатіонпероксидази. Відновлення глутатіону відбувається за рахунок енергії НАДФН, що утворюється в дегідрогенізації глюкозо-6-фосфату [73].

1.1.7. Глюкозо-6-фосфатдегідрогеназа

Глюкозо-6-фосфатдегідрогеназа (К.Ф. 1.1.1.49; н-глюкозо-6-фосфат: НАДФ оксиредуктаза; Г-6-ФДГ) – перший ензим пентозофосфатного шляху, що каталізує реакцію дегідрогенування глюкозо-6-фосфату з відновленням НАДФ [84].

Ензим у більшості хребетних тварин є тетрамером, що складається з двох субодиниць, одна з яких зв'язана з НАДФ. Існує два ізозими глюкозо-6-фосфат дегідрогенази, які відрізняються за молекулярною масою, оскільки залишок аргініну у 57 положенні замінюється ланцюжком з 47 амінокислот. При цьому, виявлено, що для проходження реакції окиснення глюкозо-6-фосфату не потрібно ніяких додаткових іонів металу. Однак, зростання концентрації іонів Ca^{2+} , Mg^{2+} та Zn^{2+} приводить до збільшення активності першого ізозиму у півтора-два рази [46].

Активність обох ізозимів зростає за збільшення концентрації НАДФ та глюкозо-6-фосфату. Високі концентрації глюкози та фруктози також мають позитивний ефект на активність глюкозо-6-фосфат дегідрогенази [60]. За впливу інсуліну активність ензиму зростає, а підвищене виділення глюкагону знижує. Оскільки, глюкозо-6-фосфат дегідрогеназа постачає НАДФН на відновлення глутатіону та синтез жирних кислот, і відноситься до групи ліпогенних ензимів, то її активність тісно пов'язана з цими процесами [45]. Так, за знижених концентрацій відновленого глутатіону експресія глюкозо-6-фосфат дегідрогенази зростає. Таким чином клітина захищає себе від оксидативного стресу [126]. Що стосується синтезу жирних кислот, то активність ензиму змінюється з гіпогенними процесами у клітині [129].

1.1.8. Ензими переамінування

Переамінування це – перенесення аміногрупи з амінокислоти на кетокислоту. Цю реакцію каталізують трансамінази, а обов'язковим кофактором є піридоксамін-5'-фосфат. Перенесення аміногрупи складається з двох напівреакцій; на проміжному етапі яких утворюється піридоксамін-5'-фосфат: комплекс апоензиму з коензимом [168]. Процес трансамінування оборотній. Ензими, що каталізують реакцію переамінування є регуляторами вмісту амінокислот у клітині, а отже і білкового обміну [83]. Трансамінази є внутрішньоклітинними ен-

зимами і вимірювання їх активності у сироватці крові є маркером цілісності клітин. Найчастіше, як маркери використовують аспартатамінотрансферазу та аланін амінотрансферазу [89].

Аспартатамінотрансфераза (КФ 2.6.1.1 L-аспартат : 2-оксоглутарат амінотрансфераза, АСТ; глутамат: оксалоацетат трансаміназа, ГОТ) ензим, що каталізує трансамінування від L-аспартату на 2-оксоглутарат з утворенням оксалоацетату і L-глутамату [104].

У клітинах ссавців АСТ існує у вигляді двох ізоензимів – цитозольного (цАСТ, молекулярна маса 92,6 кДа) і мітохондріального (мАСТ, молекулярна маса. 89,8 кДа), їх ізоелектричні точки відповідно, 6 та 9, оптимум рН 8,0–8,5 [75]. Близько 1/3 загальної внутрішньоклітинної кількості протеїну АСТ локалізується в цитоплазмі клітин, 2/3 – в мітохондріях [89].

Мітохондріальна трансаміназа зв'язує аспартат приблизно в 4 рази краще, ніж цитоплазматична. У формі піридоксаміну кожен ізоензим володіє більшою спорідненістю до 2-оксоглутарату, ніж до оксалоацетату. При цьому, мітохондріальний ізоензим має ще нижчу спорідненість до оксалоацетату, порівняно з цитоплазматичним [70].

АСТ виконує роль зв'язуючої ланки між білковим і енергетичним обмінами. Продукт реакції глутамат – нейромедіатор, що виконує збуджуючу функцію; а оксалоацетат – один з головних регуляторних чинників, які визначають швидкість функціонування циклу Кребса [172].

Аланінамінотрансфераза (КФ 2.6.1.2 глутамат: аланін амінотрансфераза, АЛТ; глутамат: піруват трансаміназа, ГПТ), ензим, що каталізує трансамінування від L-глутамату на піруват з утворенням 2-оксоглутарату і L-аланіну [89].

У тканинах ссавців АЛТ існує у вигляді двох ізозимів АЛТ1 та АЛТ2 [167]. Другий ізозим на 28 амінокислотних залишків на N-кінці більший за перший. АЛТ1 має більшу спорідненість до аланіну в той час, як АЛТ2 до глутамату [121]. Обидва ізозими наявні як у мітохондріях та і у цитоплазмі, проте у першому випадку переважає АЛТ1, а у другому АЛТ2 [57]. Співвідношення

ізозимів є тканиноспецифічним, так у печінці та мозку щурів кількість АЛТ1 та АЛТ2 приблизно однакова, а у серці, нирках, шлунку, тонкій та товстій кишках переважає перший ізозим, у поперечно-посмугованих м'язах домінує другий ізозим [127, 128].

АЛТ – з'єднуюча ланка між білковим та енергетичним обміном, оскільки при перенесенні аміногрупи з глутамату на піруват утворюється α -кетоглутарат, що поступає у цикл трикарботових кислот, та аланін – найбільш поширена амінокислота, що використовується для синтезу білків [23]. За зворотної реакції утворений піруват може вступати в цикл Кребса, а може і брати участь у глюконеогенезі. Глутамат є одним з активаторів нервової системи, тому збільшення його концентрації може призвести до підвищення поведінкової активності тварин [104].

1.2. Фізіологічна роль таурину у організмі

1.2.1. Утворення, утилізація та обмін таурину

Таурин – основна похідна сірковмісних амінокислот, що наявна у великій кількості у мітохондріях та міжклітинній рідині тканин хребетних тварин. У найбільших концентраціях наявний у м'язах (1–3 мкмоль/г тканини [99]), сім'янику (2–4 мкмоль/г тканини [51]), мозку (5–7 мкмоль/г тканини [165]) та печінці (8–12 мкмоль/г тканини [145]).

У цих тканинах таурин утворюється з сульфовмісних амінокислот метіоніну та цистеїну [91]. Метіонін транссульфується до цистеїну, який в свою чергу окиснюється до цистеїнсульфінату цистеїндіоксигеназою. Продукт реакції може декарбоксилюватись цистеїнсульфінат декарбоксилазою до гіпотаурину. Продукт реакції окиснюється гіпотауриндегідрогеназою до таурину. Крім того, існує ще один шлях синтезу таурину, що бере свій початок від коензиму А, який перетворюється на цистеїнамін за допомогою декарбоксилювання

[145]. Продукт реакції перетворюється 2-аміноетантиолдигеназою на гіпотаурин, який окиснюється до таурину. Відновлення таурину до попередніх сполук не можливе, адже організм тварини не може відновлювати сульфур [76].

Таурин є напівзамінною амінокислотою у більшості хребетних тварин, а у котячих він є вітаміноподібною речовиною. Це означає що сам організм не може синтезувати потрібну кількість таурину і необхідно потрапляння цієї сполуки з їжею [72]. Таурин всмоктується у тонкому кишечнику і транспортується у тканини з кровотоком [152]. У клітини таурин поступає за допомогою котранспорту з натрієм, однак можливий котранспорт з кальцієм і хлором [142]. Хоча не встановлений мітохондріальний транспортер таурину, однак виявлено, що мітохондрії здатні його поглинати з зовнішнього середовища [148].

Незважаючи на високий вміст у тканинах таурину, швидкість його синтезу та утилізації є різною і залежить від активності ензимів, що беруть участь в утилізації сульфурвмісних кислот [81]. Так, методом радіоактивної мітки показано, що у щурів найвища інтенсивність обміну спостерігається в печінці, нижча зареєстрована у сім'яниках. Концентрація таурину з часом майже не змінювалась у мозку та скелетних м'язах [145]. Печінка є органом, який екскретує надлишок таурину з організму тому його обмін у цьому органу є найшвидший. У печінці таурин зв'язується з жовчними кислотами і виводиться через жовчні протоки [72]. Сім'яники потребують таурин для утворення сперміїв, і при дозріванні спермії переходять у придаток, а в них міститься значна частина таурину [51]. Саме тому обмін таурину у сім'яниках має середній рівень. Скелетні м'язи потребують велику кількість таурину для підтримання активності ензимів антиоксидантного захисту та синтезу АТФ дихальним ланцюгом [53], а отже постійна концентрація необхідна, а ензими синтезу цієї сполуки слабо експресовані [110]. Таурин відіграє в мозку відіграє роль активатора нервової діяльності блокуючи рецептори γ -аміномасляної кислоти, однак постійне блокування цих рецепторів може привести до гіперактивності [150]. Тому концентрація таурину підтримується на сталому рівні.

Отже, таурин синтезується з метіоніну, цистеїну та коензиму А. Речовини спочатку декарбоксилуються, потім окислюються. Концентрації таурину у тканинах та рівень обміну залежить від його функціональної ролі.

1.2.2. Роль таурину у обміні глюкози

Таурин довгий час вважався кінцевим інертним продуктом обміну цистеїну та метіоніну [103]. Однак численні дослідження показали, що ця сполука бере участь у регуляції обміну глюкози [43]. Так, додавання таурину у питну воду мишам на фоні підвищеного вмісту у їжі вуглеводів знижувало рівень глюкози у крові [54]. Дослідження секретії інсуліну ізольованими клітинами підшлункової залози мишей за додавання глюкози показали, що за наявності у середовищі інкубації таурину зростала секреція інсуліну [37]. Додавання карбахолу на фоні таурину спричинювало більший вхід Ca^{2+} у ізольовані клітини підшлункової залози, ніж без нього [123]. У мишей, які протягом 30 діб пили 2% розчин таурину, був більше експресований L-тип Ca^{2+} -каналів у підшлунковій залозі, збільшена чутливість до глюкози острівцями Лангерганса, їх кількість, площа і секреція ними інсуліну [130]. Все це вказує на збільшення чутливості до холінергічного та цАМФ–РКА шляху активації секретії інсуліну [35]. Крім цього, виявлено, що пероральне введення таурину мишам та щурам приводить до експресії генів, що відповідають за секрецію інсуліну у відповідь на збільшення концентрації глюкози [130]. За підвищення секретії інсуліну глюкоза з крові адсорбується тканинами організму і активується гліколіз [118].

Незважаючи на це припущення, дослідження впливу перорального введення таурину на ензими гліколізу не виявили ніяких змін у активності гексокінази, фосфоглюкокінази та гліцеральдегід-3-фосфатдегідрогенази нирок [118] та у печінці [103]. При цьому, незначно зростав вміст глікогену у печінці. Тому, можна припустити, що за впливу таурину, зниження рівня глюкози у крові пов'язано з утворенням глікогену, а не з інтенсифікацією катаболізму [103].

1.2.3. Регуляція окисного метаболізму таурином

Таурин – постійний компонент мітохондріального матриксу, де його концентрації досягають мілімолярних значень [72]. Дослідження з інкубацією мітохондрій нейронів у середовищі з таурином виявили поглинання цієї сполуки органелами, хоча мітохондріальний транспортер не виявлений [148]. Подальші дослідження показали, що сполука виконує роль буферної речовини, і умови створені таурином є ідеальними для проходження реакцій циклу Кребса [72]. Зі збільшенням концентрації таурину росте кальцієва ємність мітохондрій [81], а значить активність Ca^{2+} -залежних ензимів зростає [161], тому таурин можна вважати активатором окисного метаболізму [72].

Також відомо, що зростання вмісту таурину у середовищі інкубування мітохондрій спричинює зростання ресинтезу АТФ та збільшення міжмембранного потенціалу мітохондрій [148]. Нокаут гена клітинного транспортера таурину приводив до мітохондріальних захворювань у мишей [47]. Пізніше виявлено, що таурин в мітохондріях є ще і у зв'язаному стані [72], що викликало здивування, оскільки ця сполука не входить до складу жодного протеїну [132]. Подальше вивчення ролі таурину у функціонуванні мітохондрій виявили, що він входить до складу мітохондріальних транспортних РНК, які беруть участь у синтезі першого комплексу дихального ланцюга [148]. Оскільки з зниженням концентрації таурину знижується і активність і вміст першого комплексу дихального ланцюга [148].

Активація дихального ланцюга мітохондрій не тільки спричиняє інтенсифікацію синтезу АТФ, однак і приводить до зростання концентрації активних форм кисню [104]. Таурин – речовина, що має як прямий, так і непрямий вплив на антиоксидантний захист. Прямий вплив пов'язаний з фагоцитозом під час якого таурин сполучається з гіпохлоридною кислотою, що є сильним прооксидантом, утворюючи тауринхлорамін – сполуку, яка є нешкідливою для клітини [76]. Непрямий вплив пов'язаний з забезпеченням активності ензиматич-

ної ланки і сталої концентрації глутатіону [61]. За нокауту гену тауринового транспортеру у мишах, кількість таурину знижується в десять раз, а з цим і активність усієї ланки антиоксидантного захисту [162]. Крім цього, за перорального введення таурину зростає активність ензимів антиоксидантного захисту та вміст відновленого глутатіону у тканинах щурів [76]. Також, виявлено, що за інкубації спермій з таурином збільшується тривалість їх життя, зростає активність каталази та супероксиддисмутази [91].

Таурин вважається речовиною здатною відновлювати організм після введення токсинів завдяки здатності збільшувати активність ензиматичної ланки антиоксидантного захисту [63]. Так, за додавання етилового спирту у питну воду щурам, таурин, на фоні етилового спирту, проявляє антиоксидантні властивості, а також відновлює/чи запобігає зниженню рівнів відновленого глутатіону, вітамінів Е та С у мозку, печінці, селезінці та плазмі крові [68]. Крім того, за додавання таурину та етилового спирту спостерігалось підвищення активності ензимів антиоксидантного захисту, порівняно з групою тварин яким додавали у воду тільки етиловий спирт [120]. Пероральне введення таурину щурам сприяло відновленню активності ензимів антиоксидантного захисту після отруєння арсеном [52], залізом [111], кадмієм [98]. При цьому, таурин пришвидшував виведення та утилізацію ксенобіотиків [112, 113].

За діабету першого та другого типів активність ензимів антиоксидантного захисту знижується і виникає оксидативний стрес [133]. Пероральне введення таурину, або додавання його у питну воду щурам та мишам знижує концентрацію активних форм кисню, підвищує активність ензиматичної ланки антиоксидантного захисту і вміст відновленого глутатіону у печінці та нирках [61].

Незважаючи на свої позитивні властивості, таурин може і негативно впливати на стан антиоксидантної системи. Так, за перорального введення таурину щурам віку 24 місяців протягом 30 діб зростає не тільки активність антиоксидантної системи, але і вміст продуктів пероксидного окиснення ліпідів [116]. У печінці щурів, яких випоювали 3% розчином таурину протягом 30 діб

зростала активність каталази, проте і вміст продуктів перекисного окиснення ліпідів зростав [53]. Це вказує на те, що у цьому випадку таурин перш за все впливає на продукцію активних форм кисню, а підвищення активності ензимів антиоксидантного захисту є вже реакцією організму на стрес [116].

Отже, за низьких концентрацій таурину інтенсивність ресинтезу АТФ та антиоксидантний захист знижуються. Вплив надлишку таурину необхідно досліджувати, оскільки він залежить не тільки від дози, але і від віку тварин.

Підсумок

Із аналізу джерел літератури випливає, що таурин є необхідним складником клітин хребетних тварин, де він наявний у мілімолярних концентраціях. Навищі концентрації таурину наявні у мітохондріях, де таурин бере участь у підтримці ресинтезу АТФ та антиоксидантного захисту. Зниження концентрації таурину у організмі ссавців приводить до виникнення мітохондріальних захворювань, зниження активності ензимів антиоксидантного захисту, зростання процесів перекисного окиснення ліпідів. Збільшення концентрації таурину з одного боку спричинює зростання процесів синтезу АТФ, мітохондріального потенціалу та антиоксидантного захисту, однак, з іншого боку, інтенсифікуються процеси перекисного окиснення ліпідів. Неоднозначні результати досліджень і їх трактування зумовили проведення досліджень з розширення і поглиблення знань про механізми впливу таурину на енергетичне забезпечення клітин, а також встановлення його ролі у фізіологічних процесах як клітин, так і окремих органів має важливе значення для виявлення шляхів і пошуку нових засобів коригування порушень метаболізму в організмі.

РОЗДІЛ 2. МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕНЬ

2.1. Дослідження впливу таурину *in vivo*

2.1.1. Схема досліджень впливу таурину *in vivo*

Дослідження з теми дисертаційної роботи проводили впродовж 2012–2015 років на кафедрі фізіології людини і тварин, біологічного факультету Львівського національного університету імені Івана Франка.

Досліджували вплив таурину *in vivo* на білих лінійних щурах (*Rattus norvegicus* var. *alba* лінії Wistar) за наступною схемою (рис. 2.1.):

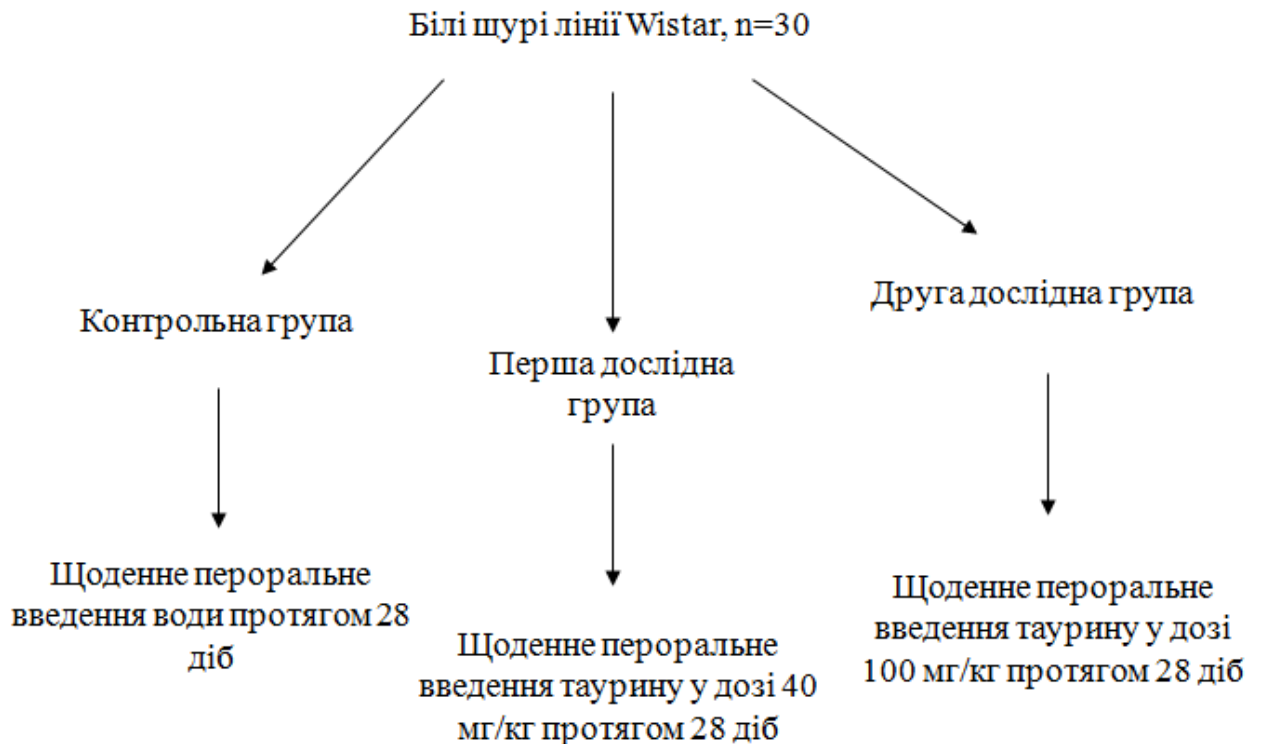


Рис. 2.1. Схема дослідження впливу тривалого перорального введення таурину на показники тканин щурів

Для досягнення мети щурів (віком 4,5 місяців та масою 190–220 г) розділяли на три групи – контрольну та дві дослідні, яким протягом 28 днів щоденно вводили у стравохід питну воду (контроль), розчин таурину в розрахунку 40 (I дослідна група) та 100 (II дослідна група) мг/кг маси тіла. Дози вибрані через їх позитивний вплив на організм тварин за дії стресу та ксенобіотиків [18, 19, 111, 115, 141]. Протягом всього періоду введення таурину у тварин визначали:

- поведінкову активність методом відкритого поля (бали), щодоби за годину до введення та годину після введення таурину;
- масу тіла, зважуванням (г), раз на п'ять днів.

На 29 добу експерименту щурів декапітували під легким хлороформним наркозом та виділяли мозок, печінку, сім'яники, стегнові м'язи та цільну кров. Органи зважували та гомогенізували за допомогою гомогенізатора Поттера-Евельгейма за температури 4°C у співвідношенні 1 г тканини на 5 мл розчину. Для гомогенізації мозку та сім'яників використовували розчин сахарози (250 ммоль/л) [114], для м'язів – розчин KCl (250 ммоль/л) [136], для печінки розчин такого складу: сахароза – 250 ммоль/л, EGTA – 1 ммоль/л, HEPES – 10 ммоль/л; pH 7,2 [9]. Гомогенати центрифугували протягом 15 хв за 2000 g. Для визначення активності ензимів, після забору кров центрифугували за 1000 g. У тканинах визначали:

- фізіологічні показники у крові: концентрацію глюкози, кількість еритроцитів, вміст гемоглобіну, вміст гемоглобіну в одному еритроциті;
- у тканинах: інтенсивність споживання кисню мітохондріями, активність аланін амінотрансферази, аспартатамінотрансферази, глюкозо-6-фосфатдегідрогенази;
- активність лактатдегідрогенази і ензимів антиоксидантного захисту та їх ізозимів.

2.1.1. Дослідження фізіологічних показників щурів

2.1.1.1. Дослідження поведінкової активності щурів

Поведінкову активність щурів визначали щодоби за годину до та годину після введення таурину методом відкритого поля. Для цього щурів поміщали на поверхню розміром метр на метр, що була поділена на двадцять п'ять квадратів. Між квадратами просвердлено дев'ять нірок діаметром 5 см. Згідно методики піддослідну тварину ставили на середину відкритого поля і протягом хвилини знаходився там. Фіксували кількість пройдених квадратів, заглядань у дірку, актів дефекації, сечовипускання та грумінгу. Показники додавались у загальну поведінкову активність, що визначається у балах [139].

2.1.1.2. Дослідження кількості еритроцитів

Після декапітації тварин кров відбирали у пробірку не великою кількістю гепарину. Кількість еритроцитів у крові здійснювали з використанням камери Горяєва. У суху чисту пробірку вносили 3,98 мл 0,85 % розчину NaCl та 0,02 мл крові. Скельце притирали до камери так, щоб з'явилися райдужні кільця. Скляною паличкою з пробірки брали 1–2 краплі розведеної крові і заповнювали ними камеру. Еритроцити підраховували через 1 хв після заповнення камери при малому збільшенні мікроскопа (об'єктив – 8х, окуляр – 15х) з прикритою діафрагмою або опущеним конденсором (у затемненому полі зору). Підрахунок вели у п'яти великих квадратах, розташованих по діагоналі.

Кількість еритроцитів у 1 мкл крові визначали за формулою:

$$X = \frac{a \times 4000 \times 200}{80},$$

де X – кількість еритроцитів у 1 мкл крові, a – кількість еритроцитів у 80 малих квадратах; 80 – кількість малих квадратів; 200 – ступінь розведення крові; 4000

– коефіцієнт, що приводить результат до об'єму 1 мкл крові, оскільки об'єм малого квадрата складає: 1/4000 мкл [12].

2.1.1.3. Дослідження вмісту гемоглобіну

Вміст гемоглобіну визначали геміглобінціанідним методом [Влізло В. В., 2008]. У пробірку наливали 5 мл трансформуючого розчину (NaHCO_3 – 1 г, $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$ – 0,2 г, KCN – 0,05 г, H_2O – 1 л) і додавали 20 мкл крові. Розчин перемішували та залишали за кімнатної температури на 30 хв. Оптичну густину отриманого розчину геміглобінціаніду визначали на спектрофотометрі за довжини хвилі поглинання 540 нм проти трансформуючого розчину.

Обчислення концентрації гемоглобіну проводять за формулою:

$$X = \frac{E_{540} \times 64,458 \times 250}{44},$$

де X – кількість гемоглобіну (г/л), E_{540} – оптична густина досліджуваного зразка, 64,458 – мілімолярна маса гемоглобіну в грамах, 250 – розведення крові, 44 – мілімолярний коефіцієнт екстинкції геміглобінціаніду, тобто екстинкції для розчину його з концентрацією 1 ммоль/л за довжини хвилі 540 нм [2].

2.1.1.4. Дослідження концентрації глюкози

Дослідження вмісту глюкози у крові здійснювали глюкозооксидазним методом. Для цього 0,02 мл плазми крові додавали у пробірки, що містили 4,5 мл пероксидазного буфера (5 мг пероксидази, 5 мл 1 % розчину о-діанізидину 0,59 мл 0,1 н NaOH , 125 мл 0,1 М KH_2PO_4 до 500 мл H_2O) і 0,5 мл глюкозооксидазного реактиву (250 мг глюкозооксидази, 25 мл H_2O). Пробірки поміщали на 30 хв у термостатовану водяну баню за температури 37 °С і після охолодження проб додавали 1,5 мл 50 % сірчаної кислоти. Інтенсивність забарвлення визна-

чали спектрофотометрично за довжини хвилі поглинання 530 нм [8]. Кількість глюкози в моль/л визначають за формулою:

$$X = E \times 320,$$

де E – адсорбція досліджуваної проби, 320 – коефіцієнт перерахунку.

2.1.1.5. Визначення інтенсивності споживання кисню мітохондріями та сперміями

Мітохондрії – двомембранні органели функцією яких є ресинтез АТФ, який може одночасно відбуватись з перенесенням електронів у дихальному ланцюгу до кінцевого акцептора електронів – молекулярного кисню. Для цього процесу мітохондріям необхідно поглинати кисень. Визначення швидкості поглинання кисню мітохондріями є одним із показників, що вказує на швидкість метаболізму у організмі та здатність ресинтезувати АТФ.

Метод ґрунтується на здатності сперміїв та мітохондрій поглинати кисень, що характеризується зміною окисно-відновного потенціалу і, відповідно, напруги на електродах, яка реєструється полярографом та інформація передається на комп'ютер, де записується вигляді файлу з розширенням xls.

Мітохондрії виділяли за допомогою диференціального центрифугування приготованих гомогенатів. Перший етап – центрифугування при 1000 g, супернатант відбирали і центрифугували при 9000 g – другий етап. Після цього супернатант відбирали, а осад ресуспендували у середовищі, яке використовували для реєстрації дихання (сахароза – 250 ммоль/л, трис-НСl – 25 ммоль/л, KH_2PO_4 – 10 ммоль/л; рН 7,4 [55]) у відношенні 1 г вихідної тканини до 0,1 мл розчину.

Дихальну активність сперми та мітохондрій тканин щурів вивчали полярографічно (нмоль $\text{O}_2/\text{хв} \times 0,1$ мл сперми; С) з використанням електрода Кларка, який вмонтований у термостатовану комірку (температура 38,5°C для сперміїв та 25°C для мітохондрій тканин щурів). Інтенсивність дихання реєстрували з використанням електронного потенціометра і комп'ютера. У комірку об'ємом

1,0 мл вносили 0,1 мл суспензії мітохондрій та 0,9 мл середовища для реєстрації дихання і визначали за ендogenous дихання (відсутності екзогенних субстратів; V_1 ; стан S_1 за Чансом; [40]), швидкість дихання за додавання субстратів окиснення – α -кетоглутарату у концентрації 5 ммоль/л чи сукцинату у концентрації 1 ммоль/л (V_4^S ; стан S_4^S за Чансом), а також інтенсивність дихання за додавання на фоні екзогенних субстратів АДФ (200 мкмоль/л; V_3 ; стан S_3 за Чансом) та після вичерпання АДФ (; стан за Чансом). На основі отриманих даних розраховували дихальні контролі (ДК) за Ларді (V_3/V_4^S) та Чансом ($V_3/$), АДФ/О (кількість внесеного АДФ (ммоль/л) поділеного на кількість кисню спожитого під час V_3), ефективність фосфорилування (V_E ; добуток V_3 та АДФ/О), та час фосфорилування t_ϕ [9].

Для дослідження впливу таурину на інтенсивність дихання сперми використовували фізіологічні концентрації сполуки (175; 350; 525; 700 мкмоль/л [76]). Дослідження інтенсивності дихання сперми проводили у середовищах розрідження додаючи 0,1 мл сперми до 0,9 мл розріджувача [14].

2.1.2. Визначення показників антиоксидантного захисту тканин щурів

2.1.2.1. Визначення загальної активності супероксиддисмутази та розрахованої активності її ізозимів

Супероксиддисмутаза (СОД) – ензим, що здійснює дисмутацію супероксиданіон радикалів і підтримує їх вміст на оптимальному рівні, забезпечуючи, таким чином, гомеостаз у клітині та в цілому організмі. Поряд з загальною активністю СОД, важливе значення має активність окремих ізозимів.

Активність СОД визначали за кількістю нітроформазану, що утворюється в реакції між феназинметасульфатом та НАДН. Готували проби: до 0,05 мл го-

могенату тканин додавали 0,825 мл розчину (0,45 мл дистильованої води, 0,25 мл етилового спирту, 0,125 мл хлороформу, 100 мг KH_2PO_4), перемішували та центрифугували 30 хв за 5000 g. Активність СОД визначали у супернатанті за температури 25 °С. До 1,5 мл інкубаційної суміші (12,4 мг ЕДТА- Na_2 , 110 мг нітротетразолію синього, 18,4 мг феназинметасульфату в 100 мл 0,15 М Na/К фосфатного буферу (рН 7,8) додавали 0,1 мл супернатанту та 0,04 мл 0,05 мМ розчину НАДН (3,1 мг НАДН розчиняли в 100 мл 1 мМ трис-ЕДТА буферу; рН 8,0). У контрольну пробу додавали 0,1 мл дистильованої води. Через 10 хв після додавання всіх реагентів вимірювали адсорбцію контрольної та дослідної проб за довжини хвилі 540 нм на спектрофотометрі СФ-46 проти дистильованої води в кюветі з довжиною оптичного шляху 1 см [6, 16].

Адсорбція контрольної проби становила в середньому $\sim 0,680$. Відсоток гальмування реакції утворення нітроформазау розраховували за формулою:

де A – активність СОД (МО/мг протеїну), c – вміст протеїну в пробі, K_E – адсорбція контрольної проби, D_E – адсорбція дослідної проби.

Активність СОД визначали за допомогою калібрувальної кривої для чого використовували її стандартний розчин СОД та виражали в МО/мг протеїну.

Ізозими СОД виявляли після електрофорезу в 10 % поліакриламідному гелі для чого супернатант розбавляли трис-гліциновим буфером (рН 8,5) у співвідношенні 1:4 та додавали 0,05 мл 40 % сахарози. У лунки концентруючого гелю вносили 0,015 мл проби (концентрація протеїну 50–100 мкг). Проводили електрофорез. Фарбування пластин гелю для виявлення ізоформ СОД здійснювали методом Veauchamp С. та Fridovich I. [30] після електрофорезу пластини ПААГ інкубували в розчині 1,23 ммоль/л нітротетразолію синього в 0,15 М Na/К фосфатному буфері (рН 7,8) в темноті при кімнатній температурі. Через 15 хв ПААГ тричі промивали дистильованою водою і заливали інкубаційним середовищем: 28 ммоль/л тетраметилетилендіаміну і 0,028 ммоль/л рибофлаві-

ну в 0,15 моль/л Na/K фосфатному буфері (рН 7,8). Через 20 хв інкубування в темноті пластини гелю промивали дистильованою водою і опромінювали 7 хв світлом для генерації $O_2^{\cdot-}$ рибофлавіном. Пластини поліакріламідного гелю темно-фіолетового забарвлення, окрім зон з ізоформами СОД, які залишалися прозорими унаслідок перетворення $O_2^{\cdot-}$ [30]. Гелі сканувались і за допомогою програмного забезпечення TotalLab визначався відсотковий вміст ізозимів. Після цього активність кожного з виявлених ізозимів (a_n) розраховували за формулою:

$$a_n = \frac{A \times [COДn]}{100 \%};$$

де A – загальна активність супероксиддисмутази (МО/мг протеїну), $[COДn]$ – вміст відповідного ізозиму (%).

2.1.2.2. Визначення активності каталази та розрахованої активності її ізоформ

Каталаза – ензим, що відновлює гідроген пероксид до води та кисню. Для клітин концентрація H_2O_2 має важливе значення, оскільки він може запускати каскад реакцій вільнорадикального окиснення поліненасичених жирних кислот ліпідів, через що можуть ушкоджуватись мембрани, порушуватись функціонування та наступати некроз (література про АОЗ).

Активність каталази визначали методом Корольок М.А. та ін. [11]. До 2,0 мл 0,03 % розчину H_2O_2 додавали 0,1 мл зразку та інкубували 10 хв при 25 °С. Після чого додавали 1,0 мл 4 % розчину молібдату амонію в 0,01 н H_2SO_4 та зупиняли реакцію 1,0 мл 0,1 н розчину H_2SO_4 . У контрольну пробу розчин молібдату амонію додавали перед, а в зразок – після інкубування. Після центрифугування (5 хв за 4000 g) в супернатанті вимірювали інтенсивність зафарбування СФ-46 проти дистильованої води у кюветі з величиною оптичного шляху 1 см і довжині хвилі 410 нм [11]. З урахуванням розведення біологічного

матеріалу і коефіцієнту мілімолярної абсорбції комплексу гідроген пероксиду з молібдатом амонію за 410 нм. Розраховували активність ензиму в мкмоль використаного в реакції субстрату (H_2O_2) за формулою:

де A – активність каталази (мкмоль $\text{H}_2\text{O}_2/\text{хв} \times \text{мг}$ протеїну) E – адсорбція досліджуваного зразку, V_1 – об'єм суміші в кюветі, мл, V_2 – об'єм зразка, мл, 110,6 – коефіцієнт абсорбції комплексу молібдату амонію з гідроген пероксидом за довжини хвилі 410 нм, c – концентрація протеїну, мг/мл, t – час інкубації, хв.

Для виявлення ізозимів каталази проводили електрофорез у 7,5 % поліакриламідному гелі: гомогенати тканин розбавляли тріс-гліциновим буфером у співвідношенні 1:4 та додавали 0,05 мл 40% сахарози. У лунки концентруючого гелю вносили 0,015 мл проби (кінцева концентрація протеїну 75-100 мкг). Фарбування пластин гелю для виявлення протеїнів каталази здійснювали за методом Wodbury W [164]. Після електрофорезу у поліакриламідному гелі витримували 45 хв в дистильованій воді, насичували 10 хв 0,003 % розчином гідроген пероксиду, тричі промивали водою та інкубували за кімнатної температури в темноті 15 хв у середовищі, що містило 1 % розчин ферріціаніду (III) калію та феруму хлориду. Після фарбування поліакриламідного гелю місця локалізації протеїнів каталази проявляються яскраво-жовтими смугами на фоні синьо-зеленого кольору. Гелі сканувались і за допомогою програмного забезпечення TotalLab визначався відсотковий вміст ізозимів. Після цього активність кожного з виявлених ізозимів (a_n) розраховували за формулою:

$$a_n = \frac{A \times [\text{КАТ}n]}{100 \%},$$

де A – загальна активність каталази (мкмоль $\text{H}_2\text{O}_2 /(\text{хв} \times \text{мг}$ протеїну), $[\text{КАТ}n]$ – вміст відповідного ізозиму (%).

2.1.2.3. Визначення активності глутатіонпероксидази

Глутатіонпероксидаза регулює рівень екзогенного й ендогенного гідроген пероксиду, та гідроксильного аніону, контролює ліпопероксидацію мембранних структур клітин та може окислювати SH-групи протеїнів.

Активність ензиму визначали з використанням реактиву Елмана. До 0,83 мл інкубаційної суміші (4,8 ммоль/л глутатіону відновленого, 6 ммоль/л Na_2EDTA та 12 ммоль/л натрію азиду у 0,1 моль/л тріс- HCl буфері, яку готували безпосередньо перед визначенням) додавали 0,1 мл супернатанту та інкубували 10 хв за 37 °C; додавали 0,07 мл 20 ммоль/л розчину гідропероксиду третинного бутилу та продовжували інкубувати ще 5 хв. Реакцію зупиняли 0,2 мл розчином трихлороцтової кислоти (200 г/л). Центрифугували протягом 5 хв за 4000 g. До 5 мл 0,1 М тріс- HCl буферу (pH 8,5) додавали 0,05 мл супернатанту та 0,05 мл реактиву Елмана (0,01 М розчин ДТНБК у метанолі). Через 5 хв проби визначали адсорбцію за довжини хвилі 412 нм на СФ-46 проти дистильованої води в кюветі з довжиною оптичного шляху 1 см. У контрольну пробу зразок вносили перед осадженням протеїнів. Абсорбція контрольної проби становить $\sim 0,400$ [13]. З урахуванням розведення біологічного матеріалу в пробі і коефіцієнту мікромолярної абсорбції тіонитрофенільного аніону за довжини хвилі 412 нм (11,4 cm^2/mM) розраховували активність ензиму в мікромоль використаного в реакції субстрату глутатіону відновленого за формулою:

де A – активність глутатіонпероксидази (мкмоль GSH/хв×мг протеїну), ΔA – різниця абсорбцій контрольної і дослідної проб, V_1 – сума об'ємів супернатанту та тріс- HCl буферу та реактиву Елмана, мл, V_2 – об'єм зразка, мл, V_3 – сума об'ємів зразка, інкубаційної суміші розчину гідропероксиду третинного бутилу розчину три хлороцтової кислоти, мл, V_4 – об'єм супернатанту, мл, 11400 – коефіцієнт адсорбції тіонитрофенільного аніону за довжини хвилі 412 нм, c – концентрація протеїну, г/мл, t – час інкубації з реактивом Елмана, хв.

2.1.2.4. Визначення вмісту ТБК-активних продуктів

ТБК-активні продукти – кінцеві продукти пероксидного окиснення ліпідів. Вони здатний утворювати полімерні молекули з білками і фосфоліпідами, що призводить до зниження проникності мембран, активності мембранних ферментів і швидкості обміну фосфоліпідів.

В основі методу лежить реакція між малоновим диальдегідом і тіобарбітуровою кислотою, яка при високій температурі та кислому середовищі протікає з утворенням триметинового комплексу, що містить одну молекулу МДА та дві молекули ТБК.

До 0,1 мл гомогенату додають 1 мл 20 % фосфорновольфрамової кислоти, пробірки закривають корками, перемішують і залишають стояти на холоді 15 хв. Центрифугують при $t +4\text{ }^{\circ}\text{C}$ протягом 15 хв при 2500 об/хв. Надосадову рідину зливають, а до осаду додають 2 мл H_2O і 1 мл 0,8 % розчин тіобарбітурової кислоти. Перемішують, закривають корками та інкубують одну годину на водяній бані при $100\text{ }^{\circ}\text{C}$. Охолоджують в холодній воді. Відцентрифугують 10 хв при 6000 об/хв.

У центрифугаті вимірюють оптичну густину на спектрофотометрі при довжині хвилі 535 і 580 нм, щоб виключити поглинання зафарбованих комплексів ТБК-речовинами неліпідної природи [10].

Вміст ТБК-активних продуктів (С), виражену в нмоль/мг протеїну, розраховують за формулою:

$$C = \frac{0,21 \times 26,5 \times \Delta D}{\text{Вміст протеїну}}$$

де С – концентрація ТБК-активних продуктів, ΔD — показник $D_{535}-D_{580}$.

Після визначення вмісту ТБК-активних продуктів та активностей ензимів антиоксидантного захисту визначали коефіцієнти СОД/КАТ (відношення активностей супероксиддисмутази та каталази); ГПО/КАТ (відношення активностей глутатіонпероксидази та каталази); АОЗ/ТБК:

де $A_{СОД}$ – активність супероксиддисмутази (МО/мг протеїну); $A_{КАТ}$ – активність каталази (мкмоль H_2O_2 / (хв × мг протеїну); $A_{ГПО}$ – активність глутатіонпероксидази (мкмоль GSH/хв×мг протеїну), $C_{ТБК}$ – вміст ТБК-активних продуктів (нмоль/мг протеїну).

2.1.2.5. Визначення активності глюкозо-6-фосфатдегідрогенази

Реакція утворення НАДФН⁺ практично незворотна, тому активність ензиму визначається за швидкістю відновлення НАДФ⁺. У кювету вносили розчини: 0,05 моль/л трис-НС1 буфер (рН 7,5) – 2,55 мл; 0,1 ммоль/л MgSO₄ – 0,2 мл; 0,005 моль/л НАДФ⁺ – 0,2 мл та 0,1 моль/л глюкозо-6-фосфату 0,1 мл. Додавали 0,1 мл супернатанту тканин. Після цього фіксували через кожні 30 с протягом 3 хв показники спектрофотометра СФ-46 у кюветі з величиною оптичного шляху 1 см за довжини хвилі поглинання 340 нм [63].

Розрахунок проводять за формулою:

де A – активність глюкозо-6-фосфатдегідрогенази, ΔE – зміна оптичної густини за 1 хв, V – об'єм інкубаційної суміші в кюветі, c – вміст протеїну в кюветі в інкубаційній суміші, 6,22 – коефіцієнт адсорбції нікотинамідних коензимів.

2.1.3. Визначення загальної активності лактатдегідрогенази та розрахованої активності її ізозимів

Лактатдегідрогеназа – ензим, що забезпечує перетворення лактату у піруват чи зворотну реакцію. Пряма реакція відбувається за високих концентрацій лактату, зворотна – за умов нестачі кисню у клітині.

Активність лактатдегідрогенази визначали за швидкістю окислення НАДН [140]. До 1,5 мл 62,5 мМ Трис-НС1 буферу (рН 7,4), що містить 1,5

моль/л пірувату і 6,25 моль/л Na₂ЕДТА, додавали 20 мкл зразка, а в контрольну кювету дистильованої води. Після преінкубування 3 хв при 37°C, в дослідну кювету додавали 375 мкл 0,2 моль/л НАДН і вимірювали абсорбцію протягом 5 хв. З урахуванням розведення біологічного матеріалу в пробі і коефіцієнту адсорбції НАДН при 340 нм розраховували активність ензиму в мікромоль використаного в реакції НАДН за формулою:

де A – активність лактатдегідрогенази, ΔA – зміна абсорбцій за хв., 6,22 – коефіцієнт адсорбції НАДН за довжини хвилі поглинання 340 нм, V_1 – об'єм інкубаційної суміші в кюветі, мл, c – концентрація протеїну в V_1 , мг/мл, V_2 – об'єм зразка, мл.

Для виявлення вмісту ізозимів ЛДГ проводили електрофорез у 7,5 % поліакриламідному гелі: гомогенат розбавляли тріс-гліциновим буфером (рН 8,5) у співвідношенні 1:1 і додавали 0,05 мл 40 % сахарози. У лунки концентруючого гелю вносили 0,015 мл проби (концентрація протеїну \approx 100 мкг). Після електрофорезу фарбували поліакриламідний гель за Garbus J. [65]: інкубували 60 хв в темноті за температури 37°C в інкубаційному середовищі: 0,2 моль/л лактату, 0,5 мг/мл НАД⁺ та 0,5 мг/мл НСТ в 0,1 моль/л тріс-НСІ буфері (рН 8,5). У місцях локалізації ензиму гель набуває фіолетового забарвлення. Як маркер ізоензимного складу використані гемолізати еритроцитів крові щурів. Гелі сканувались і за допомогою програмного забезпечення TotalLab визначався відсотковий вміст ізозимів. Після цього активність кожного з виявлених ізозимів (a_n) розраховували за формулою:

$$a_n = \frac{A \times [\text{ЛДГ}_n]}{100 \%},$$

де A – загальна активність лактатдегідрогенази (мкмоль НАДН / (хв×мг протеїну), $[\text{ЛДГ}_n]$ – вміст відповідного ізоenzimu (%).

2.1.4. Визначення активності аланін- та аспаратамінотрансфераз

Активність цитоплазматичних аспаратамінотрансферази (АСТ) та аланінамінотрансферази визначали, у супернатанті після центрифугування за швидкості 9000g, за допомогою динітрофенілгідразину. В пробірку вносили 0,25 мл субстратного розчину АСТ (0,2 М D,L-аспартат, 2 мМ 2-оксоглутарат в 0,1 М фосфатному буфері, рН 7,4), або АЛТ (0,2 М L-аланін, 2 мМ 2-оксоглутарат в 0,1 М фосфатному буфері, рН 7,4) преінкубували при 37°C протягом 3 хв, додавали 0,05 мл досліджуваного зразка та знову інкубували при 37°C 60 хв. Після чого додавали 1 мМ розчину 2,4-динітрофенілгідрозину в 1 М НСІ і через 20 хв – 2,5 мл 0,4 М розчину NaOH, перемішували і залишали для розвитку забарвлення на 10 хв при кімнатній температурі. Оптичну густину вимірювали спектрофотометром СФ-46 при довжині хвилі $\lambda = 560$ нм у кюветі з довжиною оптичного шляху 1 см. Контроль готували аналогічно досліджуваному, тільки замість сироватки додавали 0,05 мл фізіологічного розчину. Розрахунок активності ензимів у сироватці крові проводили за калібрувальним графіком та виражали в мкмоль /хв ×мг протеїну [122]. Після визначення активностей ензимів у плазмі крові вираховували коефіцієнт де Рітца (відношення активностей та аспаратамінотрансферази та аланін амінотрансферази; АСТ/АЛТ).

2.2. Дослідження впливу таурину *in vitro*

Для дослідження впливу таурину на фізіологічні показники клітин *in vitro* використовували тест-культуру – спермії. Схема досліджень наведена на рис 2.2. Дослідження впливу таурину на окисний метаболізм тест-культури проводили за наступною схемою:

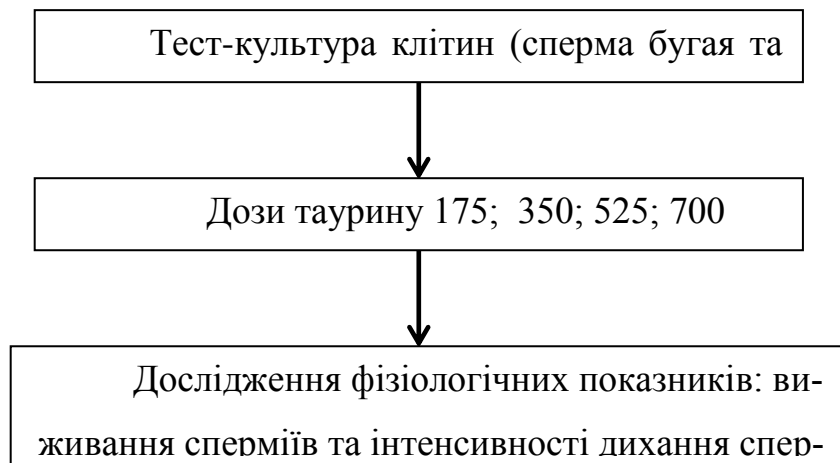


Рис. 2.2. Схема оцінювання дії таурину на тест-культурі клітин

У зв'язку з поставленою метою досліджували свіжоотримані еякуляти бугаїв ($n = 10$). Сперму бугаїв отримували на штучну вагіну з режимом використання плідників дуплетна садка два рази на тиждень, через дві – три доби; кнурів – мануальним методом, з режимом використання одна садка два рази на тиждень. Еякуляти кнурів та бугаїв розбавляли: фосфатно-сольовим буфером (ФСБ; NaCl – 0,8г, KCl – 0,02г, Na₂HPO₄ – 0,11г, KH₂PO₄ – 0,02г, MgCl₂ – 0,01г, H₂O до 100 мл [15]). Крім цього, сперму бугаїв розріджували та середовищами: лактозо-жовтково-гліцериновим розріджувачем (ЛЖГР: лактоза – 11,5 г, жовток курячих яєць – 20 мл, гліцерин – 5,0 мл, вода – 100 мл [15]); Андромедом (фруктоза, гліцерин, цитратна кислота, фосфоліпиди, трис-буфер). У розбавлених еякулятах визначали:

- виживання спермій у свіжоотриманій спермі при температурі 2–4°C до припинення прямолінійного поступального руху (год);
- інтенсивність споживання кисню (нмоль O₂/хв×0,1 мл сперми).

2.3 Статистично-математичне опрацювання результатів експериментів

Математично-статистичну обробку даних отриманих підчас досліджень здійснювали з використанням пакету програм *Microsoft Excel*.

Визначали середнє арифметичне значення (M), середнє квадратичне відхилення (σ) та стандартну похибку середнього арифметичного (m). Вірогідність різниці між статистичними групами визначали з Стьюдентом, за статистично достовірні приймали зміни з $P \leq 0,05$ [4].

Підсумок

Дослідження виживання тест-культури та інтенсивності дихання дозволяють виявити вплив таурину на окрему клітину, як одиницю живого організму. У той час, як фізіологічні методи використані для встановлення впливу таурину підчас досліджень *in vivo* (визначення маси тіла, окремих органів, поведінкової активності, кількості еритроцитів, вмісту гемоглобіну, концентрації глюкози та інтенсивності дихання мітохондрій) дають можливість виявити реакцію цілісного організму. Застосовані ж біохімічні методи (визначення активності ензиматичної ланки антиоксидантного захисту, лактатдегідрогенази та їх ізозимів, глюкозо-6-фосфатдегідрогенази, аспарат- та аланінамінотрансфераз) виявляють механізми реакцій організму на пероральне введення таурину.

РОЗДІЛ 3. РЕЗУЛЬТАТИ ДОСЛІДЖЕНЬ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

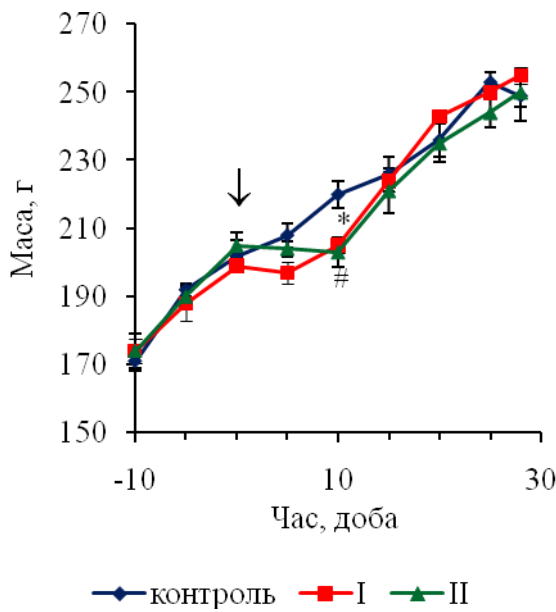
3.1. Вплив таурину на фізіологічні показники тварин

3.1.1. Маса тіла та маса окремих органів щурів за тривалого перорального введення таурину

Таурин – це вільна сульфовмісна амінокислота, що бере участь у багатьох процесах у організмі хребетних тварин. Зокрема у емульгації жирних кислот та виведенні ксенобіотиків [76], підтриманні активності ензимів антиоксидантного захисту [133] та функціонування мітохондрій [72]. Остання функція напряду пов'язана з забезпеченням енергії тваринних клітин, і за нестачі таурину у мітохондріях відбувається зростання процесів ліпопероксидації, зниження ресинтезу АТФ, відповідно тварини втрачають масу, та страждають від міопатій [91]. Саме зміни у масі є першими індикаторами впливу сполуки на метаболізм тварин. Для виявлення впливу таурину на динаміку маси щурів, тварин ділили на дві дослідні групи, яким одноразово вводили водний розчин таурину дозою 40 мг/кг та 100 мг/кг протягом 30 діб і одну контрольну, якій вводили питну воду.

Нашими дослідженнями встановлено, щоза тривалого перорального введення таурину маса тварин I і II дослідних груп є статистично-достовірно меншою від маси контрольних тварин лише на 10 добу після початку експерименту (рис. 3.1 А). А вже починаючи з 15 доби експерименту маса тварин обох дослідних груп не відрізнялась від контролю. Фактично, після нетривалого періоду сповільнення приросту маси тіла у тварин дослідних груп наступав період більш інтенсивних ростових процесів, що вказує на певну адаптацію організму до таурину.

A



B

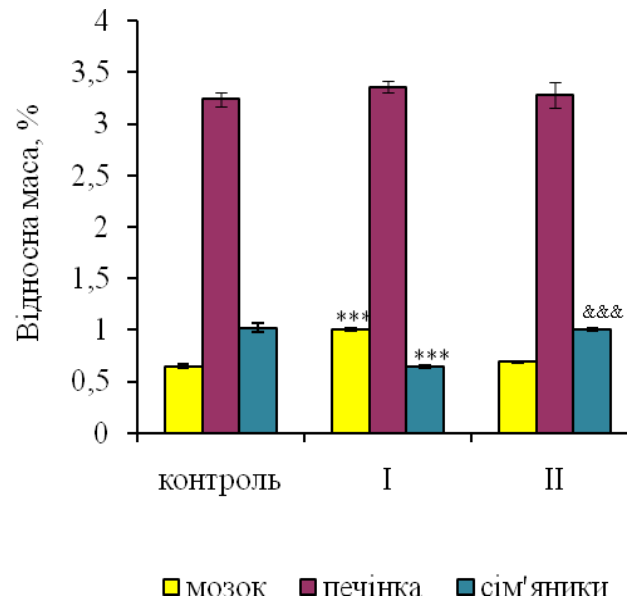


Рис. 3.1. Маса щурів протягом періоду перорального введення таурину дозами 40 (I) та 100 (II) мг/кг (A) та відсоткова маса їхніх внутрішніх органів щурів після експерименту (B): стрілкою позначено початок введення таурину; * – статистично достовірна різниця між показниками тварин I дослідної та контрольної групи, # – II дослідної та контрольної групи, & – I та II дослідних груп (один значок – з $P < 0,05$, три – з $P < 0,001$); $n = 5$

Незважаючи на відсутність відмінностей між масою тіла тварин дослідних та контрольних груп наприкінці експерименту, відносна маса деяких органів суттєво змінилася (рис. 3.1 B). Зокрема, у тварин I дослідної групи зменшилась на 36,9 % відносна маса сім'яників, однак збільшилась на 54,5 % відносна маса мозку. У тварин II дослідної групи відносна маса обстежуваних органів не змінилася.

Відомо, що таурин сприяє зменшенні кількості холестерину в організмі та перебудові ліпідного профілю [76]. Крім цього, випоювання 2 та 5 % розчином таурину здатне знижувати концентрацію глюкози у крові, збільшуючи секрецію

інсуліну, як у щурів так і у мишей [130, 103]. Проте маса піддослідних тварин не відрізнялась від контролю, тому варто припустити, що її зниження у обох дослідних групах тварин було викликане не адаптованістю організму до великих доз таурину.

Відомо, що зростання вмісту тварину у мозку щурів спричиняє збільшення концентрації відновленого глутатіону [61]. Одним з ензимів, який продукує НАДФН для відновлення глутатіону, є глюкозо-6-фосфатдегідрогеназа. Цей ж ензим задіяний у синтезі рибози та більшості пентоз [129]. Варто припустити, що зростання його активності спричиняє і збільшення синтетичних процесів у мозку, і його маса зростає.

Дослідження тривалого перорального введення таурину щурам дозою 150 мг/кг показало, що ніяких змін у масі сім'яників не відбувалось [52]. Однак наші дослідження зареєстрували зниження відносної маси сім'яників у тварин I дослідної групи за збереження сталої, порівняно з контролем маси тіла. Це означає, що у цій тканині можуть відбуватись дегенеративні процеси, і що таурин в дозі 40 мг/кг негативно впливає на енергетичні процеси у сім'яниках.

Отже, зниження маси тіла тварин обох дослідних груп на 5–10 добу експерименту могло бути спричинено пристосуванням організму тварин до надлишкової кількості таурину. Зменшення маси сім'яників у тварин I дослідної групи можливо свідчить про деструктивні процеси що відбуваються у цих органах. Натомість зростання відносної маси мозку вказує на збільшення синтетичних процесів у тканині, для якого необхідно більше поживних речовин у вигляді глюкози. А отже її концентрація у крові можливо знижується.

3.1.2. Вплив перорального введення таурину на показники крові щурів

Кров – це тканина, головна функція якої є транспорт, поживних речовин та кисню до інших тканин організму, а продуктів розпаду і вуглекислого газу

від них. Найчисельнішими форменими елементами крові функція яких є транспорт кисню є еритроцити [76]. Крім цього зміни у їх кількості та вмісту гемоглобіну й активність лактатдегідрогенази у них можуть служити маркерами функціональності організму та вказувати на можливі механізми впливу таурину на енергетичне забезпечення. Крім цього, вміст глюкози може вказувати на рівновагу між ката- та анаболізмом, а активність аспартат- та аланін-амінотрансфераз – на функціональний стан печінки та серця [2].

Нашими дослідженнями виявлено, що у тварин I дослідної групи спостерігається тенденція до зниження концентрації глюкози в крові (табл. 3.1), але ця зміна за такої вибірки не досягла першого рівня достовірності ($P = 0,08$).

Таблиця 3.1

Вплив перорального введення таурину на показники крові щурів ($n = 4-5$; $M \pm m$)

Показник	Група тварин		
	Контроль	I (40 мг/кг)	II (100 мг/кг)
Вміст глюкози у крові, ммоль/л	9,42±0,47	7,92±0,60	9,89±0,62
Кількість еритроцитів, $10^{12}/л$	5,20±0,43	7,95±0,28**	5,76±0,42 ^{&&}
Вміст гемоглобіну, г/л	101,41±8,41	93,40±3,28	99,50±8,16
Вміст гемоглобіну в одному еритроциті, пг/еритроцит	19,81±1,91	11,79±0,58*	17,44±1,28 ^{&&}
Активність ЛДГ, мкмоль НАДН/(хв×мг протеїну)	2,46±0,42	3,91±0,44*	3,34±0,45
АСТ, мкмоль /хв ×мг протеїну	0,05±0,008	0,06±0,009	0,08±0,012
АЛТ, мкмоль /хв ×мг протеїну	0,07±0,007	0,06±0,008	0,06±0,015
АСТ/АЛТ, в.о.	0,92±0,14	1,00±0,082	1,66±0,32 [#]

Примітки: I – перша дослідна група тварин (доза таурину – 40 мг/кг), II – друга дослідна група тварин (доза таурину – 100 мг/кг); * – статистично достовірна різниця між показниками тварин контрольної та I дослідної групи, [#] – контрольної та II дослідної групи [&] – I та II дослідних груп (один значок – з $P < 0,05$, два – з $P < 0,01$ три – з $P < 0,001$)

Тенденція до зниження активності глюкози за перорального введення таурину вказує на збільшення її використання. Варто звернути увагу на те, що таурин здатний збільшувати чутливість тканин до глюкози [123] і за таких умов зростає використання глюкози з крові. При цьому збільшується і продукція інсуліну та його утилізація [35], тобто використання глюкози пришвидшується.

У крові тварин I дослідної групи на 52,8 % збільшилась кількість еритроцитів, хоча рівень гемоглобіну не змінився (табл. 3.1). Тому вміст гемоглобіну в одному еритроциті був нижчий на 40,5 % порівняно з контролем. На відміну від цього, кількість еритроцитів, вміст гемоглобіну у крові та вміст гемоглобіну в одному еритроциті у тварин II дослідної групи не відрізнялися від показників контрольних тварин.

Зниження кількості гемоглобіну може бути причиною гіпоксії і для того щоб її компенсувати, зростає інтенсивність еритропоезу [90]. Таурин здатний пришвидшувати виведення металів з організму [111], можливо, його надлишок сприяє відтоку заліза з організму і відповідно, його не вистачає на утворення гемоглобіну.

Оскільки вміст еритроцитів зростав, мала би збільшитись активність і лактатдегідрогенази у крові. У еритроцитах, де єдиним шляхом утворення енергії є гліколіз, цей ензим виконує функцію перетворення лактату, який поступає з інших тканин (у найбільшій кількості з скелетних м'язів), у піруват. І, дійсно, у тварин I дослідної групи активність ЛДГ зростала на 59 % порівняно з контролем. Дослідження вмісту ізозимів методом електрофорезу виявило у всіх тканинах 5 смуг протеїнів, що згідно літературних даних [65], відповідають ізозимам (знизу догори) ЛДГ1, ЛДГ2, ЛДГ3, ЛДГ4, ЛДГ5 (рис. 3.2).

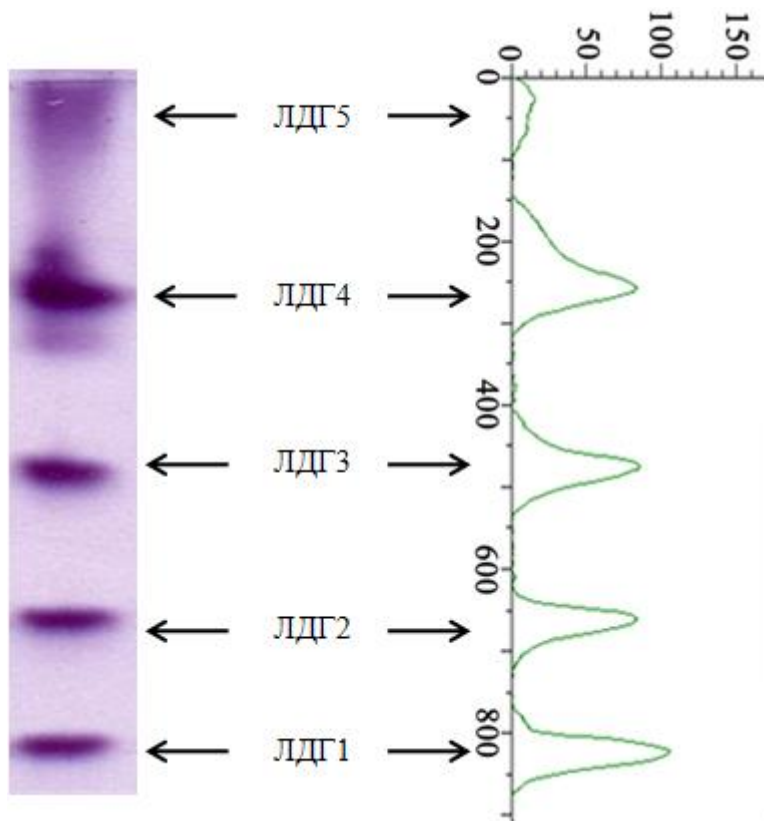


Рис. 3.2. Типова електрофореграма ізозимів лактатдегідрогенази цільної крові

У крові тварин I дослідної групи знижувався рівень ізозимів, що відповідають за перетворення лактату у піруват що, може бути викликано потребою у відновних еквівалентах для підтримання рівня антиоксидантного захисту (рис. 3.3).

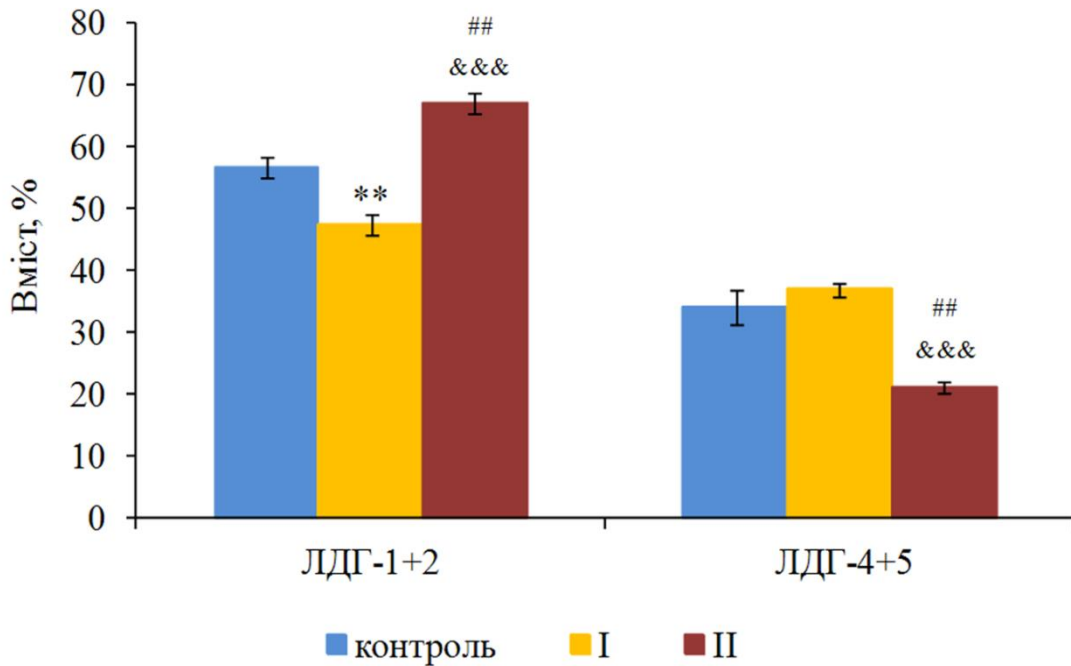


Рис. 3.3. Суми відсоткового вмісту ізоцимів лактатдегідрогенази крові контрольної, I (40 мг/кг) та II (100 мг/кг) дослідних груп, які характеризують ступінь аеробного (ЛДГ1+ЛДГ2) та анаеробного (ЛДГ4+ЛДГ5) метаболізму, n = 4: * – статистично достовірна різниця між показниками тварин контрольної та I дослідної групи, # – контрольної та II дослідної групи & – I та II дослідних груп (один значок – з P < 0,05, два – з P < 0,01 три – з P < 0,001)

З лактатпродукуючих ізоцимів найвище зростала розрахована активність ЛДГ4, яка була у 3,5 разів вище, ніж у контролі. Зросла на 172 % й активність ізоциму ЛДГ3, який однаково перетворює лактат у піруват і навпаки. Збільшення активності на 47 % ЛДГ2, ізоциму який більше споріднений до лактату, можна пояснити спробою організму щурів I дослідної групи урівноважити утворення лактату у крові (табл. 3.2).

Таблиця 3.2

Вплив введення таурину дозами 40 (I) та 100 мг/кг (II) на активність ізозимів лактатдегідрогенази (мкмоль НАДН / (хв × мг протеїну) у крові щурів (n=4; M±m)

Група тварин	Ізозими				
	ЛДГ1	ЛДГ2	ЛДГ3	ЛДГ4	ЛДГ5
Контроль	0,75±0,12	0,75±0,10	0,25±0,05	0,28±0,06	0,63±0,12
I	0,91±0,10	1,10±0,10*	0,68±0,05**	1,08±0,09***	0,47±0,04
II	1,35±0,08 ^{##&}	1,20±0,11 [#]	0,47±0,07 ^{#&}	0,17±0,03 ^{&&&}	0,64±0,07

Примітки: I – перша дослідна група тварин (доза таурину – 40 мг/кг), II – друга дослідна група тварин (доза таурину – 100 мг/кг); * – статистично достовірна різниця між показниками тварин контрольної та I дослідної групи, # – контрольної та II дослідної групи & – I та II дослідних груп (один значок – з $P < 0,05$, два – з $P < 0,01$ три – з $P < 0,001$)

Зростання кількості лактату веде до закислення середовища, а відповідно і порушення гомеостазу, що негативно впливає на перенесення кисню до органів.

У крові тварин II дослідної групи активність ЛДГ є у межах контролю, однак вміст ізозимів зсувається в бік піруват- синтезуючих. При цьому, зростає не тільки активність ізозимів ЛДГ1 та ЛДГ2 (на 80 та 60 % відповідно), але і активність ЛДГ3 – на 88 %. Таке зростання вказує на переважання кисень-залежних процесів у крові тварин II дослідної групи.

Не вдалось встановити різницю у активностях аспартат- та аланінаміно-трансферази. Проте виявлено, що їх співвідношення зростає у II дослідній групі майже у два рази порівняно з контролем (див. табл. 3.3).

Зростання активності лактатдегідрогенази – одного з маркерів цілісності клітин організму [53] у крові I дослідної групи може свідчити про збільшення

деструктивних процесів у тканинах організму. З іншого боку, зростання активності цього ензиму може бути наслідком збільшення кількості еритроцитів, що є більш вірогідно. Перерозподіл ізозимів лактатдегідрогенази вказує на початок гіпоксичних процесів, внаслідок яких зростала розрахована активність ізозиму ЛДГ3, який з однаковою ефективністю продукує лактат і піруват.

Зростання ж розрахованої активності ізозимів відповідальних за синтез пірувату у крові II дослідної групи вказує на підвищення окисних процесів у крові і, можливо на збільшення вмісту лейкоцитів та наявність незрілих форм еритроцитів. Проте більш ймовірним є накопичення у крові лактату і пристосування еритроцитів до його утилізації. Зростання співвідношення АСТ/АЛТ у крові тварин II дослідної групи вказує на ушкодження печінки великими дозами таурину.

Отже, зміни вмісту еритроцитів та гемоглобіну у тварин I дослідної групи слід розцінювати як свідчення розвитку вираженої гіпоксії і початку компенсаторної реакції на неї. Про це й свідчить зростання загальної активності ЛДГ та її четвертого ізозиму. У тварин II дослідної групи гіпоксія є невираженою – або за рахунок усунення причин її виникнення, або досконалішої компенсації. На користь останнього свідчить збільшення активності та вмісту ізозимів ЛДГ1 та ЛДГ2. Крім цього, у крові тварин II дослідної групи зростає співвідношення АСТ/АЛТ, що може вказувати на ураження печінки, хоча маса органу була в межах контролю.

Підсумок

Отже, тривале пероральне введення таурину дозами 40 та 100 мг/кг призводить до відставання у масі від контрольної групи на 10 добу експерименту, що пояснюється не адаптованістю піддослідних тварин до високих доз таурину. При цьому, знижується відносна маса сім'яників, що говорить про зростання деструктивних процесів у цих органах, та порушенні статевої функції та синтезу сперміїв. Натомість відносна маса мозку зростає, що можливо

пов'язано з позитивним впливом таурину на синтетичні процеси у мозку. Для синтетичних процесів необхідна енергія, саме тому у крові тварин I дослідної групи тенденційно знижується концентрація глюкози. Крім цього, у щурів цієї ж групи зменшився вміст гемоглобіну у одному еритроциті, що може бути пов'язано, з активацією гемоксигенази-1 таурином, або здатністю сполуки виводити Fe^{2+} з організму. Зниження вмісту гемоглобіну призводить до гіпоксії, що в свою чергу відображається на вмісту ізозимів та активності ЛДГ. Так, у тварин I дослідної групи зростає вміст лактатпродукуючих ізозимів. У тварин II дослідної групи таурин не знижує вміст гемоглобіну та активність ЛДГ, проте відбувається перерозподіл ізозимного складу у бік збільшення піруватпродукуючих. Крім цього, у плазмі крові тварин цієї ж групи зростає й співвідношення АСТ/АЛТ, яке перевищує норму. Це вказує на ураження печінки великими дозами таурину.

Результати цих досліджень опубліковані у:

1. Ostapiv R.D. Activity and izozyme content of lactate dehydrogenase in different rat tissues at per oral taurine injection / R.D. Ostapiv, S.L. Humenyuk, V.V. Manko // Ukr. Biochem. J. – 2015. – Vol. 87 (N 4). – P. 54–62.
2. Остапів Р. Д. Вплив таурину на фізіологічні показники щурів / Р. Д. Остапів, О. С. Кисців В. В. Манько // Вісник Львів. ун-ту. Сер. біол. – 2015. – Вип. 69. – С. 247–255.

3.2. Функціонування мозку щурів за тривалого введення таурину

3.2.1. Зміна поведінкової активності тварин під впливом таурину

Мозок – орган, в якому переважають гліколітичні процеси, а окисні процеси жорстко контролюються системою антиоксидантного захисту. Таурин відіграє в мозку підтримуючим елементом системи антиоксидантного захисту та є активатором нервової системи, через блокування гальмівних ГАМК-рецепторів [132]. Зростання активності нейронів вимагає зростання енергетичних затрат, тому важливим є дослідити вплив таурину на енергетичне забезпечення мозку.

У тварин I дослідної групи тривале пероральне введення таурину привело до зростання відносної маси мозку (див. рис. 3.1 Б). Не зрозуміло, чи збільшення маси мозку напряму впливає на поведінкову активність тварин. Але у тварин цієї ж групи, суттєво зросла і кількість поведінкових актів (рис. 3.4 А), на відміну від контрольних тварин, для яких характерна чітка тенденція до зменшення поведінкової активності вже протягом перших 5 днів експерименту – внаслідок, очевидно, адаптації до стресу, спричиненого експериментальними маніпуляціями.

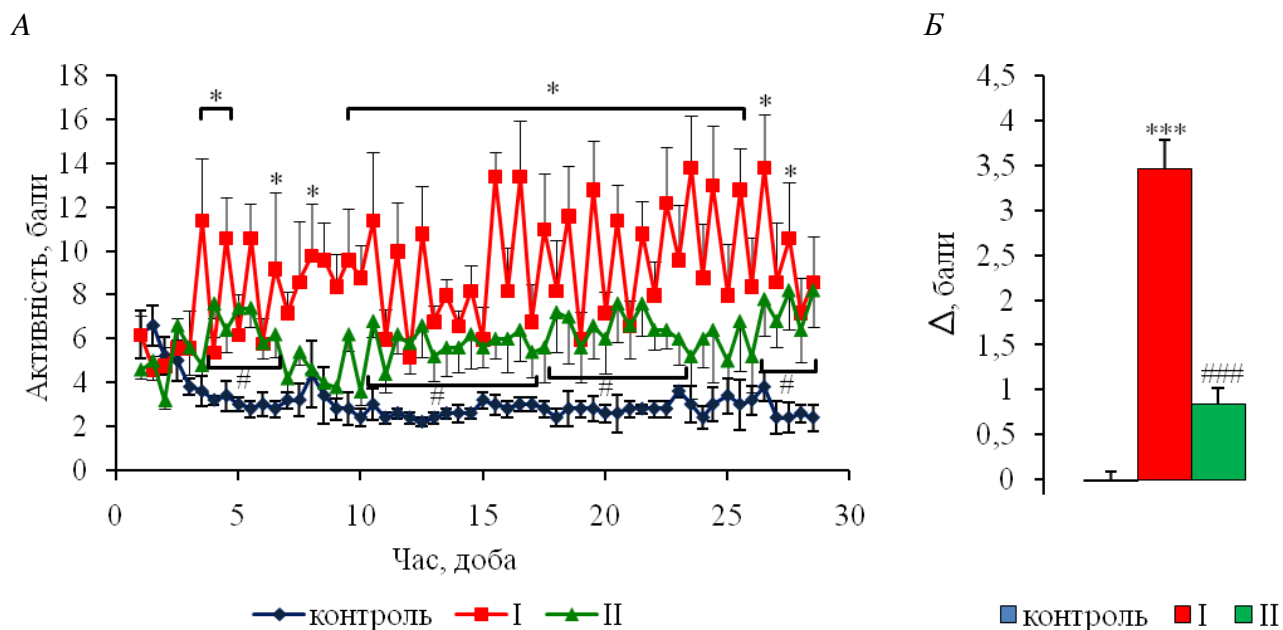


Рис. 3.4. Вплив перорального введення таурину дозами 40 (I) та 100 (II) мг/кг на поведінкову активність щурів протягом часу експерименту: *A* – поведінкова активність тварин, яку оцінювали за методом відкритого поля щодня – до введення води (контроль) чи розчину таурину (I і II дослідні групи) та через одну годину після введення; на графіку перша точка протягом дня – до введення, а друга – після введення; *B* – різниця між поведінковими активностями до та після введення води чи таурину (швидка відповідь на введення); $n = 5$: * – статистично достовірна різниця між показниками тварин контрольної та I дослідної групи, # – контрольної та II дослідної групи (один значок – з $P < 0,05$, три – з $P < 0,001$)

У тварин II дослідної групи, у яких відносна маса мозку є такою ж, як і в контролі, адаптація, тим не менше, є відсутня і поведінкова активність залишається майже на одному і тому самому рівні протягом всього часу експерименту. Тому, якщо і можна говорити про кореляцію синтетичних процесів у нервовій системі і поведінкову активність тварин, то лише за певних умов.

Крім того, зареєстровані також відмінності у поведінковій активності тварин обох дослідних груп до і через одну годину після введення таурину (рис. 3.4 Б). Причому, поведінкова активність тварин контрольної групи до введення води у стравохід (фонова активність) і через одну годину після введення взагалі не відрізнялася – швидка відповідь була відсутня. Тому сама процедура введення зонду у стравохід за стресорністю не відрізняється від інших експериментальних маніпуляцій, і до них тварини контрольної групи швидко адаптуються.

Особливо суттєвою була швидка відповідь на введення таурину у тварин I дослідної групи (рис. 3.9 Б). У тварин II дослідної групи, незважаючи на більшу дозу, різниця між поведінковою активністю до і через одну годину після введення таурину була суттєво меншою порівняно з тваринами I дослідної групи. Можливо це пов'язано з здатністю таурину блокувати гальмівні рецептори γ -аміномасляної кислоти [76].

Отже, тривале пероральне введення таурину спричиняло зростання поведінкової активності піддослідних тварин у обох дослідних групах. Найвищі показники зареєстровані у щурів I дослідної групи. Крім цього, виявлено, що у цій же групі навища різниця між кількістю поведінкових актів після введення таурину і до введення сполуки.

3.2.2. Активність ензимів трансамінування та лактатдегідрогенази у мозку піддослідних тварин

Проте, зростання поведінкової активності могло бути через збільшення на 37,8 % активності цитоплазматичної АСТ, реакція трансамінування якої зсунута в бік продукції глутамату (табл. 3.3).

Таблиця 3.3

Вплив перорального введення таурину на активність ензимів мозку щурів (n=4–5; M±m)

Показник	Група тварин		
	Контроль	I (40 мг/кг)	II (100 мг/кг)
АСТ, мкмоль /хв ×мг протеїну	0,37±0,04	0,51±0,03*	0,47±0,03
АЛТ, мкмоль /хв ×мг протеїну	0,29±0,02	0,31±0,02	0,25±0,02
Активність ЛДГ, мкмоль НАДН/(хв×мг протеїну)	10,33±0,72	18,37±2,28**	18,86±1,21###

Примітки: I – перша дослідна група тварин (доза таурину – 40 мг/кг), II – друга дослідна група тварин (доза таурину – 100 мг/кг); * – статистично достовірна різниця між показниками тварин контрольної та I дослідної групи, # - контрольної та II дослідної групи & – I та II дослідних груп (один значок – з P < 0,05, два – з P < 0,01 три – з P < 0,001).

Ця сполука є збуджуючим нейротрансмітером в нервовій системі хребетних, тому варто припустити, що це також підвищує поведінкову активність щурів. Активності АСТ у мозку тварин II дослідної групи та АЛТ у обох дослідних груп не відрізнялись від контролю.

Збільшення поведінкової активності передбачає можливе збільшення окисного метаболізму, а значить і зростання продукції пірувату. І дійсно, у мозку обох дослідних груп сумарна активність ЛДГ зростає на 78 та 83 % порівня-

но з контролем. При цьому, зростає вміст кисень-незалежних ізозимів ЛДГ (рис. 3.5)

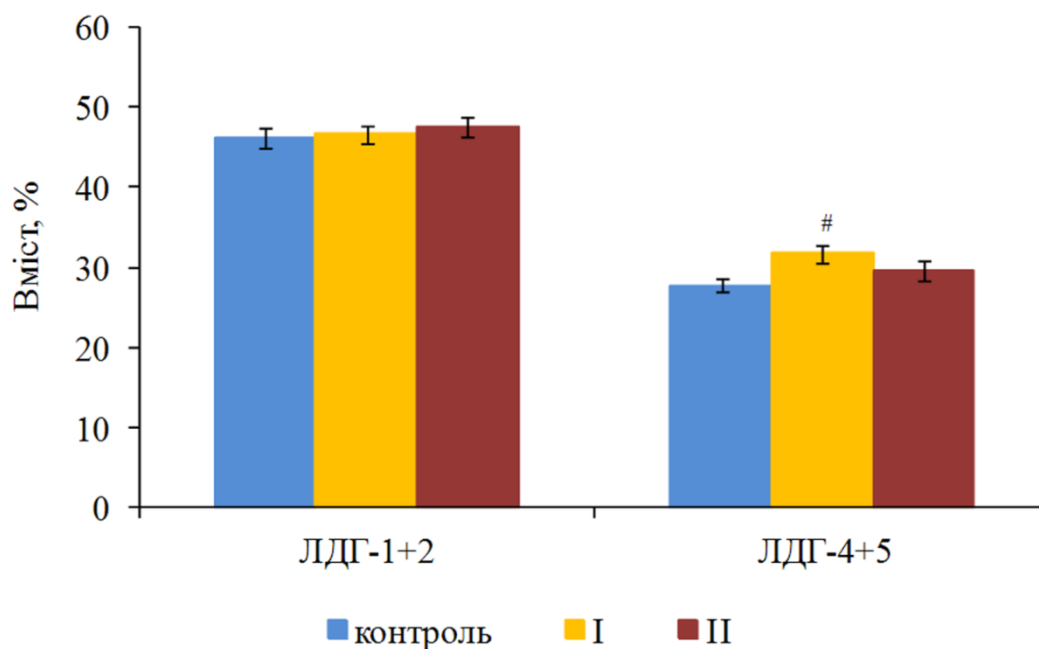


Рис. 3.5 Суми відсоткового вмісту ізозимів лактатдегідрогенази мозку контрольної, I (40 мг/кг) та II (100 мг/кг) дослідних груп, які характеризують ступінь аеробного (ЛДГ1+ЛДГ2) та анаеробного (ЛДГ4+ЛДГ5) метаболізму; n = 4: # – статистично достовірна різниця між показниками тварин контрольної та II дослідної групи з $P < 0,05$

Збільшення сумарної активності ЛДГ відбулось через зростання розрахованої активності усіх ізозимів, як у тварин I так і II дослідних груп (табл. 3.4).

Таблиця 3.4

Вплив тривалого введення таурину дозами 40 (I) та 100 мг/кг (II) на активність ізозимів лактатдегідрогенази (мкмоль НАДН / (хв × мг протеїну) у мозку щурів (n=4; M±m)

Група тварин	ЛДГ1	ЛДГ2	ЛДГ3	ЛДГ4	ЛДГ5
Контроль	2,32±0,15	2,21±0,18	2,55±0,21	2,28±0,10	0,42±0,05
I	5,53±0,54**	3,92±0,44*	4,40±0,44**	5,20±0,39***	1,31±0,22**
II	4,94±0,29 ^{###}	4,14±0,30 ^{##}	4,38±0,35 ^{##}	4,42±0,53 ^{###}	1,18±0,16 ^{##}

Примітки: I – перша дослідна група тварин (доза таурину – 40 мг/кг), II – друга дослідна група тварин (доза таурину – 100 мг/кг); * – статистично достовірна різниця між показниками тварин контрольної та I дослідної групи, [#] - контрольної та II дослідної групи & – I та II дослідних груп (один значок – з P < 0,05, два – з P < 0,01 три – з P < 0,001)

Збільшення сумарної активності лактатдегідрогенази та зміни вмісту її ізозимів у тканині мозку щурів дослідних груп свідчать про інтенсифікацію процесів утилізації глюкози та збільшення синтезу самого ензиму. Однак, якщо у II дослідній групі співвідношення між відсотковим вмістом ізозимів не відрізняється від такого у контролі, то у тварин I дослідної групи відмічено зсув співвідношення і зростання відсоткового вмісту ЛДГ4 і ЛДГ5. Такі зміни можуть відбуватись за зниження вмісту кисню, до чого мозок дуже чутливий [61].

Отже, у тварин обох дослідних груп зросла сумарна активність ЛДГ, що обумовлено збільшенням розрахованої активності усіх ізозимів. Крім цього у I дослідній групі зріс вміст лактатпродукуючих ізозимів, збільшилась й активність цитоплазматичної АСТ. Останнє може спричиняти зростання поведінкової активності на більшу величину у тварин I дослідної групи, порівняно з II.

3.2.3. Інтенсивність дихання мітохондрій мозку піддослідних тварин

Інтенсивність ендogenous дихання V_1 мітохондрій мозку контрольної групи тварин становила $0,18 \text{ нмоль } O_2 / (\text{хв} \times \text{мг протеїну})$, а за додавання екзогенного α -кетоглутарату зростала у більш як два рази ($P < 0,001$), порівняно з ендogenous диханням (рис. 3.6).

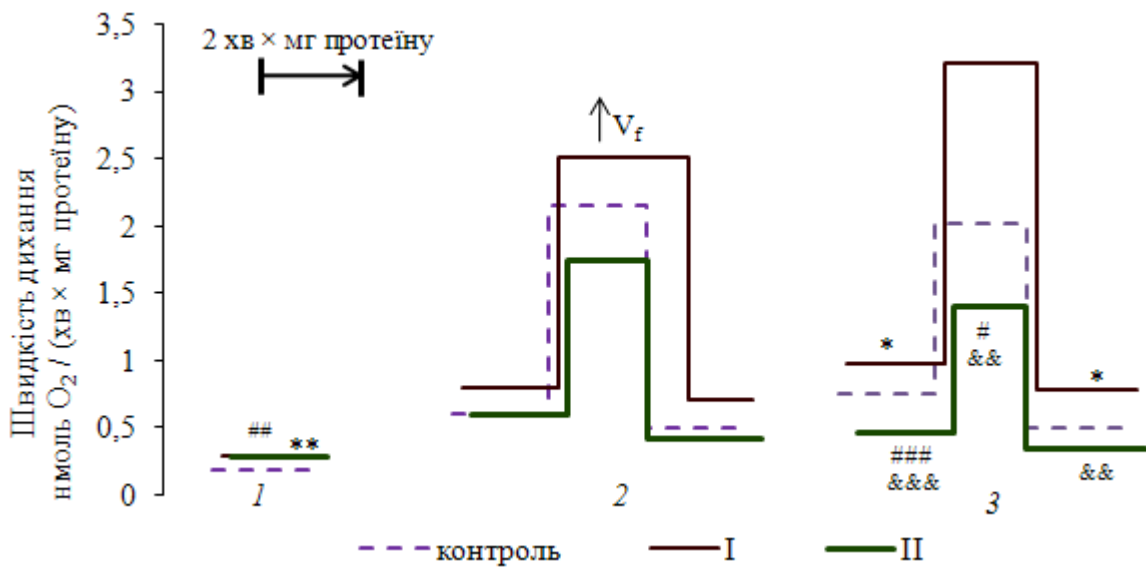


Рис. 3.6. Вплив тривалого введення таурину дозами 40 (I) та 100 (II) мг/кг на інтенсивність дихання та фосфорилування мітохондрій мозку за окиснення: ендogenous субстратів (1), α -кетоглутарату (2) і сукцинату(3); $n=3-5$: * – статистично достовірною різниця між показниками тварин контрольної та I дослідної групи, # - контрольної та II дослідної групи & – I та II дослідних груп (один значок – з $P < 0,05$, два – з $P < 0,01$ три – з $P < 0,001$)

За додавання АДФ (V_3) на фоні α -кетоглутарату швидкість споживання кисню зростала у 2,5 рази, порівняно з V_4^S ($P < 0,001$). Після вичерпання АДФ швидкість поглинання кисню () зменшувалась порівняно з V_3 на 65,1 % ($P <$

0,001). Подібна закономірність спостерігалася і у всіх інших досліджуваних тканинах контрольної та обох дослідних груп, як за додання сукцинату, так і α -кетоглутарату. Це вказує на те, що мітохондрії функціонують у межах фізіологічної норми [5, 7, 147]. Однак, за тривалого введення таурину тваринам суттєво змінювались швидкості дихання мітохондрій різних тканин у різних швидкостях дихання за Чансом.

Зростання активності лактатдегідрогенази означає підвищений рівень енергетичного метаболізму, на що і вказує зростання ендогенного дихання мітохондрій мозку тварин обох дослідних груп на 25,6 %. За окиснення α -кетоглутарату зростає на 28,9 % швидкість фосфорилування, проте не виявлено вірогідної різниці у V_4^S , V_3 , а також між показниками дихання і окисного фосфорилування у тварин контрольної, I та II дослідних груп (табл. 3.5).

Таблиця 3.5

Показники споживання кисню мітохондріями мозку щурів та окисного фосфорилування за окиснення екзогенних α -кетоглутарату та сукцинату (M \pm m)

Показники	Контроль, n = 3	За введення таурину	
		I, n = 5 (40 мг/кг)	II, n = 3 (100 мг/кг)
за окиснення α -кетоглутарату			
Дихальний контроль за Ларді, в.о.	4,21 \pm 0,40	3,22 \pm 0,36	3,26 \pm 0,33
Дихальний контроль за Чансом, в.о.	4,52 \pm 0,69	4,09 \pm 0,74	4,10 \pm 0,37
АДФ/О, мкмоль АДФ/нмоль O ₂	2,99 \pm 0,59	3,02 \pm 0,52	3,16 \pm 0,68
за окиснення сукцинату			
Дихальний контроль за Ларді, в.о.	2,69 \pm 0,10	3,32 \pm 0,47	3,18 \pm 0,58
Дихальний контроль за Чансом, в.о.	4,20 \pm 0,10	4,10 \pm 0,12	4,10 \pm 0,25
АДФ/О, мкмоль АДФ/нмоль O ₂	2,34 \pm 0,39	2,07 \pm 0,30	2,30 \pm 0,67

Примітки: I – перша дослідна група тварин (доза таурину – 40 мг/кг), II – друга дослідна група тварин (доза таурину – 100 мг/кг)

За окиснення екзогенного сукцинату інтенсивність споживання кисню мітохондріями мозку тварин I дослідної групи була на 31,8 % вищою, а у щурів II

дослідної – нижчою на 38,9 %. Подібна залежність спостерігалась за додавання АДФ на фоні сукцинату та після вичерпання АДФ (). Однак не зважаючи на підвищення швидкості споживання кисню мітохондріями мозку за цих умов, спряження між фосфорилуванням та окисненням субстратів і ДК за Ларді та Чансом у тварин I та II дослідної групи лежали у межах похибки середнього арифметичного.

Зростання інтенсивності споживанню кисню мітохондріями мозку тварин I дослідної групи може бути наслідком збільшеної потреби мозку у швидкому синтезі АТФ. Результати позитивного впливу таурину підтверджують дослідни, проведені на нейронах. За їхньої інкубації у середовищі з таурином підвищується мітохондріальна ємність Ca^{2+} , мембранний потенціал мітохондрій та синтез АТФ [72]. Але як свідчать наші результати досліджень, швидкість споживання кисню у мітохондріях мозку II дослідної групи знижується. Це може бути результатом зниження активності сукцинатдегідрогенази внаслідок порушення окисного метаболізму внаслідок гіперактивації системи антиоксидантного захисту таурином.

Отже, у мозку щурів обох дослідних груп зростало ендогенне дихання, що свідчить про збільшення темпів енергетичного метаболізму. При цьому, у тварин I дослідної групи за окиснення α -кетоглутарату зростала швидкість фосфорилування, а за окиснення сукцинату – інтенсивність дихання у всіх станах за Чансом. У щурів II дослідної групи V_4^S та V_3 знижувались за використання сукцинату, як субстрату.

3.2.4. Активність ензимів антиоксидантного захисту мозку піддослідних тварин

Зростання енергетичних процесів часто приводить до росту продукції вільних радикалів кисню, а це в свою чергу до активації антиоксидантного за-

хисту. Незважаючи на це, у обох дослідних групах величина загальної активності СОД вірогідно не змінювалась (табл. 3.6).

Таблиця 3.6

Вплив таурину на активність ензимів антиоксидантного захисту мозку щурів (M±m)

Показники	Конт- роль, n = 3	За введення таурину	
		I, n = 5 (40 мг/кг)	II, n = 3 (100 мг/кг)
СОД, МО/мг протеїну	1,08±0,24	1,21±0,30	1,37±0,10
ГПО, мкмоль GSH/хв×мг протеїну	0,18±0,04	0,28±0,02**	0,25±0,01 ^{#&}
КАТ, мкмоль Н ₂ О ₂ /хв×мг протеїну	0,18±0,03	0,38±0,03**	0,55±0,04 ^{###&&&}
Г-6-ФДГ, нмоль НАДФ/хв×мг протеїну	2,08±0,31	3,22±0,15*	2,17±0,18
Вміст ТБК, мкмоль/мг протеїну	0,14±0,03	0,13±0,03	0,12±0,04
АОЗ/ТБК, в.о.	0,10±0,03	0,27±0,04*	0,66±0,13 [#]
СОД/КАТ, в.о	1,92±0,29	0,98±0,20*	1,00±0,08 [#]
ГПО/КАТ, в.о	1,02±0,09	0,76±0,06*	0,46±0,02 ^{###}

Примітки: I – перша дослідна група тварин (доза таурину – 40 мг/кг), II – друга дослідна група тварин (доза таурину – 100 мг/кг); * – статистично достовірна різниця між показниками тварин контрольної та I дослідної групи, [#] - контрольної та II дослідної групи [&] – I та II дослідних груп (один значок – з P < 0,05, два – з P < 0,01 три – з P < 0,001).

Дослідження вмісту ізозимів СОД у тканинах щурів (печінці, мозку, сім'яниках та стегновому м'язі) виявили п'ять смуг протеїнів, що проявляли активність ензиму: по одному – позаклітинний і мітохондріальний та три цитозольних (рис. 3.7)

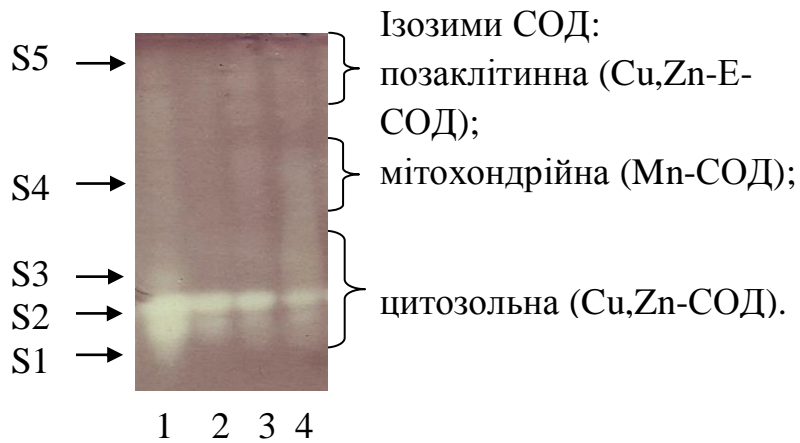


Рис. 3.7. Спектр ізозимів СОД тканин щурів: 1 – мозку; 2 – печінки; 3 – сім'яника; 4 – м'язів

Дослідженнями спектру ізозимів каталази виявлено три ізозими: КАТ1 та КАТ3 цитоплазматичні, а КАТ2 наявний як і у цитоплазмі так і у мітохондріях (рис. 3.8).

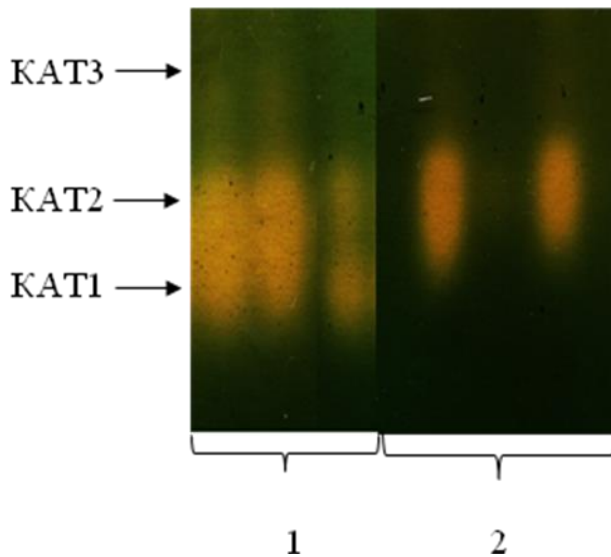


Рис. 3.8. Типовий спектр ізозимів каталази мозку щура. 1 – цитоплазматична фракція (супернатант 9000 g); 2 – мітохондріальна фракція (осад 9000 g).

У тварин I дослідної групи на 43,5 % зменшувалась розраховані активність S1 ізозиму, а у обох дослідних груп у 2–2,5 рази зростала активність ізозиму S2, і в десять разів зменшувалась активність S3 (табл. 3.7).

Таблиця 3.7

Вплив таурину на активність ізозимів СОД (МО/мг протеїну) та КАТ (мкмоль H₂O₂/хв×мг протеїну) у мозку щурів (M±m)

Ензим	Ізозими та їх порядковий номер		Активність ізозимів		
			Контроль, n = 3	Дослід	
				I, n = 5 (40 мг/кг)	II, n = 3 (100 мг/кг)
СОД	Cu,Zn-E-SOD	S5	0,052±0,006	0,070±0,014	0,068±0,005
	Mn-SOD	S4	0,069±0,006	0,091±0,012	0,064±0,003
	Cu,Zn-SOD	S3	0,310±0,023	0,035±0,004***	0,050±0,004 ^{###&}
		S2	0,487±0,073	0,805±0,054**	1,060±0,043 ^{##&&}
		S1	0,161±0,018	0,091±0,014*	0,126±0,012
КАТ	КАТ1		0,070±0,004	0,110±0,009**	0,178±0,011 ^{###&&}
	КАТ2		0,079±0,003	0,165±0,009**	0,314±0,017 ^{###&&}
	КАТ3		0,031±0,002	0,094±0,006**	0,058±0,003 ^{##&&}

Примітки: I – перша дослідна група тварин (доза таурину – 40 мг/кг), II – друга дослідна група тварин (доза таурину – 100 мг/кг); * – статистично достовірною різниця між показниками тварин контрольної та I дослідної групи, [#] – контрольної та II дослідної групи [&] – I та II дослідних груп (один значок – з P < 0,05, два – з P < 0,01 три – з P < 0,001).

Активність ГПО мозку щурів I та II дослідних груп на 55,56 та 38,89 % вища, ніж у контролі. У тканині мозку тварин обох дослідних груп у 2 та 3 рази зросла активність каталази.

За тривалого введення таурину пропорційно збільшувались розраховані активності КАТ1 (на 51,1 та 154,3 %) та КАТ2 (у 2 та 4 рази) у тварин I та II дослідної групи (табл. 3.14). Розрахована активність КАТ3 у тварин I дослідної групи була найвищою – у 3 рази більшою за контроль, а у II – на 87,1% вище за контроль, однак нижче на 38,3 %, ніж у I дослідній групі.

У мозку тварин I дослідної групи активність глюкозо-6-фосфатдегідрогенази зросла на 54,8 %. Не виявлено змін між контрольною та дослідними групами у вмісті ТБК-активних продуктів. За рахунок зростання активності ензимів АОЗ збільшується відношення АОЗ/ТБК (у 1,8 та 5,8 разів, відповідно) в обох дослідних групах. Це говорить про зростання стійкості мозку до активних форм кисню. Проте, зниження коефіцієнтів СОД/КАТ та ГПО/КАТ вказує на можливе зростання продукції гідроген пероксиду.

У мозку щурів збільшення дози (від 40 до 100 мг/кг) таурину стимулює активність ензимів, що утилізують пероксид водню та гідроксильний аніон, забезпечуючи ефективний захист від надлишку цитотоксичних сполук і пероксидного окиснення ліпідів. Протилежні результати були отримані за введення таурину щурам віком 20–22 місяців додавання сполуки у питну воду (2% об./об.) знижувало активність ензимів антиоксидантного захисту [116]. Підвищення ж активності глутатіонпероксидази, ймовірно, зумовлено роллю таурину, як регулятора обміну сульфурвмісних сполук й речовини, здатної збільшувати вміст глутатіону у нейронах [61].

Отже, тривале пероральне введення таурину спричиняє зростання ензиматичної активності антиоксидантного захисту (ГПО та каталази) та перерозподіл ізозимів супероксиддисмутази, за збереження її активності на контрольному рівні, та каталази. При цьому збільшується АОЗ/ТБК, що вказує на ріст опірності вільним радикалам кисню.

Підсумок

Таким чином, нами зареєстровано збільшення поведінкової активності піддослідних тварин у обох дослідних групах. Однак у щурів I дослідної групи показник найвищий, що може бути спричинене зростанням цАСТ, яка продукує глутамат – активуючий медіатор. При цьому, обох дослідних груп зростає активність ЛДГ і всіх її ізозимів та ендogenousного дихання. Однак, якщо у мозку тварин II дослідної групи інтенсивність мітохондріального дихання за окиснення

1. Ostapiv R.D. Activity and izozyme content of lactate dehydrogenase in different rat tissues at per oral taurine injection / R.D. Ostapiv, S.L. Humenyuk, V.V. Manko // Ukr. Biochem. J. – 2015. – Vol. 87 (N 4). – P 54–62.
2. Ostapiv R.D. Effect of taurine administration on activity of superoxidodismutase in rat tissues / R.D. Ostapiv, V.V. Manko // Animal Biology. – 2015. – Vol. 17. – P. 104–110.
3. Остапів Р. Д. Інтенсивність дихання мітохондрій та окисне фосфорилування у різних тканинах щурів за перорального введення таурину / Р. Д. Остапів, В. В. Манько // Фізіол. журн. – 2015. – Т. 61. – С. 103–112.
4. Ostapiv R. D. Antioxidant defense of rat organism at long-term per oral taurine injection / R. D. Ostapiv, V. V. Manko // Studia Biologica. – Vol. 9. – P. 59–70.

3.3. Вплив таурину на репродуктивну функцію самців

3.3.1. Фізіологічні показники спермійв бугаїв за інкубації з таурином

Таурин – наявний у високих концентраціях, як у тканині сім'янику, де він необхідний для дозрівання спермійв, так і у плазмі сперми, де забезпечує стабільність осмотичного тиску [91]. Однак, не відомо, як таурин впливає на енергетичне забезпечення статевих клітин, від якого на пряму залежить їх запліднювальна здатність.

Швидкість споживання кисню спермою ссавців переважно залежить від складу середовища розрідження, тобто від наявності та доступності субстратів окиснення та речовин, що підтримують осмотичний тиск та кислотність середовища на належному рівні. Так, нами зареєстровано, що інтенсивність дихання сперми бугаїв була найвищою за розрідження лактозо-жовтково-гліцериним розріджувачем (ЛЖГР) і становила $16,57 \pm 1,07$ нмоль O_2 / (хв \times 0,1 мл сперми; табл. 3.8).

Таблиця 3.8

Дихальна активність сперми (нмоль O_2 / (хв \times 0,1 мл сперми) у розріджених еякулятах бугая за додавання таурину (n=5; $M \pm m$)

Група	Середовище розрідження		
	ФСБ	ЛЖГР	«АндроМед»
Контроль	$10,20 \pm 0,81$	$16,57 \pm 1,07$	$7,78 \pm 0,90$
Таурин: 175 мкмоль/л	$8,37 \pm 0,53$	$16,40 \pm 0,84$	$7,62 \pm 0,87$
350 мкмоль/л	$7,38 \pm 0,44^*$	$16,07 \pm 1,04$	$6,86 \pm 0,69$
525 мкмоль/л	$6,89 \pm 0,55^{**}$	$14,73 \pm 0,96$	$6,11 \pm 0,78^*$
700 мкмоль/л	$5,68 \pm 0,28^{***}$	$12,05 \pm 1,27^*$	$5,65 \pm 0,81^*$

Примітка: * – різниця статистично вірогідна порівняно до контролю з $P < 0,05$; *** – з $P < 0,001$

Швидкість споживання кисню була на 38,4 % ($P > 0,05$) нижча у випадку використання ФСБ, і ще нижча, на 53,1 % ($P > 0,01$) – коли розбавляли середовищем «АндроМед».

Незважаючи на різницю у дихальній активності сперми, не вдалось виявити достовірної різниці між виживанням сперміїв бугая за розрідження різними середовищами (табл. 3.9).

Таблиця 3.9

Вживання сперміїв (год) у розріджених еякулятах бугая за інкубації з таурином ($n=5$; $M \pm m$)

Група	Середовище розрідження		
	ФСБ	ЛЖГР	«АндроМед»
Контроль	105,6±8,59	120,0±11,76	132±14,70
Таурин: 175 мкмоль/л	124,8±8,03	134,4±8,59	132±12,33
350 мкмоль/л	124,8±12,52	134,4±12,88	112±12,22
525 мкмоль/л	124,8±12,52	129,6±10,95	128±16,65
700 мкмоль/л	129,6±8,59*	120,0±11,76	108±9,38*

Примітка: * – різниця статистично вірогідна порівняно до контролю з $P < 0,05$

Інтенсивність дихання сперми бугаїв у середовищі ФСБ за додавання таурину у наростаючих концентраціях знижувалась – за 350 мкмоль/л – на 27,9 %, за 525 мкмоль/л – на 32,8 % порівняно з контролем. За таких доз виживання сперміїв бугая тенденційно зростало, однак різниця між контролем і дослідом не досягала першого рівня вірогідності. За максимальної дози таурину (700 мкмоль/л) швидкість споживання кисню була нижчою – на 44,3 %, а виживання, навпаки зростало на 18,5 %.

ФСБ – середовище розрідження, яке підтримує осмотичний тиск за допомогою KCl та NaCl, а за допомогою фосфатних солей – водневий показник середовища. Однак в ньому відсутні субстрати, крім фосфату, для ресинтезу АТФ. Досліджено, що таурин є у високій концентрації в спермі ссавців і виконує функцію осмоліта, однак не використовується в якості субстрата [76], проте сумнівно, що тільки підтримання осмотичного тиску збільшує тривалість існування клітини. Крім цього, відомо, що таурин підвищує рухливість сперміїв, збільшуючи вхід Ca^{2+} в клітину [132]. Проте ФСБ не містить Ca^{2+} , тому ця гіпотеза також малоімовірна. Найбільш вірогідним є те, що таурин відіграє роль антиоксиданту, він неопосередковано збільшує активність ензиматичного антиоксидантного захисту і вміст глутатіону [26, 61]. Таким чином, таурин зміщує рівновагу окисного метаболізму у спермі – знижує вільнорадикальне окиснення субстратів, що є характерним для плазми сперми і підвищує ефективність їх використання клітиною.

Виявлено, що за додавання таурину дозою 175 мкмоль/л інтенсивність дихання сперми бугая розрідженою «АндроМед» була на рівні контролю. Однак, зростання дози таурину до 350 та 525 мкмоль/л спричиняло зниження швидкості споживання кисню на 11,8 та 21,5%. Вживання сперміїв та інтенсивність дихання сперми за дози таурину 700 мкмоль/л були найнижчими – $108 \pm 9,38$ год та $5,65 \pm 0,81$ нмоль O_2 / (0,1 мл сперми \times хв.; табл. 3.11).

«АндроМед» – середовище для розрідження сперми бугаїв, в якому наявні всі необхідні компоненти для продовження існування сперміїв бугая: як субстрати – фруктоза та цитратна кислота, для стабілізації мембрани – фосфоліпіди, для підтримання рН – трис-буфер, а для забезпечення сталого осмотичного тиску – гліцерин. Як і в випадку ФСБ таурин знижує інтенсивність дихання, однак вживання сперміїв знижується а не підвищується. Важливо знати, що таурин транспортується в клітину з Na^+ , а зростання концентрації цього іону негативно відображається на життєздатності сперміїв, діючи в першу чергу на мітохондрії і їх мембранний потенціал [153]. Проте сумнівно, що навіть в розрідже-

ній плазмі сперми міститься достатньо іонів натрію для пошкодження клітини. Таурин сприяє збільшенню насичених жирних кислот у мембрані, що робить її більш гідрофобною і утруднює переніс субстратів через мембрану [76], що можливо і є причиною зниження дихання і переходу сперміїв на «економний режим» і зниження виживання сперміїв.

Інтенсивність дихання сперми бугаїв у середовищі ЛЖГР за додавання таурину дозами 175–525 мкмоль/л не відрізнялось від контролю. Середні значення виживання сперміїв були найвищими за додавання таурину дозами 175–350 мкмоль/л, однак різниця між ними і контрольними даними не досягала першого рівня вірогідності. Інтенсивність дихання сперми знижувалась на 27,3 % за максимальної дози таурину, при цьому виживання клітин тест-культури було в межах контролю.

ЛЖГР – розріджувач, який забезпечує, як субстратами – яєчний жовток та лактоза, так і осмолітиком – гліцерином, який може служити для відновлення мембран сперміїв. Таурин здатний інтенсифікувати перебудову мембрани клітини і можливо, через це відбувається тенденційне збільшення виживання сперміїв бугая. А повернення виживання до контрольних значень та зниження споживання кисню відбувається, як і у випадку з «АндроМед». Таурин – знижує поглинання субстратів сперміями. З іншого боку, таурин здатний збільшувати активність лактатдегідрогенази [108], і зниження споживання кисню може бути через переключення з окисного метаболізму на гліколітичний, де в кінцевому ступені утворюється лактат, а не піруват.

Отже, із результатів досліджень випливає, що додавання до еякулятів таурину у наростаючих концентраціях (175, 350, 525 та 700 мкмоль/л), незалежно від наявності субстратів окиснення в розріджувачах, знижує інтенсивність дихання сперми. Ймовірно, зниження споживання кисню зумовлено властивостями таурину – гальмуванням процесів вільнорадикального окиснення як компонентів плазми сперми і розріджувачів, так і мембранних структур статевих клітин [78]. Однак, як свідчать результати досліджень, роль таурину в окисному

метаболізмі сперми (сперміїв) неоднозначна і залежить від концентрації вказаної сполуки та складу розріджувачів. При цьому, найбільше зниження споживання кисню за зростаючої концентрації таурину встановлено в еякулятах, розріджених ФСБ. Ймовірно, це зумовлено тим, що таурин здатний підвищувати трансмембранний потенціал мітохондрій, а це у свою чергу забезпечує баланс між процесами споживання кисню та ресинтезом АТФ [148]. Можливо тому, зі збільшенням концентрації таурину підвищується виживання сперміїв. Ступінь зниження дихання під впливом таурину за розрідження середовищами ЛЖГР та «АндроМед» є нижчим, ніж ФСБ. Очевидно, що це зумовлено кількістю і співвідношенням субстратів окиснення у середовищах. Крім цього, варто зазначити, що таурин може інтенсифікувати гліколіз і, можливо, перехід клітини на гліколіз є причиною зниження інтенсивності споживання кисню.

3.3.2. Вплив тривалого введення таурину на репродуктивні показники самців щурів

3.3.2.1. Активність ензимів трансамінування та лактатдегідрогенази сім'яників піддослідних щурів

Таурин – необхідна речовина для нормального проходження сперматогенезу, відсутність її приводить до різних аномалій у сперміях та їх розвитку, безпліддя. Інкубація сперми бугаїв з таурином приводить до зростання виживання та активності ензимів антиоксидантного захисту. Однак, судячи зі зниження відносної маси сім'яників у тварин І дослідної групи, зростання вмісту таурину негативно впливає на ці органи.

Нами зареєстровано, що активність АСТ у тварин обох дослідних груп залишалась у межах контролю (табл. 3.10).

Таблиця 3.10

Вплив перорального введення таурину на активність ензимів сім'яників щурів (n=4-5; M±m)

Показник	Група тварин		
	Контроль	I (40 мг/кг)	II (100 мг/кг)
АСТ, мкмоль /хв ×мг протеїну	0,31±0,03	0,31±0,02	0,27±0,02
АЛТ, мкмоль /хв ×мг протеїну	0,43±0,04	0,36±0,03	0,31±0,03*
Активність ЛДГ, мкмоль НАДН/(хв×мг протеїну)	10,15±1,52	14,67±1,66	15,81±0,44 ^{##}

Примітки: I – перша дослідна група тварин (доза таурину – 40 мг/кг), II – друга дослідна група тварин (доза таурину – 100 мг/кг); * – статистично достовірна різниця між показниками тварин контрольної та I дослідної групи, [#] - контрольної та II дослідної групи & – I та II дослідних груп (один значок – з P < 0,05, два – з P < 0,01 три – з P < 0,001).

Активність АЛТ мала тенденцію до зниження у сім'яниках тварин I дослідної групи, а у II дослідній групі показник на 27,9% був вірогідно (P < 0,05) нижчий за контроль. Як було вище зазначено, таурин і аланін є антагоністами за транспортом у клітину [91], тому дозозалежне зниження активності аланінамінотрансферази є очікуваним результатом.

На відміну від АЛТ активність ЛДГ зростала на 55,8 % у тварин II дослідної групи. При цьому у обох дослідних групах зростав вміст кисень-незалежних ізозимів ЛДГ (рис. 3.10).

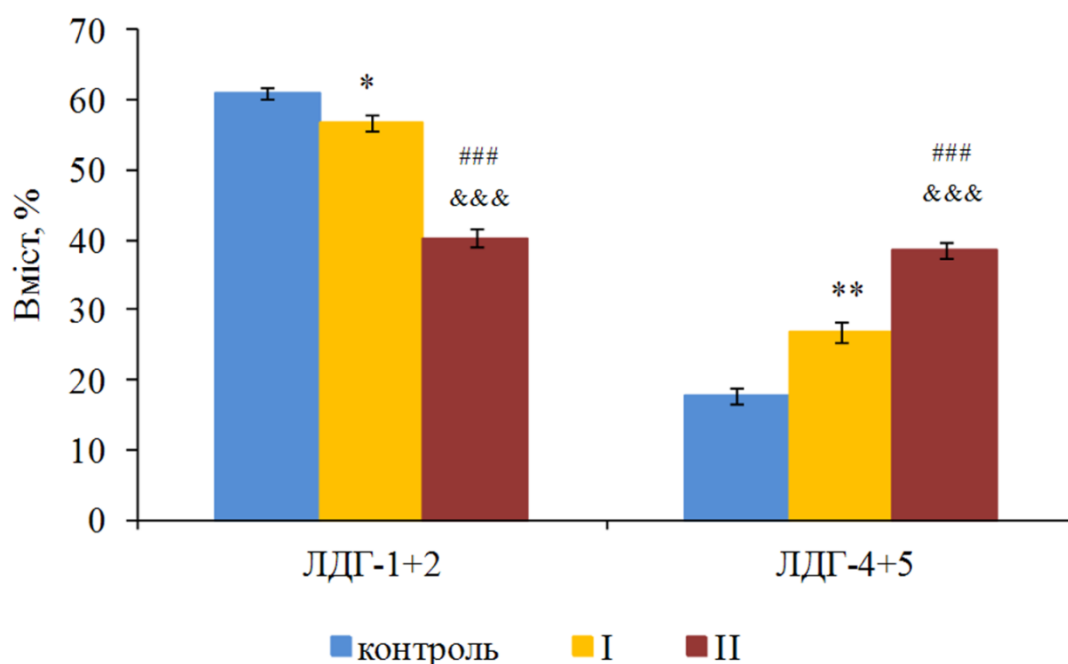


Рис. 3.10. Суми відсоткового вмісту ізозимів лактатдегідрогенази сім'яників контрольної, I (40 мг/кг) та II (100 мг/кг) дослідних груп, які характеризують ступінь аеробного (ЛДГ1+ЛДГ2) та анаеробного (ЛДГ4+ЛДГ5) метаболізму; n = 4: * – статистично достовірна різниця між показниками тварин контрольної та I дослідної групи, # - контрольної та II дослідної групи & – I та II дослідних груп (один значок – з P < 0,05, два – з P < 0,01 три – з P < 0,001).

Таке збільшення у сім'яниках тварин I дослідної групи було викликане зростанням у більш як 15 разів активності ЛДГ5 та на 93,0 % активності ізоциму ЛДГ1. У сім'яниках тварин II дослідної групи активність ЛДГ5 була у 20 разів вищою за контроль, а ЛДГ1 на рівні контролю (табл. 3.11).

Таблиця 3.11

Вплив перорального введення таурину дозами 40 (I) та 100 (II) мг/кг на активність ізозимів лактатдегідрогенази сім'яників щурів (n=4-5; M±m)

Група тварин	Ізозими				
	ЛДГ1	ЛДГ2	ЛДГ3	ЛДГ4	ЛДГ5
Контроль	2,76±0,63	2,66±0,79	1,88±0,35	1,88±0,35	0,10±0,01
I	4,69±1,42*	3,13±0,86	2,24±0,65	2,08±0,48	1,55±0,27***
II	2,48±0,25 ^{&}	3,86±0,40 [#]	3,34±0,47 ^{##&}	4,00±0,40 ^{##&&}	2,06±0,36 ^{###}

Примітки: I – перша дослідна група тварин (доза таурину – 40 мг/кг), II – друга дослідна група тварин (доза таурину – 100 мг/кг); * – статистично достовірна різниця між показниками тварин контрольної та I дослідної групи, [#] - контрольної та II дослідної групи [&] – I та II дослідних груп (один значок – з P < 0,05, два – з P < 0,01 три – з P < 0,001)

Активність ЛДГ4 була у два рази вища як за контроль так і за показники у тварин I дослідної групи. Активності ЛДГ2 та ЛДГ3 зростали тільки на 45,11 та 77,65% порівняно з контролем. Збільшення активності ЛДГ5 у I дослідній групі, а також ЛДГ4 і ЛДГ5 у II дослідній групі вказують на зростання синтезу лактату у сім'яниках, а отже й на можливий розвиток гіпоксії.

Отже, за тривалого введення таурину знизилась активність цитоплазматичної АЛТ, тобто синтез аланіну – амінокислоти, що конкурує з таурином за транспорт у клітину, і також відіграє роль осмореглятора [76]. Активність лактатдегідрогенази, навпаки, зросла. У тварин I дослідної групи завдяки збільшенню розрахованої активності ЛДГ1 та ЛДГ5, з переважанням останньої, а у II дослідній групі за рахунок ЛДГ2–5.

3.3.2.3. Інтенсивність дихання мітохондрій сім'яників піддослідних тварин

Зростання активності ЛДГ у дослідних груп за рахунок інтенсифікації лактатпродукуючих ізозимів може означати зниження поступання пірувату у цикл Кребса, а значить і зменшення потоку відновних еквівалентів у дихальний ланцюг. І дійсно у тварин I дослідної групи інтенсивність ендogenous дихання мітохондрій була нижчою на 48,3 % порівняно з контролем (рис. 3.11).

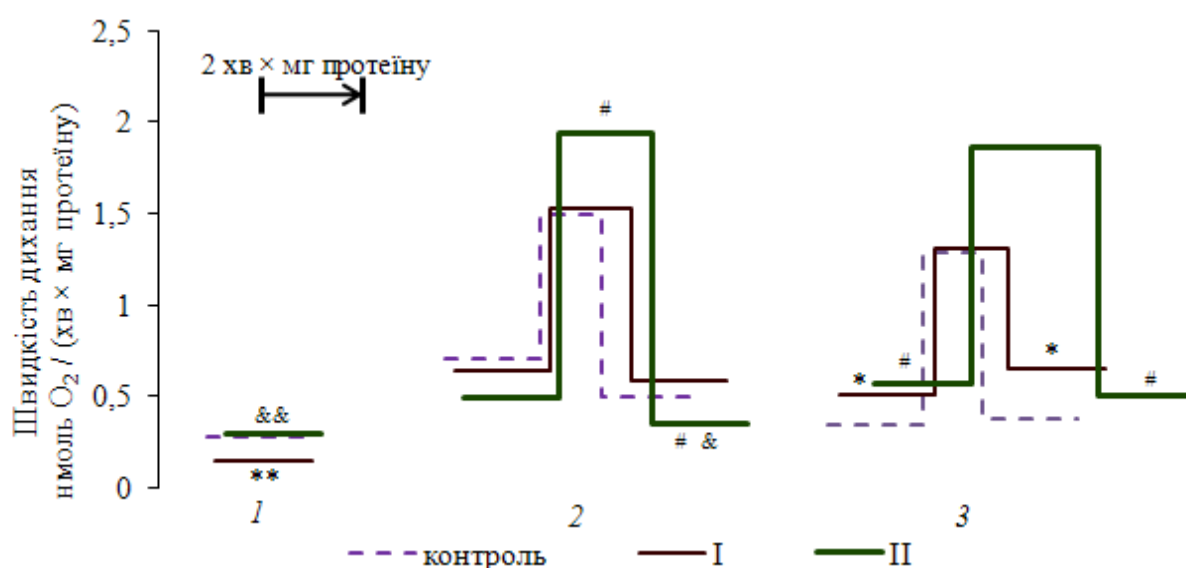


Рис. 3.11. Вплив тривалого введення таурину дозами 40 (I) та 100 (II) мг/кг на швидкість дихання мітохондрій сім'яників за окиснення: ендogenous субстратів (1), α -кетоглутарату (2) і сукцинату(3); n=3–5: * – статистично достовірна різниця між показниками тварин контрольної та I дослідної групи, # - контрольної та II дослідної групи & – I та II дослідних груп (один значок – з $P < 0,05$, два – з $P < 0,01$ три – з $P < 0,001$).

За окиснення α -кетоглутарату інтенсивність дихання мітохондрій сім'яників у тварин I та II дослідних груп вірогідно не відрізнялось від контролю. АДФ-стимульоване дихання мітохондрій сім'яників було вищим на 29,2 % у тварин II дослідної групи, ніж у контролі. Однак швидкість споживання кис-

ню цими мітохондріями виявилась на 30,6 % нижчою. ДК за Ларді та Чансом у сім'яниках II дослідної групи були на 95,6 та 101,6 % вищими, оскільки зросло АДФ-стимульоване дихання (табл. 3.12).

Таблиця 3.12

Показники споживання кисню мітохондріями сім'яників щурів та окисного фосфорилування за окиснення екзогенних α -кетоглутарату та сукцинату ($M \pm m$)

Показники	Контроль, n = 3	За введення таурину	
		I, n = 5 (40 мг/кг)	II, n = 3 (100 мг/кг)
за окиснення α -кетоглутарату			
Дихальний контроль за Ларді, в.о.	2,16 \pm 0,20	1,99 \pm 0,45	4,35 \pm 0,62 ^{#&}
Дихальний контроль за Чансом, в.о.	3,00 \pm 0,21	2,26 \pm 0,36	5,87 \pm 0,72 ^{#&}
АДФ/О, мкмоль АДФ/нмоль O ₂	3,05 \pm 0,87	3,27 \pm 0,30	2,68 \pm 0,58
за окиснення сукцинату			
Дихальний контроль за Ларді, в.о.	3,95 \pm 0,37	2,56 \pm 0,22*	3,69 \pm 0,88
Дихальний контроль за Чансом, в.о.	3,48 \pm 0,42	2,07 \pm 0,40*	3,85 \pm 0,75
АДФ/О, мкмоль АДФ/нмоль O ₂	2,13 \pm 0,25	2,13 \pm 0,31	2,15 \pm 0,33

Примітки: I – перша дослідна група тварин (доза таурину – 40 мг/кг), II – друга дослідна група тварин (доза таурину – 100 мг/кг); * – статистично достовірна різниця між показниками тварин контрольної та I дослідної групи, # - контрольної та II дослідної групи & – I та II дослідних груп (один значок – з P < 0,05, два – з P < 0,01 три – з P < 0,001)

За окиснення сукцинату швидкість споживання кисню мітохондріями сім'яників тварин I дослідної групи збільшувалась на 50,1 %, а у тварин II дослідної групи – на 67,9 % відносно контролю. АДФ-стимульоване дихання у дослідних групах за цих умов вірогідно не відрізняється від контролю. За вичерпання АДФ у тварин I дослідної групи інтенсивність дихання мітохондрій була вищою на 74,5 %, а у тварин II дослідної групи – на 36,3 %, порівняно з контролем. За таких умов, у тварин I дослідної групи ДК за Ларді та Чансом виявилися нижчими на 30,6 та 46,2%, ніж у контролі (табл. 3.14.).

Зниження ендогенного дихання мітохондрій сім'яників тварин I дослідної групи може бути результатом збільшення активності O_2 -незалежного шляху утилізації глюкози. У результаті інтенсифікації цього шляху підвищується продукція лактату, тому активність лактатдегідрогенази теж зростала – для перетворення лактату і пірувату. Лактат поступає у печінку, де перетворюється у піруват, який поступає у цикл Кребса [104]. Це частково пояснює можливу причину інтенсифікації мітохондріального дихання у печінці. З іншого боку, зниження дихального контролю у сім'яників тварин I дослідної групи вказує на можливе пошкодження мембрани мітохондрій. Можливою причиною цього є, ймовірно, зростання процесів пероксидного окиснення ліпідів.

Отже, у тварин I дослідної групи інтенсивність ендогенного дихання сім'яників знижується. При цьому у обох групах за окиснення сукцинату зростали V_4^S та , у тварин I дослідної це спричиняло зниження ДК за Чансом і Ларді. У тварин II дослідної групи за окиснення α -кетоглутарату зростала V_3 і знижувалась , що приводило до збільшення ДК за Чансом і Ларді.

3.2.2.4. Активність ензимів антиоксидантного захисту сім'яників піддослідних тварин

Причиною зниження ендогенного дихання та ДК у мітохондрій сім'яників тварин I дослідної групи могло бути збільшення процесів пероксидного окиснення ліпідів. Це підтверджується збільшенням концентрації ТБК-активних продуктів майже у вісім разів у тварин I дослідної групи. Активності супероксиддисмутази та каталази залишилась на контрольному рівні, а глутатіон пероксидази зростала на 50,0 %. Про негативний вплив надлишку таурину на енергетичний обмін у сім'яниках свідчить й відношення АОЗ/ТБК – у I дослідній групі показник знижується майже у п'ять разів (табл. 3.13).

Таблиця 3.13

Вплив таурину на активність ензимів антиоксидантного захисту сім'яників щурів ($M \pm m$)

Показники	Контроль, n = 3	За введення таурину	
		I, n = 5 (40 мг/кг)	II, n = 3 (100 мг/кг)
СОД, МО/мг протеїну	0,23±0,04	0,27±0,08	0,60±0,10 ^{##&&}
ГПО, мкмоль GSH/хв×мг протеїну	0,16±0,04	0,24±0,03**	0,30±0,01 ^{###&&}
КАТ, мкмоль H ₂ O ₂ /хв×мг протеїну	0,38±0,04	0,39±0,02	0,57±0,01 ^{##&&}
Г-6-ФДГ, нмоль НАДФ/хв×мг протеїну	1,20±0,22	1,39±0,14	1,44±0,23
Вміст ТБК, мкмоль/мг протеїну	0,03±0,01	0,23±0,05**	0,13±0,03 ^{##&&}
АОЗ/ТБК, в.о.	0,42±0,06	0,09±0,003**	0,75±0,04 ^{##}
СОД/КАТ, в.о	0,59±0,04	0,61±0,07	1,05±0,11 ^{#&}
ГПО/КАТ, в.о	0,42±0,05	0,61±0,04*	0,52±0,02

Примітки: I – перша дослідна група тварин (доза таурину – 40 мг/кг), II – друга дослідна група тварин (доза таурину – 100 мг/кг); * – статистично достовірна різниця між показниками тварин контрольної та I дослідної групи, # - контрольної та II дослідної групи & – I та II дослідних груп (один значок – з $P < 0,05$, два – з $P < 0,01$ три – з $P < 0,001$)

Таке зниження опірності вільним радикалам кисню у тварин I дослідної групи пояснюється надпродукцією гідроксильних аніонів, про що говорить зростання на 31,1 % відношення ГПО/КАТ.

Активність супероксиддисмутази та її ізоформ у сім'яниках тварин I дослідної групи не відрізнялась від таких у контролі (табл. 3.14).

Таблиця 3.14

Вплив таурину на активність ізозимів СОД (МО/мг протеїну) та КАТ (мкмоль H_2O_2 /хв×мг протеїну) у сім'яниках щурів ($M \pm m$)

Ензим	Ізозими та їх порядковий номер		Активність ізозимів		
			Контроль, n = 3	Дослід	
				I, n = 5 (40 мг/кг)	II, n = 5 (100 мг/кг)
СОД	Cu,Zn-E-SOD	S5	0,041±0,006	0,032±0,003	0,072±0,004 ^{##&&}
	Mn-SOD	S4	0,027±0,009	0,030±0,002	0,056±0,006 ^{#&&}
	Cu,Zn-SOD	S3	0,031±0,005	0,026±0,003	0,041±0,002 ^{&&}
		S2	0,464±0,029	0,497±0,040	0,745±0,035 ^{###&&}
		S1	0,300±0,030	0,243±0,024	0,492±0,020 ^{##&&}
КАТ	КАТ1		0,099±0,009	0,104±0,008	0,071±0,011 ^{##&&}
	КАТ2		0,242±0,014	0,249±0,007	0,451±0,016 ^{###&&}
	КАТ3		0,040±0,003	0,027±0,003 ^{**}	0,049±0,004

Примітки: I – перша дослідна група тварин (доза таурину – 40 мг/кг), II – друга дослідна група тварин (доза таурину – 100 мг/кг); * – статистично достовірна різниця між показниками тварин контрольної та I дослідної групи, # - контрольної та II дослідної групи & – I та II дослідних груп (один значок – з $P < 0,05$, два – з $P < 0,01$ три – з $P < 0,001$)

Активності глутатіонпероксидази та каталази у тварин I дослідної групи на 33,3 та 46,2 % вищі, ніж у контролі. Розрахована активність ізозиму КАТ3 на 32,5 % була меншою, ніж у контролі. Вміст ТБК-активних продуктів був у 7,7 разів вище за контроль. За таких умов відношення АОЗ/ТБК зменшувалось у 4,7 разів порівняно до контролю.

У сім'яниках тварин II дослідної групи активність супероксиддисмутази зростає на 160,8 %. При цьому зростає у 1,5–2 рази активність усіх ізозимів крім S3. Активність глутатіонпероксидази зростала на 46,7 %, а каталази – на 31,6 % порівняно з контролем. За таких умов на 86,4 % підвищувалася розрахована активність КАТ2, але знижувалась на 28,3 % КАТ1. Вміст ТБК-активних продуктів був вищим за контроль на 177,0 %, однак на 76,9 % меншим за зна-

чення показника у тварин I дослідної групи. Зростання СОД/КАТ на 78,0 % у сім'яниках тварин II дослідній групі свідчить про високу продукцію супероксид аніону та зростання утилізації гідроген пероксиду глутатіонпероксидазою.

Виявлене зростання активності глутатіонпероксидази й вмісту ТБК-активних продуктів у тканині сім'яника I дослідної групи свідчить про нагромадження активних форм кисню (гідроген пероксиду та гідроксильного радикалу) і недостатню активність ензимів системи антиоксидантного захисту для знешкодження утворених цитотоксичних сполук кисню й зростання пероксидного окиснення ліпопротеїнових комплексів. Вказані зміни можуть призвести до ушкодження ДНК та мембран сперміїв, появи генетичних аномалій та зниження запліднювальної здатності чи безпліддя [Alvarez, 1983]. У тварин II дослідної групи активності супероксиддисмутази і каталази є вищими, що свідчать про стимулювання утворення не тільки пероксидів, але й супероксиданіону. А зниження вмісту ТБК-активних продуктів порівняно з I дослідною групою вказує на активацію системи антиоксидантного захисту, хоча й не достатню для повернення процесів ПОЛ до рівня контролю. Ймовірно, у сім'яниках таурин проявляє прооксидантні властивості. На відміну від результатів отриманих за перорального введення 40 та 100 мг/кг, доза 150 мг/кг таурину не змінювала вірогідно активність ензимів антиоксидантного захисту, тенденційно вищими були рухливість та кількість живих сперміїв і нижчим відсоток аномальних статевих клітин. Крім цього, таурин спричиняв часткове відновлення активності ензимів антиоксидантного захисту за одночасного введення прооксиданта доксорубіцину [52].

Отже, тривале пероральне введення таурину у сім'яниках обох дослідних груп приводить до зростання вмісту ТБК-активних продуктів. Однак у щурів I дослідної групи, зростає активність ГПО, а у II дослідній групі активність усіх ензимів антиоксидантного захисту.

Оскільки ГПО є єдиним ензимом антиоксидантного захисту, що знешкоджує гідроксильний аніон, а активність каталази є в межах норми, тобто вміст гідроген пероксиду є, ймовірно, у межах контролю, то логічно припустити, що збільшується концентрація гідроксильного аніону. Це в свою чергу спричиняє пошкодження мембран клітин та органел, і, в першу чергу, відображається у зниженні дихальних контролів, тобто в зменшенні спряження дихання з окисним фосфорилуванням. Іншим доказом ушкодження клітини є зниження вмісту КАТЗ, адже сумнівно, що за потужного оксидативного стресу клітина знижує сама вміст ізоциму, що забезпечує антиоксидантний захист. Пошкодження клітинних мембран призводить до некрозу та апоптозу і це відображається у зниженні відносної маси сім'яників. При цьому, відновлення тканини потребує енергії, однак зниження кількості гемоглобіну у крові приводить до початкової стадії гіпоксії, що виражається у сім'яниках збільшенням активності ізоциму ЛДГ5, що відповідає за синтез лактату. Для того щоб компенсувати збільшення вмісту лактату зростає активність ЛДГ1, проте загальна рівновага між піруват- і лактатпродукуючими ізоцимами на зсувається у бік зростання останніх.

Зовсім інша ситуація спостерігається у тварин II дослідної групи, відбувається зростання вмісту ТБК-активних продуктів і усіх ензимів антиоксидантного захисту. Припускаємо, що зростає уже не концентрація гідроксильного аніону, а супероксид аніону. Це може відбуватись через зареєстроване нами зростання інтенсивності дихання (у стані V_3), а крім цього і можливе збільшення активності оксидазних ензимів. Зростання в свою чергу інтенсивності дихання і його спряження з окисним фосфорилуванням можна пояснити збільшенням Ca^{2+} -входу у клітину і зростанням його депонування у мітохондрії [72]. Клітина має захищатись від інтенсифікації пероксидного окиснення, і можливо, коли активність ензимів антиоксидантного захисту є на максимумі, а зростання активних форм кисню продовжується, то обмежуються окисні процеси у клітині. Оскільки одним з важелів управління окисними процесами є ЛДГ, то, можливо,

зростання лактатпродукуючих ізозимів відбувається внаслідок намагання клітини обмежити окисні процеси і запобігти ушкодженню.

Результати цих досліджень опубліковані у:

1. Остапів Р.Д. Інтенсивність дихання мітохондрій та окисне фосфорилування у різних тканинах щурів за перорального введення таурину / Р.Д. Остапів, В.В. Манько // Фізіол. журн. – 2015. – Т. 61. – С. 103–112.
2. Ostapiv R.D. Activity and izozyme content of lactate dehydrogenase in different rat tissues at per oral taurine injection / R.D. Ostapiv, S.L. Humenyuk, V.V. Manko // Ukr. Biochem. J. – 2015. – Vol. 87 (N 4). – P. 54–62.
3. Ostapiv R.D. Antioxidant defense of rat organism at long-term per oral taurine injection / R.D. Ostapiv, V.V. Manko // Studia Biologica. – Vol. 9. – P. 59–70.
4. Остапів Р.Д. Інтенсивність дихання сперми та виживання сперміїв за додавання таурину у розрідженні еякуляти / Р.Д. Остапів, В.В. Манько, І.М. Яремчук, Д.Д. Остапів // Біологія тварин. – 2014. – Т. 16. – С. 110–116.
5. Ostapiv R.D. Effect of taurine administration on activity of superoxidedismutase in rat tissues / R.D. Ostapiv, V.V. Manko // The Animal Biology. – 2015. – Vol. 17. – P. 104–110.

3.4 Вплив тривалого введення таурину на енергетичне забезпечення стегнових м'язів щурів

3.4.1 Активність ензимів трансамінування та лактатдегідрогенази стегнових м'язів щурів

М'язи – тканина, що характеризується високим вмістом таурину, який підтримує ресинтез АТФ у цій тканині. Виявлено, що за нокауту специфічного транспортеру таурину, кількість мітохондрій у цій тканині і, відповідно, інтенсивність ресинтезу АТФ знижується у кілька разів. За високих концентрацій таурину у тканині знижується втома м'язів та їх пошкодження при навантаженнях [91].

За тривалого перорального введення таурину активність ензимів переамінування стегового м'язу була в межах контролю (табл. 3.15).

Таблиця 3.15

Вплив перорального введення таурину на активність ензимів стегового м'язу щурів (n=4–5; M±m)

Показник	Група тварин		
	Контроль	I (40 мг/кг)	II (100 мг/кг)
АСТ, мкмоль /хв ×мг протеїну	0,66±0,09	0,62±0,05	0,75±0,07
АЛТ, мкмоль /хв ×мг протеїну	0,83±0,08	0,71±0,04	0,88±0,03 ^{&}
Активність ЛДГ, мкмоль НАДН/(хв×мг протеїну)	1,09±0,39	3,58±0,91*	1,61±0,37 ^{&}

Примітки: I – перша дослідна група тварин (доза таурину – 40 мг/кг), II – друга дослідна група тварин (доза таурину – 100 мг/кг); * – статистично достовірна різниця між показниками тварин контрольної та I дослідної групи, [#] - контрольної та II дослідної групи [&] – I та II дослідних груп (один значок – з P < 0,05, два – з P < 0,01 три – з P < 0,001)

Загальна активність лактатдегідрогенази стегнового м'язу тварин I дослідної групи зросла у більш як три рази порівняно до контролю, а у II дослідній групі не відрізнялась від значень у контрольній групі. При цьому, не мінялась рівновага між лактат- та піруватпродукуючими ізозимами (рис. 3.13).

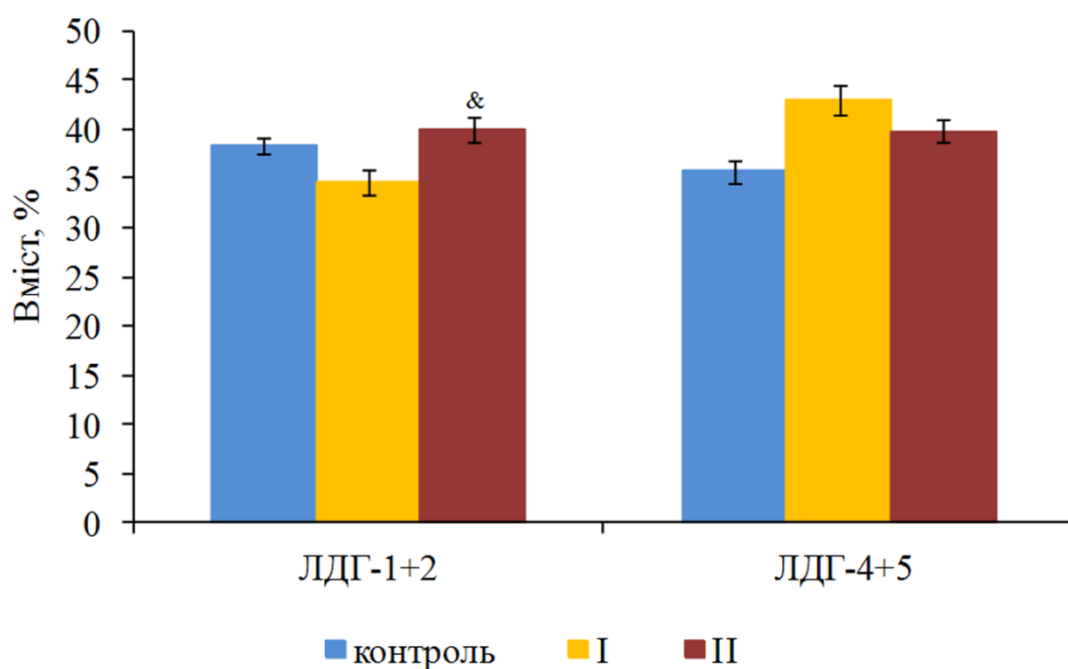


Рис. 3.13. Суми відсоткового вмісту ізозимів лактатдегідрогенази стегнового м'язу контрольної, I (40 мг/кг) та II (100 мг/кг) дослідних груп, які характеризують ступінь аеробного (ЛДГ1+ЛДГ2) та анаеробного (ЛДГ4+ЛДГ5) метаболізму; n = 4: & – статистично достовірна різниця між показниками тварин I та II дослідних груп з $P < 0,05$

У цьому випадку таурин спричиняє збільшення синтезу усіх ізоформ ензиму – і тих, які відповідають за утворення пірувату, і тих, які продукують лактат (табл. 3.16).

Таблиця 3.16

Вплив перорального введення таурину дозами 40 (I) та 100 (II) мг/кг на активність ізозимів лактатдегідрогенази сім'яників щурів (n=4; M±m)

Група тварин	Ізозими				
	ЛДГ1	ЛДГ2	ЛДГ3	ЛДГ4	ЛДГ5
Контроль	0,14±0,02	0,16±0,02	0,21±0,04	0,28±0,06	0,010±0,001
I	0,44±0,08**	0,55±0,09**	0,64±0,11*	0,91±0,20*	0,36±0,10*
II	0,26±0,05	0,27±0,06 ^{&}	0,25±0,04 ^{&&}	0,39±0,09	0,13±0,03 ^{##^б}

Примітки: I – перша дослідна група тварин (доза таурину – 40 мг/кг), II – друга дослідна група тварин (доза таурину – 100 мг/кг); * – статистично достовірна різниця між показниками тварин контрольної та I дослідної групи, [#] – контрольної та II дослідної групи [&] – I та II дослідних груп (один значок – з P < 0,05, два – з P < 0,01 три – з P < 0,001)

Однак, зростання ЛДГ4 і ЛДГ5 є більш вираженими, що вказує на неможливість утилізації всього пірувату у тканині м'язів. Такий стан виникає за нестачі у м'язах кисню, а утворений лактат транспотується кров'ю в печінку, де перетворюється в піруват [91]. У м'язах тварин II дослідної групи статистично достовірно зростає лише активність ЛДГ5, хоча її вклад у сумарну ензиматичну активність залишається низьким. Це теж вказує на інтенсифікацію процесів гліколізу у м'язових волокнах тварин II дослідної групи. Інтенсифікація утворення лактату може привести до зниження інтенсивності споживання кисню мітохондріями, оскільки піруват перетворюється у лактат.

Отже, за перорального введення таурину тваринам I дослідної групи зростає сумарна активність ЛДГ у стегнових м'язах. Це спричинене зростанням розрахованої активності усіх ізозимів ЛДГ. У тварин II дослідної групи, хоча і значення сумарної активності ЛДГ не відрізняються від контролю, однак відбувається зростання розрахованої активності ЛДГ5.

3.4.2. Інтенсивність дихання мітохондрій стегнових м'язів піддослідних тварин

Зростання активності ЛДГ5 у стегнових м'язах тварин I дослідної групи може спричинити зниження вмісту пірувату, відповідно і притоку відновних еквівалентів у дихальний ланцюг мітохондрій. І дійсно, тривале введення таурину тваринам I дослідної групи знижувало інтенсивність споживання кисню мітохондріями стегнового м'яза за ендогенного дихання на 43,5% (рис. 3.14).

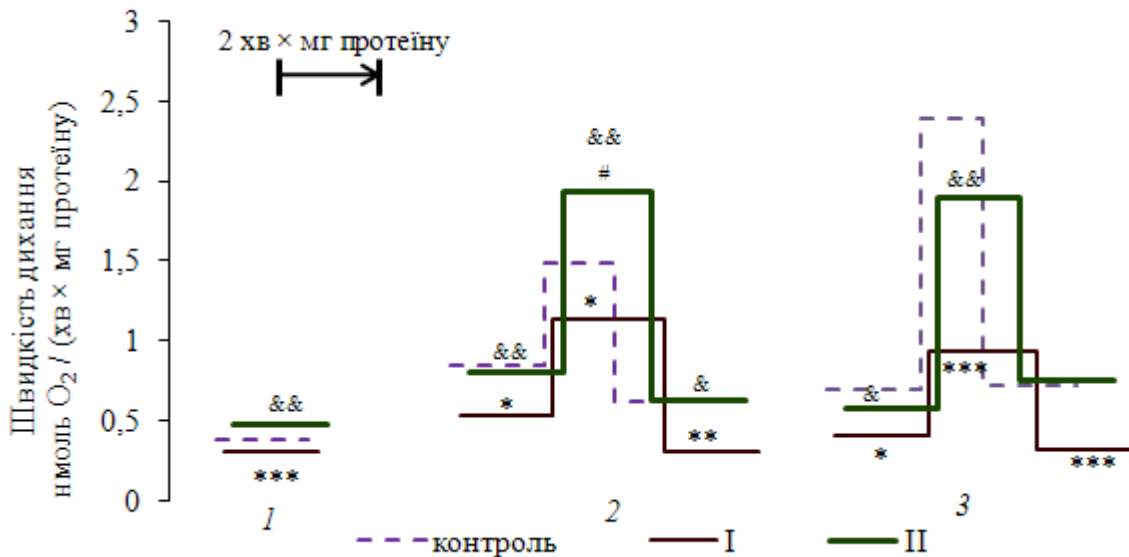


Рис. 3.14. Вплив тривалого введення таурину дозами 40 (I) та 100 (II) мг/кг на інтенсивність дихання мітохондрій стегнових м'язів за окиснення: ендогенних субстратів (1), α -кетоглутарату (2) і сукцинату(3); n=3–5: * – статистично достовірна різниця між показниками тварин контрольної та I дослідної групи, # – контрольної та II дослідної групи & – I та II дослідних груп (один значок – з $P < 0,05$, два – з $P < 0,01$ три – з $P < 0,001$).

За окиснення α -кетоглутарату швидкості споживання кисню V_4^S , V_3 та у I дослідній групі були на 41,4–60,9 % нижчі за контроль. При цьому, у тканині стегнового м'яза не було зафіксовано різниці у ДК за Ларді та Чансом в обох дослідних групах порівняно до контролю (табл. 3.17).

Таблиця 3.17

Показники споживання кисню мітохондріями стегнового м'язу щурів та окисного фосфорилування за окиснення екзогенних α -кетоглутарату та сукцинату ($M \pm m$)

Показники	Контроль, n = 3	За введення таурину	
		I, n = 5 (40 мг/кг)	II, n = 3 (100 мг/кг)
за окиснення α -кетоглутарату			
Дихальний контроль за Ларді, в.о.	1,74±0,07	2,16±0,15	2,51±0,34
Дихальний контроль за Чансом, в.о.	2,43±0,16	3,74±0,43	3,20±0,40
АДФ/О, мкмоль АДФ/нмоль O ₂	3,29±0,39	3,15±0,34	3,16±0,68
за окиснення сукцинату			
Дихальний контроль за Ларді, в.о.	3,31±0,38	2,40±0,38	3,31±0,57
Дихальний контроль за Чансом, в.о.	3,48±0,26	3,00±0,25	2,60±0,23
АДФ/О, мкмоль АДФ/нмоль O ₂	2,46±0,52	2,44±0,55	2,29±0,67

За окиснення сукцинату мітохондріями м'язів I дослідної групи спостерігалась подібна залежність. При цьому, найвиваженіше знижувалась швидкість дихання V_3 – на 23,7 %. Швидкість V_4^S , V_3 та у м'язах II дослідної групи були на рівні контролю. У обох дослідних групах вірогідно не змінились ДК за Ларді та Чансом.

Отже, за тривалого перорального введення таурину у мітохондрій стегнових м'язів тварин I знизилась інтенсивність дихання у всіх досліджуваних станах за Чансом, як за ендogenous дихання, так і за окиснення α -кетоглутарату та сукцинату. У тварин II дослідної групи за окиснення α -кетоглутарату зросла V_3 .

3.4.3. Активність ензимів антиоксидантного захисту стегнових м'язів підослідних тварин

Таурин є амінокислотою, що опосередковано підвищує активність ензиматичної ланки антиоксидантного захисту [91]. Зростання активності ензимів антиоксидантного захисту може бути результатом зростання процесів пероксидного окиснення ліпідів. За таких умов мембрана мітохондрій може пошкоджуватись і інтенсивність дихання знижується. Крім того, надмірна активація ензимів антиоксидантного захисту саме по собі призводить до зниження інтенсивності мітохондріального дихання.

І дійсно, зниження інтенсивності дихання мітохондрій стегового м'язу у тварин I дослідної групи відбулось внаслідок інтенсифікації процесів пероксидного окиснення ліпідів, оскільки зростав на 66,7 % вміст ТБК-активних продуктів (табл. 3.18).

Таблиця 3.18

Вплив таурину на активність ензимів антиоксидантного захисту стегового м'язу щурів ($M \pm m$)

Показники	Контроль, n = 3	За введення таурину	
		I, n = 5 (40 мг/кг)	II, n = 3 (100 мг/кг)
СОД, МО/мг протеїну	0,70±0,27	1,11±0,34*	0,97±0,13 [#]
ГПО, мкмоль GSH/хв×мг протеїну	0,20±0,02	0,32±0,02***	0,31±0,01 ^{###}
КАТ, мкмоль H ₂ O ₂ /хв×мг протеїну	0,47±0,04	0,61±0,09*	0,61±0,07 [#]
Г-6-ФДГ, нмоль НАДФ/хв×мг протеїну	0,55±0,02	1,75±0,18*	1,44±0,25 [#]
Вміст ТБК, мкмоль/мг протеїну	0,08±0,02	0,24±0,07**	0,15±0,05 ^{##&}
АОЗ/ТБК, в.о.	0,66±0,05	0,63±0,09	1,23±0,32
СОД/КАТ, в.о	1,24±0,07	1,33±0,09	1,60±0,13
ГПО/КАТ, в.о	0,43±0,01	0,55±0,03*	0,50±0,02

Примітки: I – перша дослідна група тварин (доза таурину – 40 мг/кг), II – друга дослідна група тварин (доза таурину – 100 мг/кг); * – статистично достовірні різниця між показниками тварин контрольної та I дослідної

групи, [#] - контрольної та II дослідної групи & – I та II дослідних груп (один значок – з P < 0,05, два – з P < 0,01 три – з P < 0,001)

Подібні, але менш виражені зміни спостерігались і у тварин II дослідної групи, де вміст продуктів пероксидного окиснення ліпідів був на 46,7 % вищий за контроль. Зростання вмісту вільних радикалів окиснену у стегновому м'язі тварин I дослідної групи активує всю ензиматичну ланку антиоксидантного захисту. Активність супероксиддисмутази у дослідних групах зростає на 36,9 та 27,8%. При цьому, у тварин обох дослідних груп зростала розрахована активність позаклітинного S5 (на 123,9 та 116,4 %) та цитоплазматичного S1 (26,9 та 58,3 %) ізозимів (табл. 3.19)

Таблиця 3.19

Вплив таурину на активність ізозимів СОД (МО/мг протеїну) та КАТ (мкмоль Н₂О₂/хв×мг протеїну) у стегового м'язу щурів (M±m)

Ензим	Ізозими та їх порядковий номер		Активність ізозимів		
			Контроль, n = 3	Дослід	
				I, n = 5 (40 мг/кг)	II, n = 3 (100 мг/кг)
СОД	Cu,Zn-E-SOD	S5	0,067±0,005	0,150±0,015**	0,145±0,012 ^{###}
	Mn-SOD	S4	0,088±0,007	0,081±0,012	0,104±0,007
	Cu,Zn-SOD	S3	0,049±0,009	0,066±0,003	0,086±0,006
		S2	1,090±0,093	1,335±0,179	1,291±0,032
		S1	0,156±0,020	0,198±0,029**	0,247±0,012 ^{##}
КАТ	КАТ1		0,132±0,005	0,162±0,011	0,150±0,005 [#]
	КАТ2		0,270±0,011	0,381±0,038*	0,387±0,037 [#]
	КАТ3		0,070±0,008	0,044±0,008*	0,073±0,001

Примітки: I – перша дослідна група тварин (доза таурину – 40 мг/кг), II – друга дослідна група тварин (доза таурину – 100 мг/кг); * – статистично достовірною різницею між показниками тварин контрольної та I дослідної групи, [#] – контрольної та II дослідної групи (один значок – з P < 0,05, два – з P < 0,01 три – з P < 0,001)

Активність глутатіонпероксидази у обох дослідних групах була вищою на 37,5 та 34,5 %, ніж у контролі. Подібна тенденція виявлена і за дослідження сумарної активності каталази – величина показнику дослідних груп однаково вища (на 22,9%) порівняно з контрольною групою тварин. За таких умов у стегновому м'язі тварин I дослідної групи зростала на 41,1 % розрахована активність КАТ2, проте КАТ3 знижувалась на 37,1 % порівняно з контролем. У тварин II дослідної групи розраховані активності КАТ1 та КАТ2 були на 13,6 та 41,2 % вищі, ніж у контролі. У тварин I та II дослідних груп у 2–3 рази зростала активність глюкозо-6-фосфатдегідрогенази. У тварин I дослідної групи зростає на 27,9 % величина відношення ГПО/КАТ, що вказує на збільшення ролі глутатіонпероксидази у утилізації гідроген пероксиду, або зростанню вмісту гідроксильного аніону.

Відсутність чи нестача таурину у м'язах призводить до мітохондріальних захворювань та оксидативного стресу [148]. Однак, виходячи з наших досліджень, надлишок сполуки також негативно впливає на антиоксидантний захист тканини. У скелетних м'язах щурів дослідних груп активність ензимів антиоксидантного захисту зростає, порівняно з контролем. При чому, в тварин II дослідної вміст ТБК-активних продуктів менший, ніж у тварин I дослідної групи. Порівняно з цим, у тканині м'язів щурів, яких випоювали 3% водним розчином таурину, зростав вміст ТБК-активних продуктів [53]. Такі дані говорять про дозозалежну дію таурину, що вочевидь реалізується різними механізмами.

Отже, нами зареєстроване зростання ензимів антиоксидантного захисту у стегнових м'язах обох дослідних груп, однак при цьому, зростає і інтенсивність процесів пероксидного окиснення.

Підсумок

Встановлено, що тривале пероральне введення таурину приводить до зростання сумарної активності ЛДГ та розрахованої активності усієї її ізоформ у стегнових м'язів тварин I дослідної групи. При цьому знижується інтенсивність

споживання кисню мітохондріями у всіх станах за Чансом у тварин I дослідної групи, а активність ензимів антиоксидантного захисту та процеси пероксидного окиснення ліпідів зростають.

У стегнових м'язах тварин II дослідної групи відбувається перерозподіл ізозимів ЛДГ зі збільшенням ЛДГ5. При цьому зростає V_3 , однак і збільшується інтенсивність процесів пероксидного окиснення ліпідів та активність системи антиоксидантного захисту.

Таким чином, зростання рівня пероксидного окиснення ліпідів у стегновому м'язі щурів I дослідної групи приводить до збільшення активності ензиматичної ланки антиоксидантного захисту (рис. 3.15).

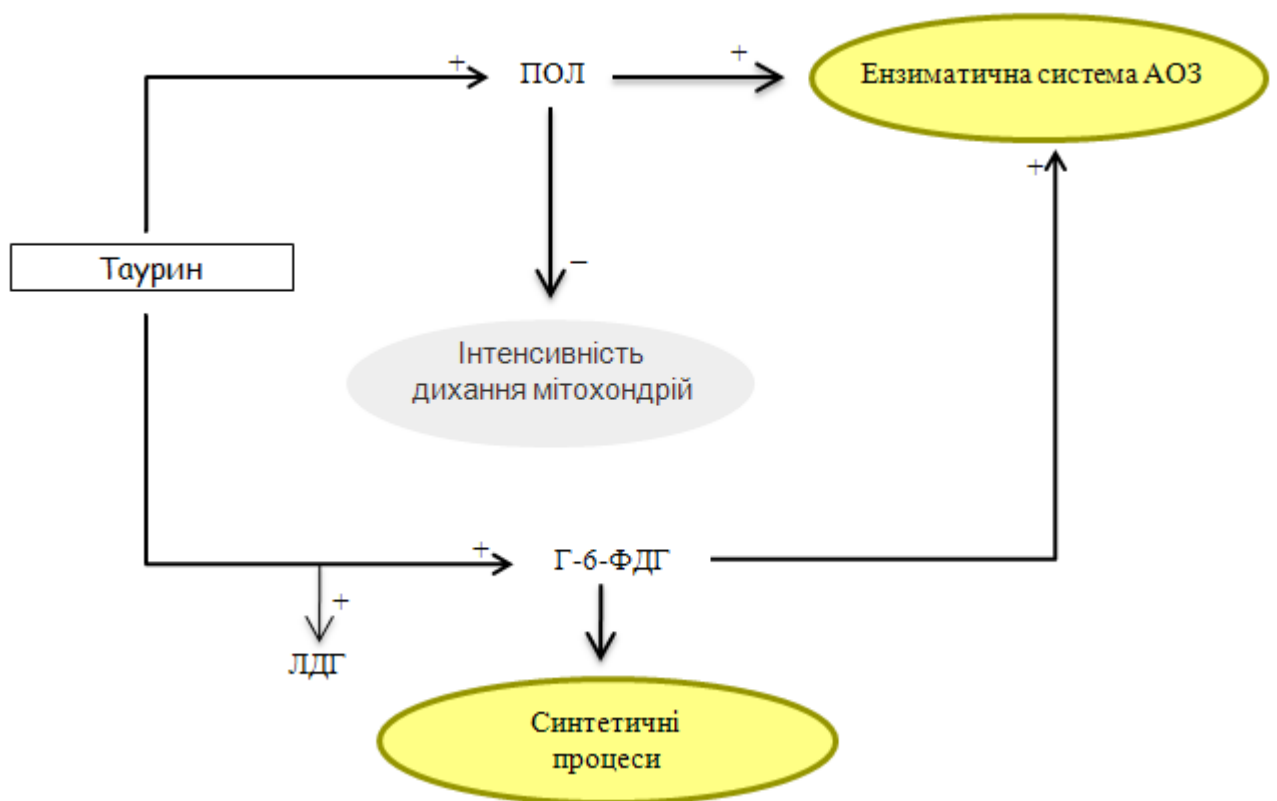


Рис. 3.15. Енергетичні процеси у стегновому м'язі щурів за тривалого перорального введення таурину

Однак, її активність є не достатньою для утилізації активних форм оксигену. Вільні радикали оксигену ушкоджують клітинні мембрани та органели, можливо через це інтенсивність дихання мітохондрій є на низькому рівні. Для підтримки дихання мітохондрій зростає активність ЛДГ і, відповідно, зростає притік пірувату у цикл Кребса, і НАДН та ФАДН₂ у дихальний ланцюг, і якщо б такого не було, то інтенсивність дихання мітохондрій була б нижчою.

Подібна ситуація спостерігається у II дослідній групі, проте інтенсивність пероксидного окиснення є меншою, судячи по вмісту ТБК-активних продуктів. При цьому, швидкість споживання кисню V_3 є вищою як за контроль, так і за I дослідну групу. Така різниця показує дозозалежний вплив таурину і свідчить про можливий позитивний вплив на синтез АТФ, та мембранний потенціал мітохондрій. Про це свідчить тенденційне збільшення дихальних контролів за Чансом і Ларді.

Результати цих досліджень опубліковані у:

1. Остапів Р.Д. Інтенсивність дихання мітохондрій та окисне фосфорилування у різних тканинах щурів за перорального введення таурину / Р.Д. Остапів, В.В. Манько // Фізіол. журн. – 2015. – Т. 61. – С. 103–112.
2. Ostapiv R.D. Activity and izozyme content of lactate dehydrogenase in different rat tissues at per oral taurine injection / R.D. Ostapiv, S.L. Humenyuk, V.V. Manko // Ukr. Biochem. J. – 2015. – Vol. 87 (N 4). – P. 54–62.
3. Ostapiv R.D. Antioxidant defense of rat organism at long-term per oral taurine injection / R.D. Ostapiv, V.V. Manko // Studia Biologica. – Vol. 9. – P. 59–70.
4. Ostapiv R.D. Effect of taurine administration on activity of superoxidodismutase in rat tissues / R.D. Ostapiv, V.V. Manko // The Animal Biology. – 2015. – Vol. 17. – P. 104–110.

3.5. Адаптивні процеси у печінці щурів за високих доз таурину

3.5.1. Маркерні ензими функціонування печінки

Оскільки печінка – центральний орган білкового, ліпідного та вуглеводневого обмінів, і у ній відбувається утилізація таурину, то необхідно було дослідити вплив тривалого введення цієї сполуки функціональні маркери. Виявлено, що у печінці тварин I дослідної групи активність аланінамінотрансферази знижувалась на 20 %, а у тварин II дослідної групи це зменшення не досягло першого рівня достовірності (табл. 3.20). При цьому активність аспартатамінотрансферази залишається у межах контролю у тварин обох дослідних груп.

Таблиця 3.20

Вплив перорального введення таурину на активність ензимів печінки щурів (n=4–5; M±m)

Показник	Група тварин		
	Контроль	I (40 мг/кг)	II (100 мг/кг)
АСТ, мкмоль /хв ×мг протеїну	0,33±0,04	0,34±0,03	0,30±0,03
АЛТ, мкмоль /хв ×мг протеїну	0,45±0,01	0,36±0,02*	0,40±0,03
Активність ЛДГ, мкмоль НАДН/(хв×мг протеїну)	0,83±0,07	1,41±0,27	1,20±0,12 [#]

Примітки: I – перша дослідна група тварин (доза таурину – 40 мг/кг), II – друга дослідна група тварин (доза таурину – 100 мг/кг); * – статистично достовірною різницею між показниками тварин контрольної та I дослідної групи, [#] – контрольної та II дослідної групи & – I та II дослідних груп (один значок – з P < 0,05, два – з P < 0,01 три – з P < 0,001)

Для аланінамінотрансферази необхідним субстратом є аланін, а оскільки таурин конкурує з цією амінокислотою за транспорт у клітину [76], то варто припустити, що з збільшенням вмісту таурину у органах і тканинах, концентрація аланіну, як і активність аланінамінотрансферази знижується.

Загальна активність лактатдегідрогенази у печінці тварин I дослідної групи проявляла тенденцію до зростання. У тварин II дослідної групи це збільшення було вірогідним і становило 45% порівняно з контролем. При цьому, у тканині печінки у тварин обох дослідних груп сума відсоткового вмісту ізозимів ЛДГ1 та ЛДГ2 за дії таурину збільшилася, що може свідчити про збільшення утворення пірувату (рис. 3.16).

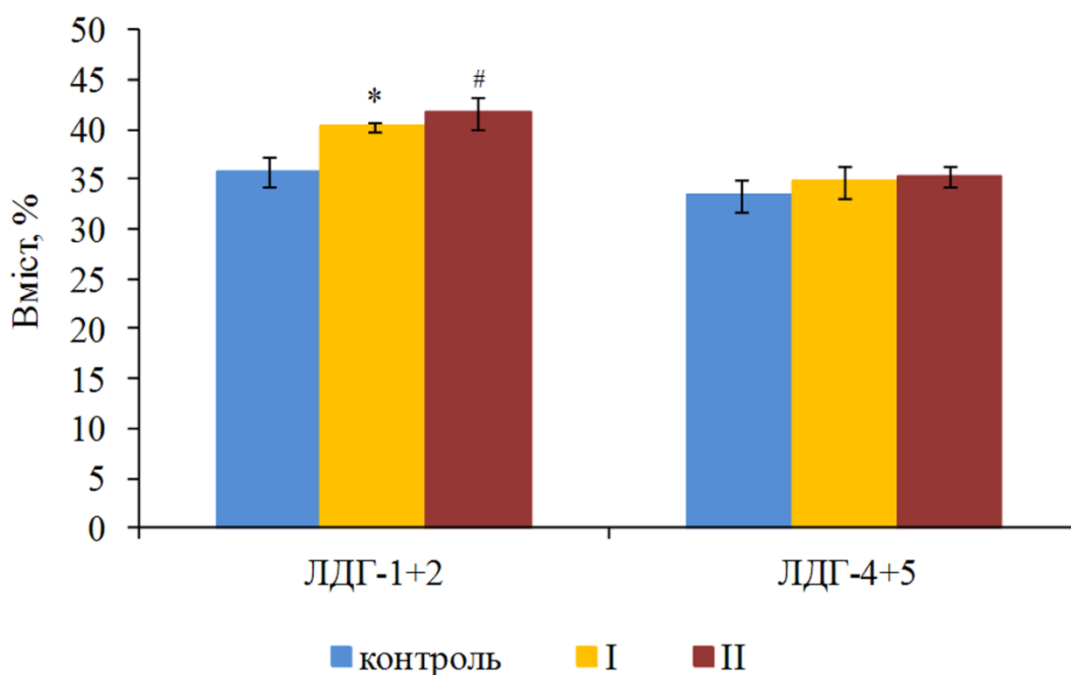


Рис. 3.16 Суми відсоткового вмісту ізозимів лактатдегідрогенази печінки контрольної, I (40 мг/кг) та II (100 мг/кг) дослідних груп, які характеризують ступінь аеробного (ЛДГ1+ЛДГ2) та анаеробного (ЛДГ4+ЛДГ5) метаболізму: * – статистично достовірна різниця між показниками тварин контрольної та I дослідної групи, # - контрольної та II дослідної групи (один значок – з $P < 0,05$, два – з $P < 0,01$ три – з $P < 0,001$)

Найбільшу спорідненість до пірувату має ЛДГ1, активність якого у обох дослідних групах зросла на 73 та 113 % відповідно (табл. 3.21).

Таблиця 3.21

Вплив тривалого введення таурину дозами 40 (I) та 100 мг/кг (II) на активність ізозимів лактатдегідрогенази (мкмоль НАДН / (хв × мг протеїну) у печінці щурів (n=4; M±m)

Група тварин	Ізозими				
	ЛДГ1	ЛДГ2	ЛДГ3	ЛДГ4	ЛДГ5
Контроль	0,15±0,01	0,17±0,01	0,27±0,02	0,25±0,02	0,040±0,002
I	0,26±0,03*	0,21±0,02	0,29±0,05	0,27±0,03	0,13±0,01***
II	0,32±0,03 ^{##}	0,20±0,03	0,29±0,03	0,27±0,04	0,18±0,01 ^{###&&}

Примітки: I – перша дослідна група тварин (доза таурину – 40 мг/кг), II – друга дослідна група тварин (доза таурину – 100 мг/кг); * – статистично достовірна різниця між показниками тварин контрольної та I дослідної групи, # - контрольної та II дослідної групи & – I та II дослідних груп (один значок – з P < 0,05, два – з P < 0,01 три – з P < 0,001)

Це свідчить про інтенсифікацію у гепатоцитах перетворення лактату у піруват і, відтак, інтенсифікацію окисних процесів. Поряд з тим суттєво зросла у печінці тварин I та II дослідних груп і розрахована активність ЛДГ5 – на 225 та 350 % відповідно. Проте навіть таке збільшення активності ЛДГ5 суттєво не вплинуло на співвідношення між піруват- та лактатпродукуючими ізозимами лактатдегідрогенази.

Відомо, що таурин здатен знижувати концентрацію глюкози в крові, збільшувати використання тканинами глюкози, підвищення активності ензимів гліколізу та загальної лактатдегідрогеназної активності у печінці [37]. Збіль-

шення розрахованої активності ЛДГ5 є адаптаційною реакцією на надмірну кількість лактату у печінці, що надходить з інших тканин.

Отже, тривале пероральне введення таурину призводить до зниження активності аланінамінотрансферази у печінці I дослідної групи. У щурів II дослідної групи зростає активність ЛДГ, при цьому у обох групах збільшується вміст піруватпродукуючих ізозимів.

3.5.2. Інтенсивність дихання мітохондрій печінки за тривалого введення таурину

Зростання піруватпродукуючих ізозимів ЛДГ приводило до збільшення кількості пірувату, а це до інтенсифікації як ендogenousного дихання мітохондрій печінки –78,9 та 47,7 % у тварин I та II дослідних груп відповідно (рис. 3.17).

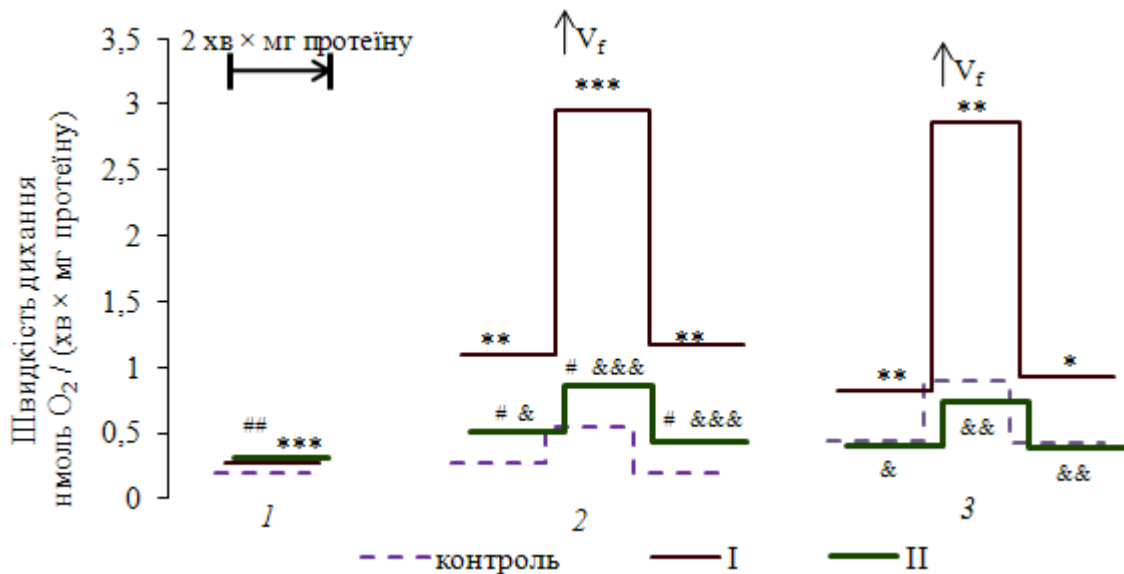


Рис. 3.17. Вплив тривалого введення таурину дозами 40 (I) та 100 (II) мг/кг на швидкість дихання та фосфорилування мітохондрій печінки за окиснення: ендogenousних субстратів (1), α-кетоглутарату (2) і сукцинату(3); n=3–5: * – статистично достовірна різниця між показниками тварин контрольної та I дослідної групи, # – контрольної та II дослідної групи & – I та

II дослідних груп (один значок – з $P < 0,05$, два – з $P < 0,01$ три – з $P < 0,001$)

За окиснення α -кетоглутарату швидкості споживання кисню V_4^S , V_3 , та V_f у I дослідній групі зросли у 4–7 разів порівняно з контролем. Подібна тенденція (з менш вираженими змінами) виявлена у II дослідній групі, де інтенсивність споживання кисню була вищою на 57–126 % порівняно контролем. ДК за Ларді у тварин I дослідної групи був на 24,0 % вищим, а у II дослідній групі – на 17,2 % нижчим, ніж у контролі (табл. 3.22). Якщо зростання ДК у I дослідній групі було пов'язано із збільшенням V_3 , то зниження у II дослідній групі – із збільшенням V_4^S .

Таблиця 3.22

Показники споживання кисню мітохондріями печінки щурів та окисного фосфорилування за окиснення екзогенних α -кетоглутарату та сукцинату, ($M \pm m$)

Показники	Контроль, n = 3	За введення таурину	
		I, n = 5 (40 мг/кг)	II, n = 3 (100 мг/кг)
за окиснення α -кетоглутарату			
Дихальний контроль за Ларді, в.о.	2,05±0,14	2,54±0,23*	1,70±0,02 ^{#&&}
Дихальний контроль за Чансом, в.о.	3,14±0,61	2,54±0,16	1,96±0,15 ^{&}
АДФ/О, мкмоль АДФ/нмоль О ₂ , в.о.	3,38±0,30	2,90±0,50	3,29±0,27
за окиснення сукцинату			
Дихальний контроль за Ларді, в.о.	2,18±0,14	3,70±0,57*	1,79±0,08 ^{&}
Дихальний контроль за Чансом, в.о.	2,03±0,12	3,12±0,36*	2,00±0,12
АДФ/О, мкмоль АДФ/нмоль О ₂ , в.о.	2,35±0,53	2,14±0,50	2,49±0,51

Примітки: I – перша дослідна група тварин (доза таурину – 40 мг/кг), II – друга дослідна група тварин (доза таурину – 100 мг/кг); * – статистично достовірна різниця між показниками тварин контрольної та I дослідної групи, [#] – контрольної та II дослідної групи [&] – I та II дослідних груп (один значок – з $P < 0,05$, два – з $P < 0,01$ три – з $P < 0,001$)

За активації сукцинатзалежного шляху окиснення у мітохондріях печінки тварин I дослідної групи спостерігали аналогічні зміни, однак інтенсифікація дихання була менш вираженою. Споживання кисню мітохондріями печінки тварин II дослідної групи за цих умов було у межах похибки середнього арифметичного. У I дослідній групі ДК за Ларді зріс на 42,3 %, а за Чансом – на 82,6 % порівняно з контролем, через збільшення АДФ-стимульованого дихання. У мітохондріях II дослідної групи тварин ДК за Ларді виявився нижчим, ніж у тварин контрольної та I дослідної груп (табл. 3.25).

Ймовірно, що такий результат впливу таурину на інтенсивність дихання мітохондрій є впливом декількох чинників. Зокрема відомо, що таурин спричинює збільшення вмісту Ca^{2+} у мітохондріях [47]. Оскільки α -кетоглутаратдегідрогеназа є Ca^{2+} -залежним ензимом [9], то зростання вмісту іонів приведе до інтенсифікації окиснення α -кетоглутарату, що постерігається у мітохондріях печінки тварин II дослідної групи. Проте це не пояснює збільшення споживання кисню за додавання сукцинату у I дослідній групі. Більш вірогідно, збільшення інтенсивності дихання мітохондрій у печінці тварин I дослідної групи є результатом зростання концентрації пірувату, синтезованого ЛДГ1 та ЛДГ2. Крім цього, зміни у диханні мітохондрій печінки можуть бути результатом інтенсифікації синтезу білків дихального ланцюга. Це підтверджують дані досліджень, у яких встановлено, що таурин входить до складу мтРНК [148]. Більше того, у дослідженнях на культурах клітин виявлено, що надлишок таурину в середовищі спричиняє інтенсифікацію синтезу компонентів електронтранспортного ланцюга. Це приводить до підвищення синтезу АТФ і збільшення мембранного потенціалу мітохондрій [148].

Отже, за тривалого перорального введення таурину зростала швидкість дихання мітохондрій печінки за окиснення ендогенних субстратів та α -кетоглутарату у всіх станах за Чансом у обох дослідних груп. Інтенсивність споживання кисню за окиснення сукцинату була вищою за контроль у тварин I дослідної групи.

3.5.3. Активність ензимів антиоксидантного захисту печінки піддослідних тварин

Зростання інтенсивності дихання може привести до до збільшення активності ензимів антиоксидантного захисту для кращого захисту від активних форм кисню, які продукує дихальний ланцюг мітохондрій. У тканині печінки тварин I дослідної групи активність супероксидисмутази підвищується на 52,5 %, а у щурів II дослідної групи величина значення показника знаходиться на рівні контрольних значень (табл. 3.23).

Таблиця 3.23

Вплив таурину на активність ензимів антиоксидантного захисту печінки щурів (M±m)

Показники	Конт- роль, n = 3	За введення таурину	
		I, n = 5 (40 мг/кг)	II, n = 3 (100 мг/кг)
СОД, М.О./мг протеїну	0,59±0,12	0,90±0,18*	0,54±0,10 ^{&}
ГПО, мкмоль GSH/хв×мг протеїну	0,12±0,02	0,18±0,02**	0,21±0,01 ^{###&&}
КАТ, мкмоль Н ₂ О ₂ /хв×мг протеїну	0,26±0,02	0,38±0,04**	0,39±0,02 ^{##}
Г-6-ФДГ, нмоль НАДФ/хв×мг протеїну	1,04±0,04	1,53±0,11*	1,18±0,10
Вміст ТБК, мкмоль/мг протеїну	0,07±0,01	0,14±0,03**	0,17±0,02 ^{##}
АОЗ/ТБК, в.о.	0,07±0,01	0,12±0,03	0,08±0,01
СОД/КАТ, в.о	0,63±0,04	0,55±0,02	0,39±0,06 [#]
ГПО/КАТ, в.о	0,46±0,02	0,44±0,01	0,53±0,01 ^{#&}

Примітки: I – перша дослідна група тварин (доза таурину – 40 мг/кг), II – друга дослідна група тварин (доза таурину – 100 мг/кг); * – статистично достовірні різниці між показниками тварин контрольної та I дослідної групи, [#] – контрольної та II дослідної групи [&] – I та II дослідних груп (один значок – з P < 0,05, два – з P < 0,01 три – з P < 0,001)

Зростання активності СОД у тварин I дослідній групі призводить до збільшенню розрахованої активності позаклітинного ізозиму S5 майже у п'ять разів, цитоплазматичного ізозиму S2 – на 66,7 % (табл. 3.27).

Таблиця 3.24

Вплив таурину на активність ізозимів СОД (МО/мг протеїну) та КАТ (мкмоль H_2O_2 /хв×мг протеїну) у печінці щурів ($M \pm m$)

Ензим	Ізозими та їх порядковий номер		Активність ізозимів		
			Контроль, n = 3	Дослід	
				I, n = 5 (40 мг/кг)	II, n = 5 (100 мг/кг)
СОД	Cu,Zn-E-SOD	S5	0,013±0,002	0,064±0,008***	0,037±0,010
	Mn-SOD	S4	0,014±0,003	0,018±0,006	0,020±0,004
	Cu,Zn-SOD	S3	0,033±0,005	0,045±0,028	0,020±0,004 ^{&}
		S2	0,258±0,021	0,430±0,008**	0,314±0,020 ^{&}
		S1	0,276±0,032	0,279±0,013	0,146±0,011 ^{#&&&}
КАТ	КАТ1		0,070±0,006	0,117±0,010**	0,108±0,008 ^{###}
	КАТ2		0,158±0,012	0,223±0,025**	0,227±0,008 ^{###}
	КАТ3		0,028±0,002	0,057±0,005**	0,058±0,004 ^{###}

Примітки: I – перша дослідна група тварин (доза таурину – 40 мг/кг), II – друга дослідна група тварин (доза таурину – 100 мг/кг); * – статистично достовірна різниця між показниками тварин контрольної та I дослідної групи, # - контрольної та II дослідної групи & – I та II дослідних груп (один значок – з $P < 0,05$, два – з $P < 0,01$ три – з $P < 0,001$)

У печінці тварин II дослідної групи знижувалась на 47,1 % активність ізозиму S1, що може свідчити про зниження захисту від супероксид аніону у цитоплазмі печінки щурів.

Активність глутатіонпероксидази у тканині печінки обох дослідних груп зростає пропорційно дозі таурину – відповідно на 50,0 та 75,0 % порівняно до контролю. Аналогічно, активність каталази у I та II дослідних групах тварин вища на 46,2 та 50,0 %, ніж у контролі.

Виявлено, що зростання загальної активності каталази у печінці обох дослідних груп спричинено збільшенням розрахованої активності усіх ізозимів:

КАТ1 на – 67,1 та 54,3 %; КАТ2 на 41,1 та 43,7 %; КАТ3 – на 103,6 та 107,1%. Тобто найвище зростання спричинене цитоплазматичними ізозимами каталази.

У тварин I дослідної групи зростає на 47,1 % активність глюкозо-6-фосфатдегідрогенази. Це може вказувати на необхідність у швидкому відновленні глутатіону, і про стан помірного оксидативного стресу [5]. Незважаючи на підвищення активності ензимів антиоксидантного захисту, у тканині печінки тварин I та II дослідних груп на 100,0 та 142,8 % відповідно зростав вміст ТБК-активних продуктів. Відношення АОЗ/ТБК не змінюється у печінці тварин обох дослідних груп. Зниження на 38,1% відношення СОД/КАТ у тварин II дослідної групи вказує, що клітини печінки намагаються протидіяти великій кількості H_2O_2 , а зростання на 15,2% відношення ГПО/КАТ можливо вказує й на збільшену продукцію гідроксильних аніонів.

Отриманий результат свідчить, що таурин у тканині печінки, не залежно від дози, викликає оксидативний стрес, який частково компенсується зростаючою активністю ензимів антиоксидантного захисту у тварин I дослідної групи. Однак, якщо у I дослідній групі активація пероксидного окиснення ліпідів викликане зростанням окисного метаболізму, то печінка щурів II дослідної групи піддається впливу надлишкового надходження таурину в організм що, ймовірно, призводить до різкого підвищення процесів пероксидного окиснення ліпідів і нагромадження H_2O_2 та HO^\cdot . Своєю чергою, надлишок гідроген пероксиду та гідроксильного аніону гальмує активність СОД [6], а активність ГПО і КАТ вищі не тільки порівняно з контролем, але й з I дослідною групою. Оскільки, ензимами антиоксидантного захисту не в змозі утилізувати надлишок утворених активних форм кисню, зростає пероксидне окиснення ліпідів і підвищується вміст кінцевих продуктів їх окиснення (ТБК-активних продуктів).

Отже, за тривалого перорального введення таурину у тварин обох дослідних груп зростала активність каталази та глутатіонпероксидази та збільшувалась інтенсивність процесів пероксидного окиснення ліпідів. При цьому у I дослідній групі зростала й активність супероксиддисмутази.

Підсумок

Нашими дослідженнями встановлено, що тривале пероральне введення таурину призводить до зниження активності аланінамінотрансферази у печінці I дослідної групи. У щурів II дослідної групи зростає активність ЛДГ, при цьому у обох групах збільшується вміст піруватпродукуючих ізозимів. У обох дослідних групах зростала швидкість дихання мітохондрій печінки за окиснення ендогенних субстратів та α -кетоглутарату у всіх станах за Чансом. Інтенсивність споживання кисню за окиснення сукцинату була вищою за контроль у тварин I дослідної групи. У тварин обох дослідних груп зростала активність каталази та глутатіонпероксидази та збільшувалась інтенсивність процесів пероксидного окиснення ліпідів. При цьому у I дослідній групі зростала й активність супероксиддисмутази.

Таким чином, пероральне введення таурину у I дослідній групі приводило до збільшення загальної активності ЛДГ за рахунок кисень-залежних ізозимів. Зростання концентрації пірувату спричиняло пришвидшення інтенсивності відновлення НАД, про що свідчить у 2-3 рази вища інтенсивність дихання мітохондрій. Таке збільшення приводило до збільшення продукції активних форм оксигену. Однак зростання активності ензимів АОЗ був недостатнім для утилізації цих сполук, тому збільшувався вміст ТБК-активних продуктів. І тканинах печінки зазнавала ушкоджень, про що говорить зростання ЛДГ5. Хоча можливо це – адаптаційна реакція до великої концентрації пірувату. (рис. 3.18).

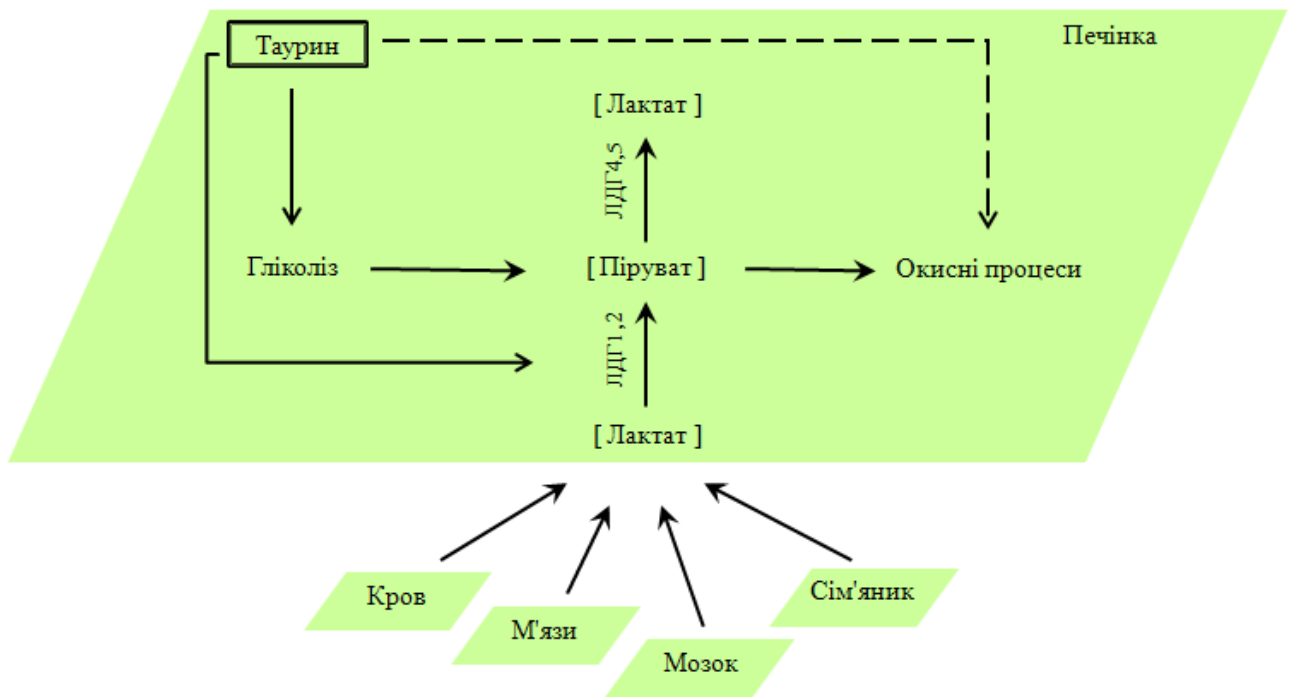


Рис. 3.18. Вплив тривалого перорального введення таурину на енергетичні процеси у печінці щурів.

Зменшувалась активність аланінамінотрансферази, можливо внаслідок нестачі субстрату, адже аланін – конкурент таурину за транспорт в клітину, і за зростання концентрації одного знижується вміст іншого [72].

У печінці тварин II дослідної групи, незважаючи на зростання загальної активності ЛДГ і вмісту кисень-залежних ізозимів, інтенсивність дихання збільшувалась тільки за додавання α -кетоглутарату, однак знижувався дихальний контроль за Ларді, що може опосередковано вказувати на зниження продукції АТФ, внаслідок можливого ушкодження мембран мітохондрій. Можливо такий стан виник внаслідок зростання процесів пероксидного окиснення ліпідів. Про це говорить зростання вмісту ТБК-активних продуктів. Проте, якщо у печінці I дослідної групи таке зростання відбувалось за рахунок інтенсифікації метаболізму, то тут за рахунок реакцій пероксидації (тобто зростання вмісту H_2O_2), про що свідчить збільшення активності каталази та глутатіонпероксидази. Про по-

шкодження тканини печінки говорить і збільшення кількості п'ятого ізоциму ЛДГ.

Який механізм зростання пероксидного окиснення у печінці II дослідної групи? Це питання залишається відкритим, оскільки необхідно дослідити активність пероксидаз. Як і питання, чому зростання кисень-залежних ізоцимів ЛДГ не приводило до зростання інтенсивності дихання мітохондрій. Припускаємо, що піруват задіяний не в процесах окиснення, а в синтезі необхідних амінокислот та глюкози. Механізмом спрямування пірувату на гліюконеогенез та утворення жирних кислот та амінокислот можуть служити процеси вільно радикального окиснення. Оскільки дихальний ланцюг мітохондрій є одним з продуцентів активних форм кисню, і клітинам не вигідне додаткове утворення цих цитотоксичних сполук. Тому піруват використовується, як субстрат для синтезу глюкози, або жирних та амінокислот.

Результати цих досліджень опубліковані у:

1. Остапів Р.Д. Інтенсивність дихання мітохондрій та окисне фосфорилування у різних тканинах щурів за перорального введення таурину / Р.Д. Остапів, В.В. Манько // Фізіол. журн. – 2015. – Т. 61. – С. 103–112.
2. Ostapiv R.D. Activity and izozyme content of lactate dehydrogenase in different rat tissues at per oral taurine injection / R.D. Ostapiv, S.L. Humenyuk, V.V. Manko // Ukr. Biochem. J. – 2015. – Vol. 87 (N 4). – P. 54–62.
3. Ostapiv R.D. Antioxidant defense of rat organism at long-term per oral taurine injection / R.D. Ostapiv, V.V. Manko // Studia Biologica. – Vol. 9. – P. 59–70.
4. Ostapiv R.D. Effect of taurine administration on activity of superoxidodismutase in rat tissues / R.D. Ostapiv, V.V. Manko // The Animal Biology. – 2015. – Vol. 17. – P. 104–110

РОЗДІЛ 4. УЗАГАЛЬНЕННЯ

У дисертаційній роботі охарактеризовані енергетичні процеси у клітинах хребетних тварин за тривалого перорального введення таурину у дозах 40 та 100 мг/кг (відповідно, I та II дослідні групи тварин) та за інкубації еякулятів з цією сполукою. Встановлені нами факти змін фізіологічних показників крові та поведінкової активності підтверджують важливу роль таурину у енергетичному метаболізмі клітин тварин.

З'ясувалося, що у тварин I дослідної групи тривале пероральне введення таурину призводить до зниження вмісту гемоглобіну у одному еритроцитів, що компенсується зростанням кількості червоних кров'яних тілець. Такі дані можуть свідчити, про початок гіпоксії в організмі піддослідних тварин та реакцію-відповідь на неї. Відомо, що розвиток гіпоксії запускає низку процесів серед яких є активація транскрипційного фактора HIF-1 [151]. Раніше встановлено, що за тривалого введення таурину чи цинку зростає експресія HIF-1 [93], а це спричиняє активацію гемоглобін оксидази-1 (HO-1), яка бере участь у розщепленні гему [151]. Ці дані частково пояснюють отримані нами результати. При цьому, з даних літератури відомо, що збільшення активності HO-1 зумовлює посилення гіпоксії, і за рахунок цього зростає активність ензимів гліколізу [119]. Це веде до збільшення активності ЛДГ, що і пояснює результати наших досліджень (рис. 4.1).

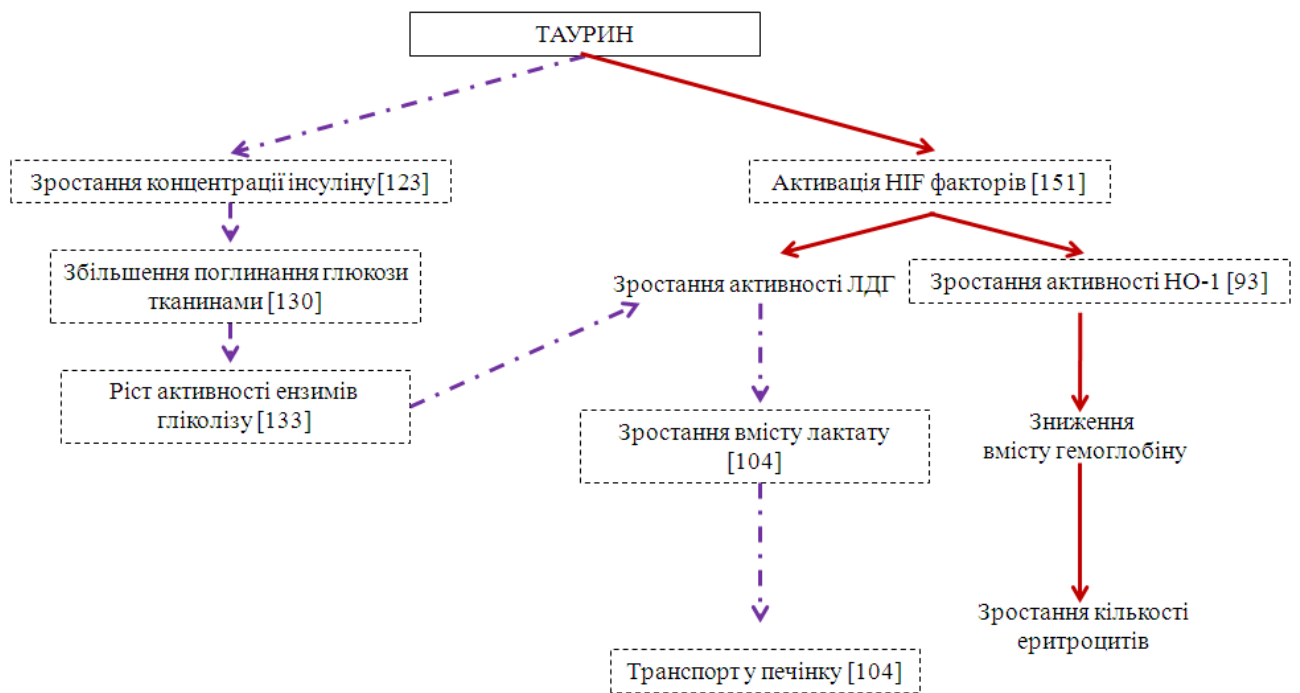


Рис. 4.1. Можливі механізми впливу таурину на енергетичні процеси у крові щурів: цілими стрілками позначений можливий вплив таурину дозою 40 мг/кг, стрілками з штриховою лінією – дозою 100 мг/кг, стрілками з штрихпунктирною – вплив таурину обох доз; у обведених штриховою лінією прямокутниках, наведені дані літератури

На активність ЛДГ впливає й інсулін, який спричиняє зростання поглинання тканинами глюкози, відповідно зростає активність ензимів гліколізу [174]. За даними джерел літератури за введення таурину зростає виділення інсуліну у кров [123]. При цьому, за збільшеної активності ензимів гліколізу зростає транскрипція генів ЛДГ [91]. Це підтверджує наші дані, у яких зростання загальної активності ЛДГ крові спричиняють усі ізоформи у обох дослідних групах. Однак, нами зареєстровано, що у крові щурів I дослідної групи співвідношення ізоформ змінюється у бік зростання вмісту лактатпродукуючих ізоформ, що викликано нестачею гемоглобіну у еритроцитах. У II дослідній групі зростають піруватпродукуючі ізоформи і, можна припустити, за високих доз таурину

фактор HIF-1 не задіяний. А також це може вказувати на збільшення вмісту лактату у крові і намагання зменшити його кількість.

Отже, пероральне введення таурину у тварин I дослідної групи спричиняє зниження гемоглобіну і, щоб компенсувати гіпоксичний стан, інтенсифікується еритропоез. Додатковим свідченням гіпоксичних процесів є зростання розрахованої активності ЛДГ4 та ЛДГ5 у тварин I дослідної групи. У II дослідній групі незважаючи на відсутність змін у кількості еритроцитів та вмісту гемоглобіну зростає вміст ЛДГ1 та ЛДГ2, що може вказувати на збільшення вмісту лактату у крові і намагання зменшити його кількість.

Розраховані активності ЛДГ4 та ЛДГ5 зростають не тільки у крові, але й у інших тканинах – мозку та сім'яниках, і це може бути спричинене впливом таурину на транскрипцію HIF-1 у тварин I дослідної групи. У мозку тварин цієї групи зростає розрахована активність лактатпродукуючих ізозимів ЛДГ (рис. 4.2).

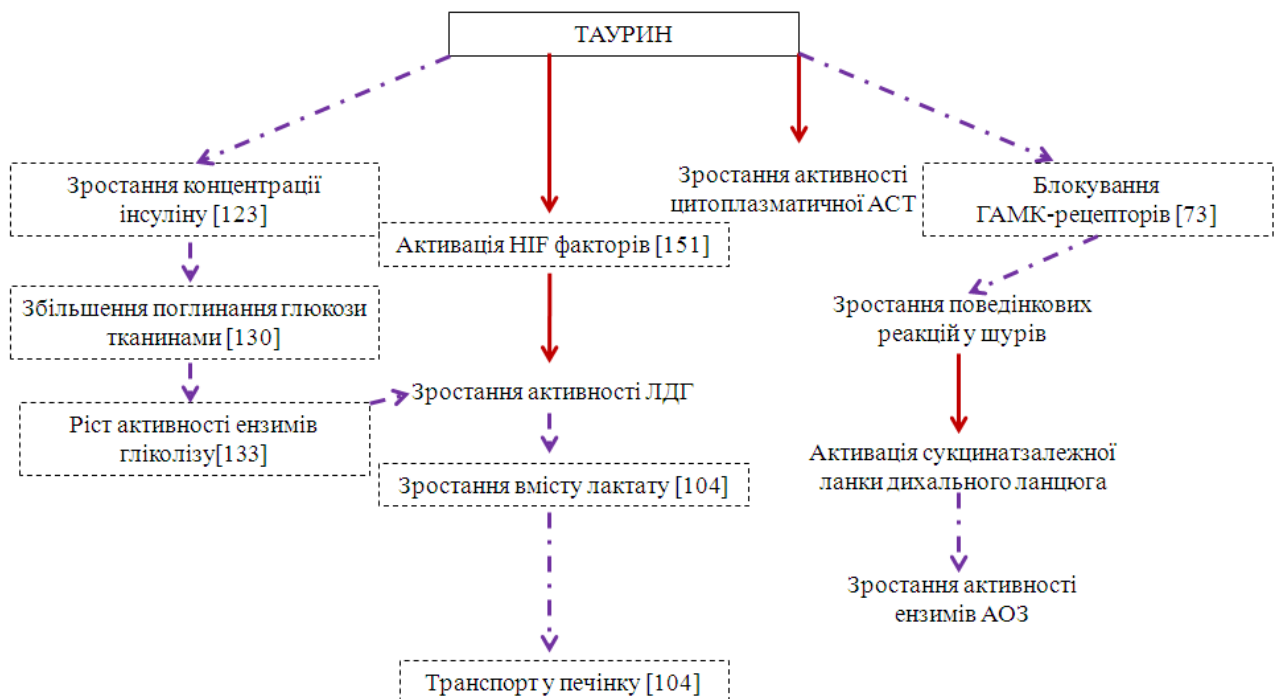


Рис. 4.2. Можливі механізми впливу таурину на енергетичні процеси у мозку щурів: цілими стрілками позначений можливий вплив таурину дозою 40

мг/кг, стрілками з штриховою лінією – дозою 100 мг/кг, стрілками з штрихпунктирною – вплив таурину обох доз; у обведених штриховою лінією прямокутниках, наведені дані літератури

Нашими дослідженнями встановлено, що у тканинах мозку щурів обох дослідних груп зростає активність ензимів глутатіонпероксидази та каталази. При цьому, активність супероксиддисмутази залишається на рівні контролю. Можливо, інтенсивність пероксидного окиснення ліпідів і підвищується, але це нівелюється ростом активності ензимів антиоксидантного захисту, оскільки вміст ТБК-активних продуктів залишається у межах контролю. З даних літератури відомо, що зростання антиоксидантного захисту може негативно впливати на інтенсивність дихання мітохондрій, знижуючи його [104]. Це підтверджується результатами наших досліджень, де у мозку тварин II дослідної групи знижується інтенсивність сукцинатзалежного дихання. Нашими дослідженнями встановлено зростання інтенсивності дихання мітохондрій мозку за додавання сукцинату у I дослідній групі. Це може бути спричинене потребою мозку у швидкій енергії або стресом і гіпоксією, оскільки сукцинатзалежний шлях активується за таких умов [9]. Відомо, що таурин підвищує діяльність нервової системи [91] і тому за його перорального введення зростає поведінкова активність тварин як у тварин I, так і II дослідної групи. Більша кількість поведінкових реакцій у I дослідній групі пояснюється зростанням цитоплазматичної АСТ ензима, що продукує глутамат – нейротрансмітер, що активує нервову систему [76].

Отже, тривале пероральне введення таурину приводить до зростання поведінкової активності піддослідних тварин, безпосередньо блокуючи ГАМК-рецептори і опосередковано збільшуючи активність цитоплазматичної АСТ. При цьому, зростання глутамату і активацію ним нервової системи, а також гіпоксичні умови створюють стрес, за якого активується сукцинатзалежна ланка дихального ланцюга та антиоксидантний захист.

З літературних даних відомо, що у тканині сім'яників, як і у мозку переважає гліколітичний тип використання субстратів [104], при цьому введення таурину підвищує активність ензимів гліколізу [123]. Це узгоджується з нашими даними, де тривале пероральне ведення таурину у сім'яниках тварин обох дослідних груп спричинює зростання загальної активності ЛДГ і розрахованої активності ізоимів ЛДГ4 та ЛДГ5. При цьому, інтенсивність процесів перексидного окиснення зростає у сім'яниках обох дослідних груп, але механізм виникнення ПОЛ за різних доз таурину відрізняється (рис. 4.3).

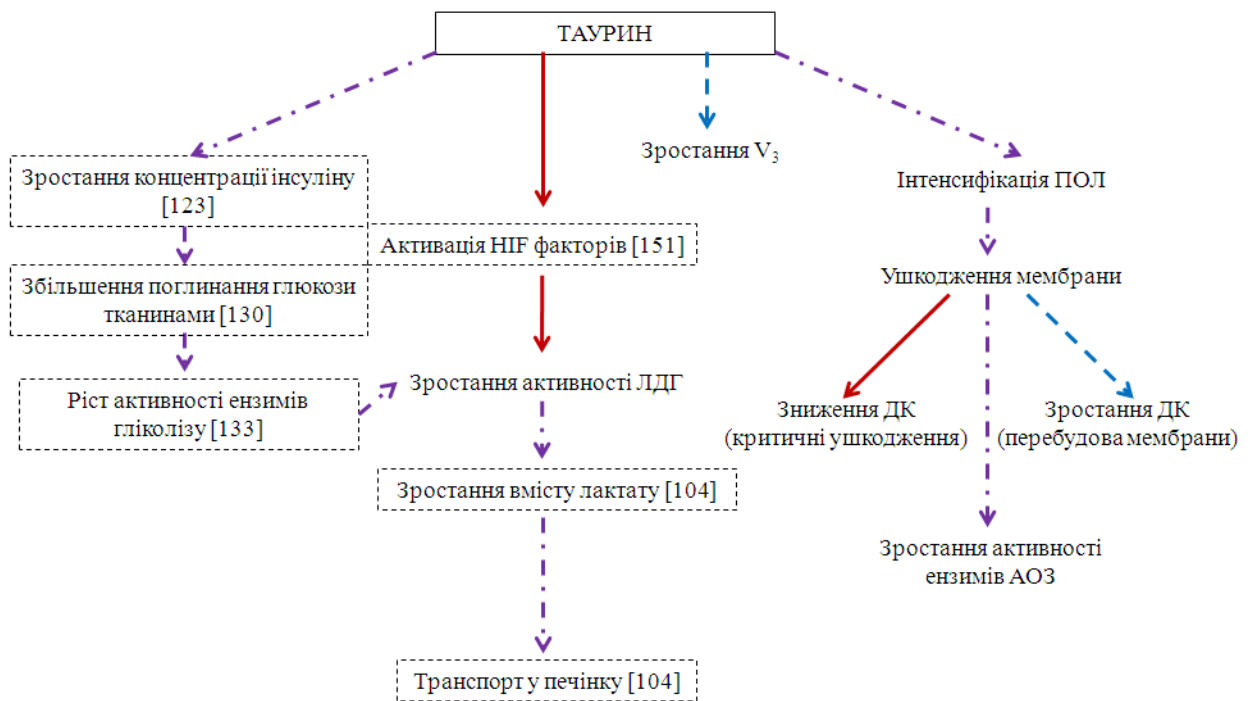


Рис. 4.3. Можливі механізми впливу таурину на енергетичні процеси у сім'яниках щурів: цілими стрілками позначений можливий вплив таурину дозою 40 мг/кг, стрілками з штриховою лінією – дозою 100 мг/кг, стрілками з штрих-пунктирною – вплив таурину обох доз; у обведених штриховою лінією прямокутниках, наведені дані літератури

У сім'яниках тварин I дослідної групи підвищується вміст ТБК-активних продуктів і активність глутатіонпероксидази, що вказує на зростання вмісту гі-

гидроксильного аніону, який переважно утворюється внаслідок взаємодії супероксид аніону з гідроген пероксидом за каталізації Fe^{2+} [59]. Однак, гідроксильний аніон може і утворюватись підчас синтезу тестостерону [59]. Тому, більш вірогідно, зростання процесів пероксидного окиснення спричинив підвищений синтез тестостерону. Згідно літературних даних, пероральне введення таурин дозами 20–50 мг/кг приводить до збільшення синтезу цього гормону [72]. Зростання процесів пероксидного окиснення ліпідів призводить до зниження дихальних контролів, і це свідчить про пошкодження мембрани мітохондрій [9]. Інтенсифікація процесів пероксидного окиснення у сім'яниках тварин II дослідної групи продиктоване збільшенням кількості супероксид аніону, основними продуцентами якого є дихальний ланцюг і оксидази. Нами зареєстровано, що інтенсивність дихання мітохондрій сім'яників тварин II дослідної групи зростає за додавання АДФ. Це вказує на збільшення активності АТФ-синтетази, і підтверджується літературними даними [148]. Проте мало ймовірно, що зростання V_3 є причиною інтенсифікації процесів пероксидного окиснення ліпідів і утворення супероксид аніону. Більш ймовірним є те, що таурин впливає на активність НАДФН-оксидази [115]. Зростання активності цього ензиму може приводити до збільшення супероксид аніону, а значить і до зростання активності супероксиддисмутази.

Нашими дослідженнями виявлено, що інтенсивність дихання еякулятів бугая знижується за дії таурину, однак ступінь зменшення залежить від складу розріджувача. Крім цього, за розрідження еякулятів різними середовищами змінюється і залежне від дози таурину та складу розріджувача виживання сперміїв бугая. Це вказує на різні механізми впливу таурину на енергетичне забезпечення сперміїв бугая. Зниження інтенсивності дихання може спричинити зростання активності ензимів антиоксидантного захисту під впливом таурину [91]. Високий рівень окисних процесів характерний для плазми сперми. Субстрати плазми сперми і розріджувача окиснюються вільними радикалами кисню [15]. Зниження цих процесів дає змогу продовжити збереження статевих клітин. Ан-

тиоксидантний ефект таурину тісно пов'язаний з його властивістю перебудовувати мембрани клітин, збільшуючи вміст насичених жирних кислот та метилюючи ненасичені [76]. Таким чином, мембрани стають стійкішими до дії активних форм кисню, а проникність мембран знижується. Тому можна прогнозувати зниження надходження субстратів у клітину. Крім цього, таурин здатний активувати ензими гліколізу [123] і, можливо, стимулювати утилізацію глюкози кисеньнезалежним шляхом. Однак, за таких умов клітина отримує менше енергії у вигляді АТФ і виживання клітин прогнозовано знижується.

Отже, пероральне введення таурину у тварин I дослідної групи спричиняє зростання рівня пероксидного окиснення ліпідів, яке негативно відображається на синтезі АТФ і роботі мітохондрій. У II дослідній групі зростання пероксидного окиснення ліпідів приводить до перебудови мембран клітини, у тому числі мітохондрій, і до посилення спряження між окисним фосфорилуванням і диханням мітохондрій. Додавання таурину до розрідженої сперми бугая знижує інтенсивність дихання із збільшенням концентрації. За додавання до еякулятів бугая розрідженими середовищем ФСБ таурин збільшує виживання спермій, а за розрідження Андромед, навпаки, знижує.

З даних літератури відомо, що у м'язах тварин активація транскрипційного фактора HIF-1 призводить до зниження інтенсивності мітохондріального дихання [104]. Це узгоджується з нашими результатами – у стегнових м'язах тварин I дослідної групи інтенсивність дихання мітохондрій знижується у всіх станках за Чансом. Відомо, що таурин активізує гліколітичні ензими [91], а це, в свою чергу, веде до зростання загальної активності ЛДГ, що продемонстровано нашими даними. З джерел літератури відомо, що гіпоксичні умови можуть слугувати причиною зростання процесів пероксидного окиснення ліпідів [149]. При цьому, зростає концентрація як супероксид аніону (зростає активність супероксиддисмутази), так і гідроген пероксиду та гідроксильного радикалу (зростають активності каталази і глутатіон пероксидази), що підтверджуються результатами наших досліджень (рис. 4.4).

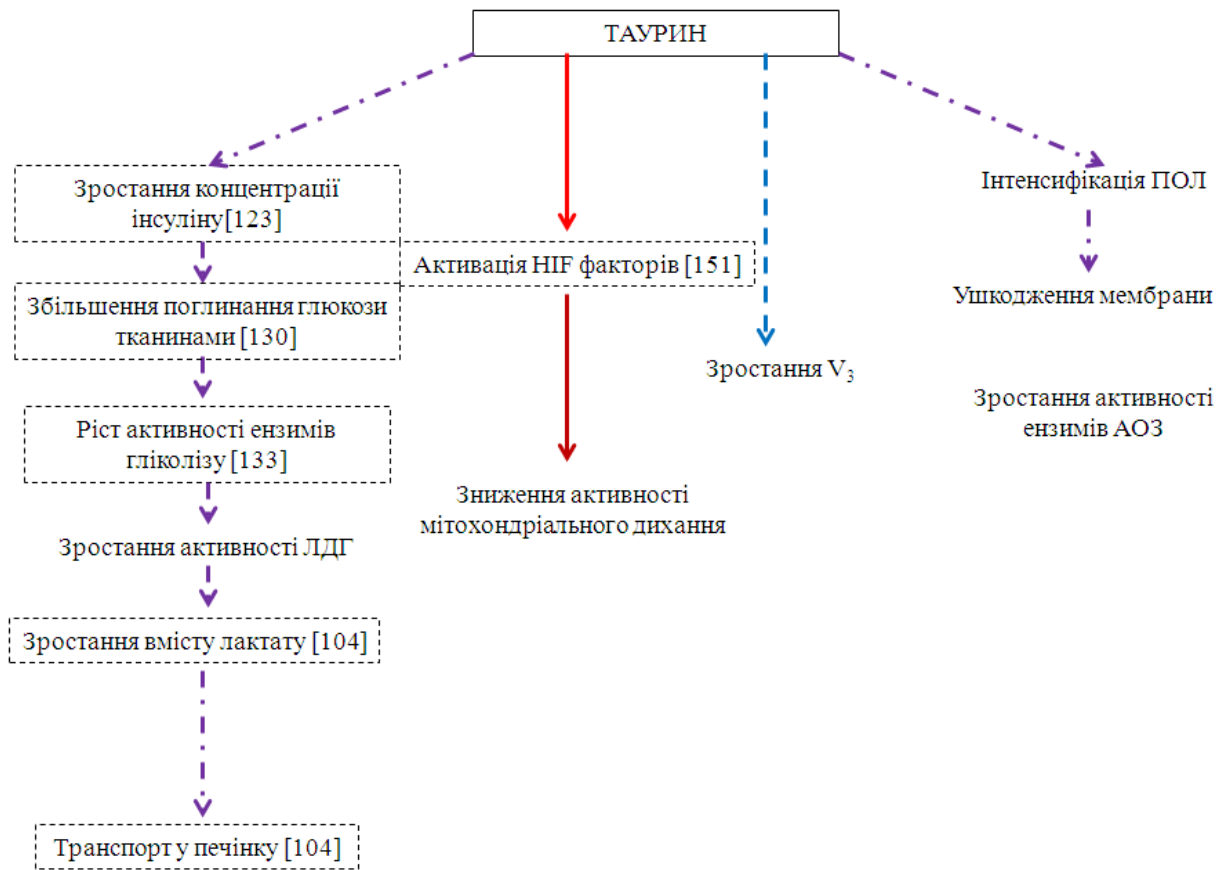


Рис. 4.4. Можливі механізми впливу таурину на енергетичні процеси у стегновому м'язі щурів: цілими стрілками позначений можливий вплив таурину дозою 40 мг/кг, стрілками з штриховою лінією – дозою 100 мг/кг, стрілками з штрих-пунктирною – вплив таурину обох доз; у обведених штриховою лінією прямокутниках, наведені дані літератури

Можливо, і сам таурин спричиняє зростання процесів пероксидного окиснення, адже у II дослідній групі за відсутності гіпоксії вміст продуктів пероксидного окиснення більший за контроль, хоча і менший за I дослідну групу. Як і у сім'яниках, у стегновому м'язі тварин II дослідної групи зросла активність споживання кисню за додавання АДФ, що може вказувати на зростання активності АТФ-синтетази.

Отже, у тварин I дослідної групи пероральне введення таурину змінює енергетичні процеси у стегновому м'язі: знижує мітохондріальне дихання та

інтенсифікує процеси перекисного окиснення. У II дослідній групі зміни вказують на можливе зростання активності АТФ-синтетази (зростання V_3), проте процеси перекисного окиснення ліпідів залишаються на високому рівні.

Лактат, що утворюється у мозку, сім'яниках та стегновому м'язі, постачається у печінку, де перетворюється у піруват і включається у цикл Кребса, гліюконеогенез та у цикл утворення жирних кислот [104]. З літературних даних відомо, що зростання вмісту лактату і його надходження активує транскрипцію гену LDHA [27], а це приводить до зростання вмісту ЛДГ1 та ЛДГ2 і зростанню перетворення лактату у піруват [85] (рис. 4.5.).

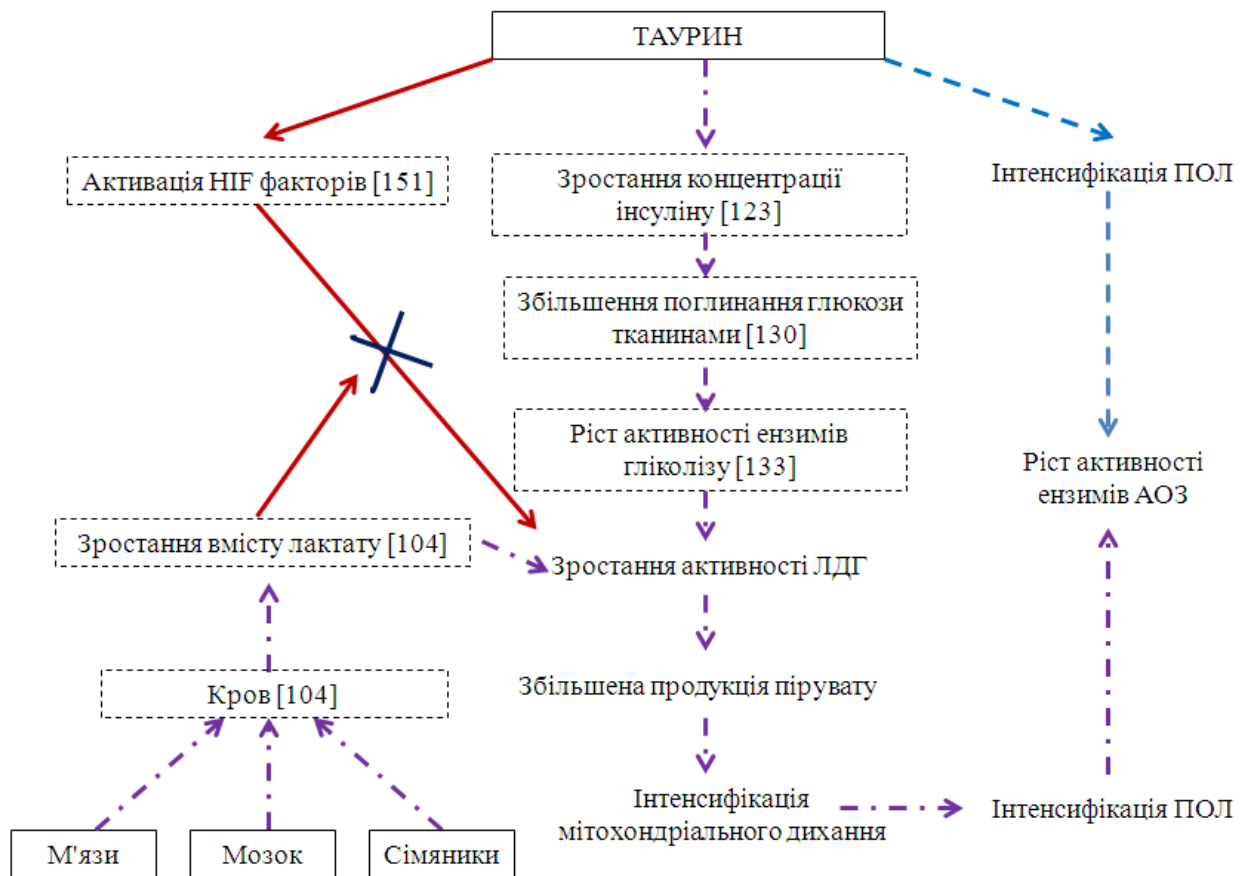


Рис. 4.5. Можливі механізми впливу таурину на енергетичні процеси у печінці щурів: цілими стрілками позначений можливий вплив таурину дозою 40 мг/кг, стрілками з штриховою лінією – дозою 100 мг/кг, стрілками з штрих-

пунктирною – вплив таурину обох доз; у обведених штриховою лінією прямокутниках, наведені дані літератури

При цьому, піруват не може поступати у глюконеогенез через зростання вмісту інсуліну [123], тому піруват вступає у цикл трикарбонових кислот, тим самим підвищуючи процеси окисного метаболізму – як мітохондріальне дихання, так і пероксидне окиснення ліпідів. Однак, якщо у печінці тварин I дослідної групи такі процеси пов'язані повністю зі зростанням мітохондрійного дихання, то у II дослідної групи перекисне окиснення ліпідів інтенсифікується іншим механізмом. Можливо, таурин активує вивільнення гідроген пероксиду, збільшуючи активність пероксидаз. На це вказує зростання активності глутатіонпероксидази та каталази. Таке зростання окисних процесів у печінці тварин II дослідної групи пошкоджує тканинину печінки, про що свідчить зростання коефіцієнта АСТ/АЛТ у печінці. Крім цього, відомо, що за високих рівнів пероксидного окиснення ліпідів знижується ефективність впливу інсуліну на тканини [20]. Тому ми припускаємо, що хоча рівень ЛДГ1 та ЛДГ2 ізозимів підвищується, піруват не поступає на окисні процеси (інтенсивність дихання у мітохондрій печінки тварин II дослідної групи набагато менша за I), а використовується у інших процесах, наприклад, глюконеогенезі, синтезі жирних кислот.

Отже, тривале пероральне введення таурину інтенсифікує окисні процеси у печінці тварин обох дослідних груп, однак якщо у I вони є відносно позитивними, то у II дослідній групі ці процеси несуть шкоду органу.

На основі отриманих результатів та даних джерел літератури пропонується схема впливу таурину на енергетичні процеси у клітинах тварин (рис. 4.6).

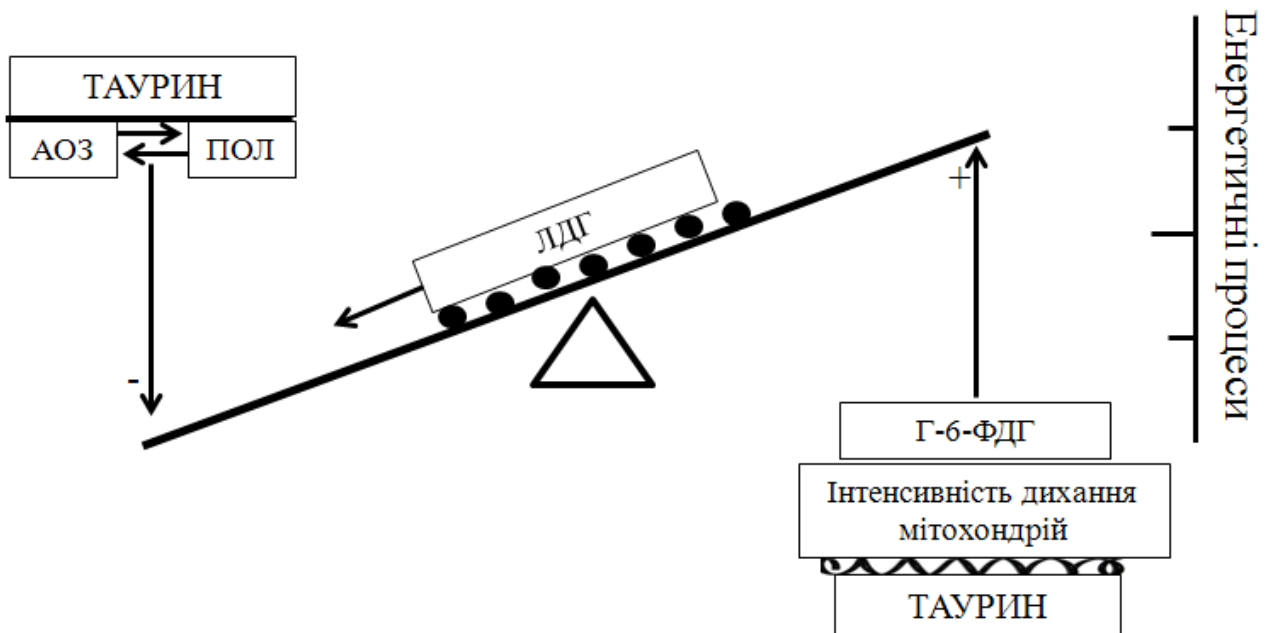


Рис. 4.6. Схема впливу таурину на енергетичні процеси у клітинах тварин

Тканини, що досліджувались можна поділити на ті в яких домінує окисний метаболізм (мозок і печінка) [9, 77], і ті, в яких переважає кисеньнезалежний метаболізм (стегові м'язи та сім'яники) [104, 159]. У печінці та мозку введення таурину дозою 40 мг/кг інтенсифікує енергетичні процеси, підвищуючи активність Г-6-ФДГ, ЛДГ, збільшуючи швидкість поглинання кисню та спряження окисного фосфорилування з диханням мітохондрій. На противагу цьому, у стегових м'язах та сім'яниках за такої ж дози таурину зміна перебігу енергетичних процесів проявляється зниженням інтенсивності дихання мітохондрій та спряження окисного фосфорилування з мітохондріальним диханням. Одночасно зростають активності Г-6-ФДГ та лактатпродукуючі ізоформи ЛДГ. Такі зміни у м'язах стегна та сім'яниках можуть бути спричинені зростанням процесів пероксидного окиснення, які пригнічують кисеньзалежні процеси. Для компенсації зниження продукції енергії та запобігання ще більшій інтенсифікації процесів пероксидного окиснення зростають лактатпродукуючі ізоформи ЛДГ. Більша доза таурину (100 мг/кг) у цих же тканинах, навпаки, приводить до зростання енергетичних процесів (збільшення активності ЛДГ, Г-6-ФДГ, інтенсивності

споживання кисню (V_3) та спряження дихання з окисним фосфорилуванням). А у печінці та мозку знижуються інтенсивність дихання та дихальні контролі за Чансом і Ларді. Крім цього у печінці інтенсифікуються процеси пероксидного окиснення ліпідів, що вражають орган, про що говорить збільшення відношення АСТ/АЛТ порівняно з нормою. Встановлені неоднозначні зміни інтенсивності енергетичних процесів у окремих органах і тканинах організму тварин зумовлює дозозалежні зміни поведінкової активності, маси органів і показників крові й, в загальному, фізіологічного стану тварин.

ВИСНОВКИ

У дисертаційній роботі на основі аналізу змін в організмі щурів доведено неоднозначний вплив таурину, який вводили перорально протягом 28 діб, на масу тіла та органів, показники крові, активності лактатдегідрогенази й ензимів системи антиоксидантного захисту та їх ізозимів, ензимів переамінування, інтенсивність споживання кисню мітохондріями різних органів і тканин, та зроблено наступні висновки:

1. У крові тварин 28-добове пероральне введення таурину у дозі 40 мг/кг маси тіла викликає гіпоксичні процеси, які частково компенсуються зростанням кількості еритроцитів. Збільшення активності піруватпродукуючих ізозимів ЛДГ у крові за введення таурину у дозі 100 мг/кг маси тіла свідчить про зростання транспорту лактату у печінку, а збільшення відношення АСТ/АЛТ – про ураження печінки надлишком таурину.
2. У мозку тварин тривале пероральне введення таурину спричиняє зростання поведінкової активності, при чому у тварин I дослідної групи ефект суттєвіший через зростання синтезу глутамату цитоплазматичною аспаратамінотрансферазою. У тварин обох дослідних груп зростає активність ензимів АОЗ та ЛДГ. Однак у I дослідній групі сукцинатзалежний шлях активується, а у тварин II дослідної групи, навпаки, знижується.
3. У сім'яниках тварин тривале пероральне введення таурину спричиняє зростання вмісту ТБК-активних продуктів, активації ензиматичної ланки антиоксидантного захисту та синтезу лактату. У тварин I дослідної групи знижується ДК за Чансом, що свідчить про знижене спряження дихання з окисним фосфорилуванням, а у тварин II дослідної групи, навпаки, зростає.
4. У стегновому м'язі тварин обох дослідних груп зростає активність ензимів антиоксидантного захисту. Причиною цього є збільшення інтенсивності процесів пероксидного окиснення ліпідів. У тварин I дослідної групи знижується мітохондріальне дихання, однак зростає активність лактатдегідрогена-

зи. У тварин II дослідної групи інтенсивність АДФ-стимульованого дихання мітохондрій зростає.

5. У печінці тварин обох дослідних груп введення таурину спричиняє збільшення синтезу пірувату і, в свою чергу, зростання мітохондріального дихання. Збільшення останнього приводить до зростання вмісту ТБК-активних продуктів та активації ензиматичної ланки антиоксидантного захисту.
6. У організмі обох дослідних груп тривале пероральне введення таурину спричиняє зростання перебігу енергетичних процесів у тканинах, зокрема інтенсифікації окисного метаболізму у печінці та зростанні активності ЛДГ у м'язах стегна, сім'янику та головному мозку.
7. Поряд зі зростанням енергетичного метаболізму тривале пероральне введення таурину спричиняє інтенсифікацію процесів пероксидного окиснення ліпідів, що не компенсується підвищенням активності ензимів антиоксидантного захисту. Як наслідок, клітинні мембрани досліджуваних тканин та органів щурів, крім головного мозку, пошкоджуються, про що свідчить збільшення вмісту ТБК-активних продуктів у цих тканинах та відношення АСТ/АЛТ у плазмі крові.

СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ

1. Влізло В. В. Спосіб підрахунку живих сперміїв в еякулятах бугаїв / В. В. Влізло, Д. Д. Остапів // Аграрна наука – виробництву. – К., 2003. – № 3. – С. 24.
2. Влізло В. В. Лабораторна діагностика у ветеринарній медицині: довідник / В. В. Влізло, І. А. Максимович, В. Л. Галяс, М. І. Леньо. – Львів, 2008. – С. 6–13.
3. Грінченко О.А. Роль оксиду азоту і таурину у регуляції секреторної функції шлунка собак / О.А. Грінченко, П.І. Янчук // Фізіол. журн. – 2012. – Т.58. – С. 48–56.
4. Деркач М. П. Курс варіаційної статистики / М. П. Деркач, Р. Я. Гумецький, М. Є. Чабан. – Київ: Вища школа, 1977. – 210 с.
5. Доліба М.М. Механізм реципрокної дії ацетилхоліну на окислення альфа-кетоглутарату і сукцинату у мітохондріях серця і печінки. Фактори, що впливають на виявлення ефекту ацетилхоліну / М.М. Доліба, М.З. Ватаманюк, Д. Марван, І.В. Шостаковська [та ін.] // Укр. біохім. журн. – 1994. – Вип. 66. – С.41–49.
6. Дубинина Е. Е. Активность и изоензимный спектр СОД эритроцитов / Е. Е. Дубинина, Л. Я. Сальникова, Л. Ф. Ефимова // Лаб. дело. – 1983. – № 10. – С. 30–33.
7. Іккерт О.В. Вплив L-аргініну та N^w-нітро-L-аргініну на функціональний стан ізольованих мітохондрій печінки щурів з різною резистентністю до гіпоксії / О.В. Іккерт, Н.М. Кургалюк, С.К. Гордій, М.О. Гальків // Вісник проблем біології і медицини. – 2000. – Вип. 5–6. – С. 17–20.

8. Камышников В. С. Справочник по клинико-биохимическим исследованиям и лабораторной диагностике / В. С. Камышников. – Москва: МЕДпресс-информ, 2004. – С. 152–300.
9. Кондрашова М.Н. Трансаминазный цикл окисления субстратов в клетке, как механизм адаптации к гипоксии / М.Н. Кондрашова // Фармакологическая коррекция гипоксических состояний. – 1987. – Т. 1 – С. 51–70.
10. Корабейникова С. Н. Модификация определения ПОЛ в реакции с ТБК / С. Н. Корабейникова // Лаб. дело. – 1989. – № 7. – С. 8–10.
11. Королюк М. А. Метод определения активности каталазы / М. А. Королюк, Л. И. Иванова, И. Г. Майорова, В. Е. Токарев // Лаб. дело. – 1983. – № 10. – С. 16–18.
12. Левченко В. І. Ветеринарна клінічна біохімія / В. І. Левченко, В. В. Влізло, І. П. Кондрахін та ін.; За ред. В. І. Левченка і В. Л. Галяса. – Біла Церква, 2002. – С 13–16.
13. Моин В. М. Простой и специфический метод определения активности глутатионпероксидазы в эритроцитах / В. М. Моин // Лаб. дело. – 1986. – Том. 12. – С. 724–727.
14. Орехович В.Н. Современные методы в биохимии / В.Н. Орехович. – Москва: Медицина, 1977. – 392 с.
15. Осташко Ф. И. Биотехнология воспроизводства крупного рогатого скота / Ф. И. Осташко. – Киев: Аграрна наука, 1995. – 184 с.
16. Чевари С. Н. Определение антиоксидантных параметров крови и их диагностическое значение в пожилом возрасте / С. Н. Чевари, Т.А. Андян, Я. И. Штрэнгер // Лаб. дело. – 1991. – № 10. – С. 9–13.
17. Фізіолого-біохімічні методи досліджень у біології, тваринництві та ветеринарній медицині: довідник / Під ред. В. В. Влізло. – Львів, 2004. – С. 40–55.

18. Ahmed M. A. Amelioration of nandrolone decanoate-induced testicular and sperm toxicity in rats by taurine: Effects on steroidogenesis, redox and inflammatory cascades, and intrinsic apoptotic pathway / M. A. Ahmed // *Toxicol. Appl. Pharmacol.* – 2015. – Vol 282. – P. 285–296.
19. Al-Attar A. M. Antioxidant effect of vitamin E treatment on some heavy metals-induced renal and testicular injuries in male mice / A. M. Al-Attar // *Saudi J. Biol. Scien.* – 2011. – Vol. 18. – P. 63–72.
20. Al-Lahham R. Mitochondrial-generated ROS down regulates insulin signaling via activation of the p38MAPK stress response pathway / R. Al-Lahham, J. H. Deford, J. Papaconstantinou // *Mol. Cell Endocrinol.* – 2015. [Epub ahead of print].
21. Alcazar O. Importance of lactate dehydrogenase for the regulation of glycolytic flux and insulin secretion in insulin-producing cells. O. Alcazar, M. Tiedge, S. Lenzen // *Biochem J.* – 2000. – Vol. 352. – P. 373–380.
22. Allaman I. Methylglyoxal, the dark side of glycolysis / I. Allaman, M. Bélanger, P. J. Magistretti // *Front. Neurosc.* – 2015. – Vol. 9. – P. 9–23.
23. Amacher D. E. Serum transaminase elevations as indicators of hepatic injury following the administration of drugs / D. E. Amacher // *Reg. Tox. Pharm.* – 1998. – Vol. 27. – P. – 119–130.
24. Anand P. Effects of oral administration of antioxidant taurine on haematological parameters in Wistar rats / P. Anand, D. Rajakumar, A. J. Felix, T. Balasubramanian // *Pak. J. Biol. Sci.* – 2010. – Vol. 16. – P. 785–793.
25. Anand P. Effects of taurine on glutathione peroxidase, glutathione reductase and reduced glutathione levels in rats / P. Anand, D. Rajakumar, M. Jeraud, A. J. Felix [et al.] // *Pakist. J. Biol. Scien.* – 2011. – Vol. 14. – P. 219–225.
26. Aruoma O. I. The antioxidant action of taurine, hypotaurine and their metabolic precursors / O. I. Aruoma, B. Halliwell, B. M. Hoey, J. Butler // *Biochem. J.* – 1988. – Vol. 256. – P. 251–255.

27. Augoff K. Lactate dehydrogenase 5: An old friend and a new hope in the war on cancer / K. Augoff, A. Hryniewicz-Jankowska, R. Tabola // *Canc. Let.* – 2015. – Vol. 358. – P. 1–7.
28. Ballmoos C. Unique rotary ATP synthase and its biological diversity / C. Ballmoos, G. M. Cook, P. Dimroth // *Annu. Rev. Biophys.* – 2008. – Vol. 37. – P. 43–64.
29. Bartolini D. Reaction kinetics and targeting to cellular glutathioneS-transferase of the glutathione peroxidase mimetic PhSeZnCl and its D,L-poly lactide microparticle formulation / D. Bartolini, M. Piroddi, C. Tidei, S. Giovagnoli [et al.] // *Fr. Rad. Biol. Med.* – 2015. – Vol. 78. – P. 56–65.
30. Beauchamp C. Superoxide dismutase: improved assays and assays applicable to acrylamide gels / C. Beauchamp, I. Fridovich // *Analyt. Biochem.* – 1971. – V. 44. – P. 276–287.
31. Bernardi P. From ATP to PTP and back a dual function for the mitochondrial ATP synthase / P. Bernardi, F. Di Lisa, F. Fogolari, G. Lippe // *Circ. Res.* – 2015. – Vol. 116. – P. 1850–1862.
32. Bonavita V. Lactate dehydrogenase isoenzymes in the nervous tissue-IV an ontogenetic study on the rat brain / V. Bonavita, F. Ponte, G. Amor // *J. Neurochem.* – 1964. – Vol. 11. – P. 33–47.
33. Bonora M. Molecular mechanisms of cell death: central implication of ATP synthase in mitochondrial permeability transition / M. Bonora, M. R. Wieckowski, C. Chinopoulos, O. Kepp // *Oncogene.* – 2014. – Vol. 1. – P. 1–12.
34. Boyer P. D. The ATP synthase – a splendid molecular machine / P. D. Boyer // *Annu. Rev. Biochem.* – 1997. – Vol. 66. – P. 717–749.
35. Camargo R. L. The effect of taurine supplementation on glucose homeostasis: the role of insulin-degrading enzyme / R. L. Camargo, R. C. Branco, L. F. de Rezende, J. F. Vettorazzi [et al.] // *Adv. Exp. Med. Biol.* – 2015. – Vol. 803. – P. 715–24.

36. Capaldi R. A. Mechanism of the F₁F₀-type ATP synthase, a biological rotary motor / R. A. Capaldi R. Aggeler // *Tr. Biochem. Scien.* – 2002. – Vol.27. – P. 154–160.
37. Carneiro E. M. Taurine supplementation modulates glucose homeostasis and islet function / E. M. Carneiro, M. Q. Latorraca, E. Araujo, M. Beltra // *J. Nutr. Biochem.* – 2009. – Vol. 20. – P. 503–511.
38. Carpenter K. L. Glycolysis and the significance of lactate in traumatic brain injury / K. L. Carpenter, I. Jalloh, P. J. Hutchinson // *Front. Neurosci.* – 2015. – Vol. 9. – P. 1–15.
39. Cecchini G. Function and structure of complex II of the respiratory chain / G. Cecchini // *Annu. Rev. Biochem.* – 2003. – Vol. 72. – P. 77–109.
40. Chance B. The respiratory chain and oxidative phosphorylation / B. Chance, G. R. Williams // *Adv. Enz. Rel. Ar. Mol. Biol.* – 1956. – Vol. 11. – P. 65–134.
41. Chatzakos V. N-acyl taurines are anti-proliferative in prostate cancer cells / V. Chatzakos, K. Slätis, T. Djureinovic, T. Helleday [et al.] // *Lipids.* – 2012. – Vol. 47. – P. 355–361.
42. Chen Q. production of reactive oxygen species by mitochondria central role of complex III / Q. Chen, E. J. Vazquez, S. Moghaddas C. L. Hoppel // *J. Biol. Chem.* – 2003. – Vol. 278. – P. 36027–36031.
43. Cherif H. Effects of taurine on the insulin secretion of rat fetal islets from dams fed a low-protein diet / H. Cherif, B. Reusens, M. Ahn, J. Hoet [et al.] // *J. Endocrin.* – 1998. – Vol. 159. – P. 341–348.
44. Cheriyan M. Directed evolution of a pyruvate aldolase to recognize a long chain acyl substrate / M. Cheriyan, M. J. Walters, B. D. Kang, L. L. Anzaldi // *Bioorg Med Chem.* – 2011. – Vol. 21. – P. 6447–6453
45. Chettimada S. Hypoxia-induced glucose-6-phosphate dehydrogenase overexpression and -activation in pulmonary artery smooth muscle cells:

- implication in pulmonary hypertension / S. Chettimada, R. Gupte, D. Rawat, S. A. Gebb // *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol.* – Vol. 308. – P. 287–300.
46. Cho S. Characterization of glucose-6-phosphate dehydrogenase isozymes from human and pig brain / S. Cho J. G. Josh // *Neurosc.* – 1990. – Vol. 38. – P. 819–828.
47. Chou Ch. Taurine resumed neuronal differentiation in arsenite-treated N2a cells through reducing oxidative stress, endoplasmic reticulum stress, and mitochondrial dysfunction. / Ch. Chou, H. Lin, L. Hwang // *Amino Acids.* – 2015. – Vol. 47. – P. 735–744.
48. Comim C.M., Activity of Krebs cycle enzymes in mdx mice / C.M. Comim, A. Hoepers, L. Ventura, V. Freiburger [et al.] // *Muscle Nerve.* – 2016. – Vol. 95. – P. 91–95.
49. Corvo M. L. Superoxide dismutase enzymosomes: carrier capacity optimization, in vivo behaviour and therapeutic activity / M. L. Corvo, H. S. Marinho, P. Marcelino, R. M. Lopes [et al.] // *Pharmac Res.* – 2015. – Vol. 32. – P. 91–102.
50. Cuesta S. M. The classification and evolution of enzyme function / S. M. Cuesta, S. A. Rahman, N. Furnham, J. M. Thornton // *Biophys. J.* – 2015. – Vol. 109. – P. 1–5.
51. Das J. Taurine protects rat testes against NaAsO₂-induced oxidative stress and apoptosis via mitochondrial dependent and independent pathways / J. Das, J. Ghosh, P. Manna, M. Sinha [et al.] // *Tox. Let.* – 2009. – Vol. 187. – P. 201–210.
52. Das J. Taurine protects rat testes against doxorubicin-induced oxidative stress as well as p53, Fas and caspase 12-mediated apoptosis / J. Das, J. Ghosh, P. Manna // *Amino Acids.* – 2012. – Vol. 42. – P. 1839–1855.
53. Dawson R. The cytoprotective role of taurine in exercise-induced muscle injury/ R. Dawson, M. Biasetti, S. Messina, J. Dominy // *Amino Acids.* – 2002. – Vol. 22. – P. 309–324.

54. De la Puerta C. Taurine and glucose metabolism: a review / C. De la Puerta, F. J. Arrieta, J. A. Balsa, J. I. Botella-Carretero [et al.] // *Nutr. Hosp.* – 2010. – Vol 25. – P. 910–919.
55. Della-Morte D. Resveratrol pretreatment protects rat brain from cerebral ischemic damage via a SIRT1 – UCP2 pathway / D. Della-Morte, R. D. Kunjan, A.R. DeFazio. [et al.] // *Neurosc.* – 2009. – Vol. 159. – P. 993–1002.
56. Deprem T. Distribution of glutathione peroxidase 1 in liver tissues of healthy and diabetic rats treated with capsaicin / T. Deprem, S.E. Yildiz, E. K. Sari, S. A. Bingol [et al.] // *Biotech. Histochem.* – 2015. – Vol. 90. – P. 1–7.
57. DeRosa G. Metabolic implications of the distribution of the alanine aminotransferase isoenzymes / G. DeRosa, R. W. Swick // *J. Bio. Chem.* – Vol. 250. – 1975. – P. 7961–7967.
58. DiMauro S. Mitochondrial respiratory-chain diseases / S. DiMauro, E. A. Schon // *New Engl. J. Med.* – 2003. – Vol. 348. – P. 2656–2668.
59. Dröge W. Free radicals in the physiological control of cell function / W. Dröge // *Phys. Rev.* – 2002. – Vol. 82. – P. 47–95.
60. Eggleston L. V. Regulation of the pentose phosphate cycle / L. V. Eggleston, H. A. Krebs // *Biochem. J.* – 1974. – Vol. 138. – P. 425–435.
61. El Idrissi A. Taurine increases mitochondrial buffering of calcium: role in neuroprotection / A. El Idrissi // *Amino Acids.* – 2008. – Vol. 34. – P. 321–328.
62. El-Sayeda W. M. Prophylactic and therapeutic effects of taurine against aluminum-induced acute hepatotoxicity in mice / W. M. El-Sayeda, M. A. Al-Kahtani, A. M. Abdel-Moneima // *Journal of Hazardous Materials.* – 2011. – Vol. 192. – P. 880–886.
63. Evans G. O. *Animal clinical chemistry* / G. O. Evans. // Taylor&Francis. – 2005. – p. 222.
64. Forman H. J. Even free radicals should follow some rules: a guide to free radical research terminology and methodology / H. J. Forman, O. Augusto, R. Bri-

- gelius-Flohe, P. A. Dennerly // *Free Radic Biol Med.* – 2015. – Vol. 78. – P. 233–235.
65. Garbus J. Serum malate dehydrogenase isoenzymes as indicators of severe cellular injury / J. Garbus // *Clin. Chim. Acta.* – 1971. – Vol. 35. – P. 502–504 http://www.sciencedirect.com/science?_ob=ArticleURL&_udi=B6T57-47PRF20-1PJ&_user=10&_coverDate=12%2F31%2F1971&_rdoc=1&_fmt=high&_orig=search&_origIn=search&_sort=d&_docanchor=&view=c&_acct=C000050221&_version=1&_urlVersion=0&_userid=10&md5=a4f989872c479c87e0943704eff31e73&searchtype=a - implicit0.
66. Gautheron D. C. Mitochondrial oxidative phosphorylation and respiratory chain: Review / D. C. Gautheron // *J. Inher. Metab. Dis.* – 1984. – Vol 7. – P. 57–61.
67. Giergiel M. Age-related changes in activity of catalase in selected bovine muscles / M. Giergiel, M. Jamiol, J. Wawrzykowski, M. Kankofer // *Act. Scien. Veter.* – 2015. – Vol. 43. – P. 1–7.
68. Green T. R. Antioxidant role and subcellular location of hypotaurine and taurine in human neutrophils / T. R. Green, J. H. Fellman, A. L. Eicher, K. L. Pratt // *Biochem. Biophys. Acta.* – 1991. – Vol. 1073. – P. 91–97.
69. Goth L. Serum catalase: Reversibly formed charge isoform of erythrocyte catalase / L. Goth // *Clin. Chem.* – 1991. – Vol. 32. – P. 2043–2047.
70. Hall T. R. Branched chain aminotransferase isoenzymes purification and characterization of the rat brain isoenzyme / T. R. Hall, R. Wallin, G. D. Reinhardtll, S. M. Hutson // *J. Bio. Chem.* – 1993. – Vol. 268. – P. 3092–3098.
71. Halliwell B. Antioxidant defence mechanisms: from the beginning to the end (of the beginning) / B. Halliwell // *Free Rad. Res.* – 1999. – Vol. 31. – P. 261–272.
72. Hansen S. H. Taurine and regulation of mitochondrial metabolism / S. H. Hansen, H. Birkedal, F. Wibrand, N. Grunnet // *Adv. Exp. Med. Biol.* – 2015. – Vol. 803. – P. 397–405.

73. Huang J. Molecular docking to explore the possible binding mode of potential inhibitors of thioredoxin glutathione reductase / J. Huang, W. Hua, J. Li, Z. Hua // *Mol. Med. Rep.* – 2015. – Vol. 12. – P. 5787–5795.
74. Hunter F. E. The mitochondrion. Molecular basis of structure and function / F. E. Hunter // *J. Am. Chem. Soc.* – 1964. – Vol 86. – P. 5704–5705.
75. Hutson S. M. Identification of mitochondrial branched chain aminotransferase and its isoforms in rat tissues / S. M. Hutson, R. Wallinn, T. R. Hall // *J. Bio. Chem.* – 1992. – Vol. 267. – P. 15681–15686.
76. Huxtable R. J. Physiological actions of taurine / R. J. Huxtable // *Phys. rev.* – 1992. – Vol. 72. – P. 101–160.
77. Iglesias-González J. Effects of aluminium on rat brain mitochondria bioenergetics: an *in vitro* and *in vivo* study / J. Iglesias-González S. Sánchez-Iglesias A. Beiras-Iglesias [et al.] // *Mol Neurobiol.* – 2016. [Epub ahead of print].
78. Jang J. Taurine increases testicular function in aged rats by inhibiting oxidative stress and apoptosis / J. Jang, X. Zong, G. Wu, S. Lin [et al.] *Amino Acids.* – 2015. – Vol. 47. – P. 1549–1558.
79. Jolitha A. B. Modification by vitamin E and exercise of oxidative stress in regions of aging rat brain: studies on superoxide dismutase isoenzymes and protein oxidation status / A. B. Jolitha, M. V. Subramanyam, S. Asha Devi // *Exp Gerontol.* – 2006. – Vol. 8. – P. 753–763.
80. Jones W. Aerobic glycolysis: beyond proliferation / W. Jones, K. Bianchi // *Front. Immunol.* – 2015. – Vol. 6. – P. 1–5.
81. Jong C. J. Mechanism underlying the antioxidant activity of taurine: prevention of mitochondrial oxidant production / C. J. Jong, J. Azuma, S. Schaffer // *Amino Acids.* – 2012. – Vol. 42. – P. 2223–2232.
82. Jurisic V. The actual role of LDH as Tumor Marker, Biochemical and Clinical Aspects / V. Jurisic, S. Radenkovic, G. Konjevic // *Adv. Exp. Med. Biol.* – 2015. – Vol. 867. – P. 115–124.

83. Karim F. Correlation between aminotransferase ratio (AST/ALT) and other biochemical parameters in chronic liver disease of viral origin / F. Karim, R. Rahman, S. Shermin [et al.] // *Delta Med Col J.* – 2015. – Vol. 3. – P. 13–17.
84. Kletzien R. F. Glucose-6-phosphate dehydrogenase: a “housekeeping” enzyme subject to tissue-specific regulation by hormones, nutrients, and oxidant stress / R. F. Kletzien, P. K. W. Harris, L. A. Foellmi // *FASEB Journal.* – 1994. – Vol. 8. – P. 174–181.
85. Kopperschläger G. Methods for the separation of lactate dehydrogenases and clinical significance of the enzyme. / G. Kopperschläger, J. Kirchberger // *J. Chromatogr. B. Biomed. Appl.* – 1996. – Vol. 684. – P. 25–49.
86. Koukourakis M. I. Lactate dehydrogenase-5 (LDH-5) overexpression in non-small-cell lung cancer tissues is linked to tumour hypoxia, angiogenic factor production and poor prognosis / M. I. Koukourakis, A. Giatromanolaki, E. Sivridis // *Brit. J. Can.* – 2003. – Vol. 89. – P. 877–885.
87. Kramer P. A. A review of the mitochondrial and glycolytic metabolism in human platelets and leukocytes: Implications for their use as bioenergetic biomarkers / P. A. Kramer, S. Ravi, B. Chacko, M. S. Johnson [et al.] // *Red. Biol.* – 2014. – Vol. 2. – P. 206–210.
88. Krebs H. A. Rate control of the tricarboxylic acid cycle / H. A. Krebs // *Adv. Enz. Reg.* – 1970. – Vol. 8. – P. 335–353.
89. Kulthinee S. Taurine supplementation prevents the adverse effect of high sugar intake on arterial pressure control after cardiac ischemia/reperfusion in female rats / S. Kulthinee, M. J. Wyss, S. Roysommuti // *Taurine 9, Adv. Exp. Med. Biol.* – 2015. – Vol. 803. – P. 597–611.
90. Kucharzewska P. Global profiling of metabolic adaptation to hypoxic stress in human glioblastoma cells / P. Kucharzewska, H. C. Christianson, M. Belting // *PLOS ONE.* – 2015. – Vol. 10. – P. 1–22.

91. Lambert I. H. Physiological role of taurine – from organism to organelle / I. H. Lambert, D. M. Kristensen, J. B. Holm, O. H. Mortensen // *Acta Physiol.* – 2015. – Vol. 203. – P. 191–202.
92. Latner A. L. Lactate dehydrogenase isoenzymes in foetal and neonatal tissues / A. L. Latner, A. W. Skillen // *J. Embryol. Morph.* – 1964. – Vol. 12. – P. 501–509.
93. Lee N. The changes by Hypoxia Inducible Factor-1alpha (HIF-1 α) on taurine uptake in brain capillary endothelial cells at high glucose conditions / N. Lee, Y. Kang // *Taurine 9, Adv. Exp. Med. Biol.* – 2015. – Vol. 803. – P. 501–511.
94. Lossos I.S. Lactate dehydrogenase isoenzyme analysis for the diagnosis of pleural effusion in haemato-oncological patients / I. S. Lossos, O. Intrator, N. Berkman, R. Breuer // *Respir Med.* – 1999. – Vol. 93. – P. 338–341.
95. Lowry O. H. Protein measurement with Folin phenol reagent. / O. H. Lowry, N. J. Rosebrough, A. L. Fair [et al.] // *J Biol Chem.* – 1951. – Vol. 193. – P. 265–275.
96. Lunt S. Y. Aerobic glycolysis: meeting the metabolic requirements of cell proliferation / S. Y. Lunt, M. G. Vander // *Ann. Rev.* – 2011. – Vol. 27. – P. 441–464.
97. Mailloux R. J. Still at the center of it all; novel functions of the oxidative Krebs cycle / R. J. Mailloux // *Bioenergetics.* – 2015. – Vol. 4. – P. 1–14.
98. Manna P. Taurine plays a beneficial role against cadmium-induced oxidative renal dysfunction / P. Manna, M. Sinha, P. C. Sil // *Amino Acids.* – 2009. – Vol. 36. – P. 417–428.
99. Matsuzaki Y. Decreased taurine concentration in skeletal muscles after exercise for various durations / Y. Matsuzaki, T. Miyazaki, S. Miyakawa, B. Bouscarel // *Med. Scien. Sp. Exer.* – 2002. – Vol. 35. – P. 793–797.
100. McArdle A. Role of mitochondrial superoxide dismutase in contraction-induced generation of reactive oxygen species in skeletal muscle extracellular

- space / A. McArdle J. van der Meulen, G. L. Close, D. Pattwell [et al.] // *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* – 2004. – Vol 286. – P. 1152–1158.
101. Moro M. A. Mitochondrial respiratory chain and free radical generation in stroke / M. A. Moro, A. Almeida, J. P. Bolanos, I. Lizasoain // *Fr. Rad. Biol. Med.* – 2005. – Vol. 39. – P. 1291–1304.
 102. Nakamoto R. K. Rotational coupling in the F_0F_1 ATP synthase / R. K. Nakamoto, C. J. Ketchum, M. K. Al-Shawi // *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.* – 1999. – Vol. 28. – P. 205–234.
 103. Nandhini A. T. Taurine modulates kallikrein activity and glucose metabolism in insulin resistant rats / A. T. Nandhini, C. V. Anuradha // *Amino Acids.* – 2002. – Vol. 22. – P. 27–38.
 104. Nelson D. L. Lehninger principles of biochemistry. Fifth edition / D. L. Nelson M. M. Cox. – New York: W. H. Freeman and Company, 2011. – 1282 p.
 105. Nicholls P. Enzymology and structure of catalases / P. Nicholls, I. Fita, P. C. Loewen // *Adv. Inorg. Chem.* – 2000. – Vol. 51. – P. 51–106.
 106. Nishimura E. T. Isozymes of human and rat catalases / E. T. Nishimura, S. N. Carson, T. Y. Kobara // *Arch. Biochem. Biophys.* – 1964. – Vol. 108. – P. 452–459.
 107. Nishimura E.T. Immuno-electrophoretic identification of catalase subcomponents in the homogenates of rat tissues / E.T. Nishimura, S. N. Carson, G. W. Patton // *Cans. Res.* – 1966. – Vol. 26. – P. 92–96.
 108. O’Byrne M. B. Taurine-induced attenuation of MPP1 neurotoxicity in vitro: a possible role for the GABAA subclass of GABA receptors. / M. B. O’Byrne, K. F. Tipton // *J. Neurochem.* – 2000. – Vol. 74. – P. 2087–2093.
 109. Okado-Matsumoto A. Subcellular distribution of superoxide dismutases (SOD) in rat liver: Cu,Zn-SOD in mitochondria. / A. Okado-Matsumoto, I. Fridovich // *J. Biol. Chem.* – 2001. – Vol. 276. – P. 38388–38393.
 110. Ørtenblad N. N. Reactive oxygen species are important mediators of taurine release from skeletal muscle cells / Ørtenblad, J. F. Young, N. Oksbjerg, J. H.

- Nielsen [et al.] // *Am. J. Physiol. Cell. Physiol.* – 2003. – Vol. 284. – P. 1362–1372.
111. Oudit G. Y. Taurine supplementation reduces oxidative stress and improves cardiovascular function in an iron-overload murine model / G. Y. Oudit, M. G. Trivieri, N. Khaper, T. Husain [et al.] // *Circ.* – 2004. – Vol. 109. – P. 1877–1885.
112. Ozden S. Methiocarb-induced oxidative damage following subacute exposure and the protective effects of vitamin E and taurine in rats / S. Ozden, B. Catalgol, S. Gezginci-Oktayoglu, P. Arda-Pirincci // *Food Chem. Toxicol.* – 2009. – Vol. 47. – P. 1676–1684.
113. Ozden S. Acute effects of methiocarb on oxidative damage and the protective effects of vitamin E and taurine in the liver and kidney of Wistar rats / S. Ozden, B. Catalgol, S. Gezginci-Oktayoglu, A. Karatug [et al.] // *Toxicol. Ind. Health.* – 2013. – Vol. 1. – P. 1–12.
114. Palmi M. Potentiation of mitochondrial Ca^{2+} sequestration by taurine / M. Palmi, G.T. Youmbi, F. Fusi, G. P. Sgaragli [et al.] // *Biochem. Pharmac.* – 1999. – Vol. 58. – P. 1123–1131.
115. Parikh M. C. Role of taurine on the actions of alcohol against systemic and cardiac biochemical changes in the diabetic rat / M. C. Parikh, S. N. Patel, Y. Shen, C. A. Lau-Cam // *Taurine 9, Adv. Exp. Med. Biol.* – 2015. – Vol. 803. – P.313–338.
116. Parildar-Karpuzođlu H. Effect of taurine treatment on pro-oxidant/antioxidant balance in livers and brains of old rats / H. Parildar-Karpuzođlu, G. Mehmetçik, G. Özdemirler-Erata, S. Dođru-Abbasođlu [et al.] // *Pharm. Rep.* –2008. – Vol. 60. – P. 673–678.
117. Passarella S. Mitochondria and L -lactate metabolism / S. Passarella, L. de Bari, D. Valenti, R. Pizzuto // *FEBS Letters.* – 2008. – Vol. 582. – P. 3569–3576.
118. Patel S. N. Impact of light ethanol intake and of taurine, separately and together, on pathways of glucose metabolism in the kidney of diabetic rats / S. N. Pa-

- tel, M. Parikh, C. A. Lau-Cam // Taurine 9, Adv. Exp. Med. Biol. – 2015. – Vol. 803. – P. 279–303.
119. Prentice H. Mechanisms of neuronal protection against excitotoxicity, endoplasmic reticulum stress, and mitochondrial dysfunction in stroke and neurodegenerative diseases / H. Prentice, J. P. Modi, J. Wu // Ox. Med. Cel. Long. – 2015. – Article ID 964518, in press.
120. Pushpakiran G. Taurine restores ethanol-induced depletion of antioxidants and attenuates oxidative stress in rat tissues / G. Pushpakiran, K. Mahalakshmi, C. V. Anuradha // Amino Acids. – 2004. – Vol. 27. – P. 91–96.
121. Reagan W. J. Metabolic Adaptive ALT Isoenzyme response in livers of c57/bl6 mice treated with dexamethasone / W. J. Reagan, R. Yang, S. Park, R. Goldstein [et al.] // Tox. Pathol. – 2012. – Vol. 00. – P. 1–11.
122. Reitmann S. A colorimetric method for the determination of serum glutamic oxaloacetic and glutamic pyruvic transaminases. / Reitmann S. Frankel S. // Amer. J. Clin. Path. – 1957. – V. 28, No. 1. – P. 56 – 63.
123. Ribeiro R. A. Taurine supplementation: involvement of cholinergic/phospholipase C and protein kinase A pathways in potentiation of insulin secretion and Ca^{2+} handling in mouse pancreatic islets / R. A. Ribeiro, E. C. Vanzela, C. A. Oliveira, M. L. Bonfleur [et al.] // Brit. J. Nutr. – 2010. – Vol. 104. – P. 1148–1155.
124. Rider M. H. 6-Phosphofructo-2-kinase/fructose-2,6-bisphosphatase: head-to-head with a bifunctional enzyme that controls glycolysis / M. H. Rider, L. Bertrand, D. Vertommen, P. A. Michels [et al.] // Biochem. J. – 2004. – Vol. 381. – P.561–579.
125. Rosado A. Lactate dehydrogenase subunits in normal and neoplastic tissues of the rat / A. Rosado, H. P. Morris, S. Weinhouse // Cans. Res. – 1968. – Vol 29. – P. 1673–1680.

126. Rudack D. Rat liver glucose-6-phosphate dehydrogenase regulation by carbohydrate diet and insulin / D. Rudack, E. M. Chisholm, D. Holten // *J. Biol. Chem.* – 1971. – Vol. 246. – P. 1249–1254.
127. Ruscak M. Isoelectric focusing of the alanine aminotransferase isoenzymes from the brain, liver and kidney / M. Ruscak, J. Orlicky, V. Zubor // *Comp. Biochem. Physiol.* – 1975 – Vol. 71. – P. 141–144.
128. Ruscak M. Alanine aminotransferase in bovine brain: purification and properties / M. Ruscak, J. Orlicky, V. Zubor, H. Hager // *J. Neurochem.* – 1982. – Vol. 32. – P. 210–216.
129. Salati L. M. Dietary regulation of expression of glucose-6-phosphatedehydrogenase / L. M. Salati, B. Amir-Ahmady // *Annu. Rev. Nutr.* – 2001. – Vol. 21. – P. 121–140.
130. Santos–Silva J. C. Taurine supplementation ameliorates glucose homeostasis, prevents insulin and glucagon hypersecretion, and controls β , α , and δ -cell masses in genetic obese mice / J. C. Santos–Silva, R. A. Ribeiro, J. F. Vettorazzi, E. Irlas [et al.] // *Amino Acids.* – 2015. – Vol. 47. – P. 1533–1548.
131. Sariözkan S. The influence of cysteine and taurine on microscopic–oxidative stress parameters and fertilizing ability of bull semen following cryopreservation. / S. Sariözkan, M. N. Bucak, P. B. Tuncer [et al.] // *Cryobiology.* – 2009. – Vol. 58 (2). – P. 134–138.
132. Schaffer S. W. Physiological roles of taurine in heart and muscle / S. W. Schaffer, C. Jong, K.C.Ramila, J. Azuma // *J. Biomed. S.* – 2010. – Vol. 17. – P. 1–8.
133. Schaffer S. W. Role of antioxidant activity of taurine in diabetes / S.W. Schaffer, J. Azuma, M. Mozaffari // *Can. J. Physiol. Pharmacol.* – 2009. – Vol. 87. – P. 91–99.
134. Schagger H. Respiratory Chain Supercomplexes / H. Schagger // *IUBMB Life.* – 2001. – Vol. 52. – P. 119–128.

135. Schagger H. Significance of respirasomes for the assembly/stability of human respiratory chain complex I / H. Schagger, R. de Coo, M. F. Bauer, S. Hofmann [et al.] // *J. Biol. Chem.* – 2004. – Vol. 279. – P. 36349–36353.
136. Scholz T.D. Mitochondrial F₁-ATPase activity of canine myocardium: effects of hypoxia and stimulation. / T. D. Scholz, R. S. Balaban // *Am. J. Physiol. Heart Circ.* – 1994. – Vol. 266. – P. 396–403.
137. Schurr A. Glycolysis at 75: is it time to tweak the first elucidated metabolic pathway in history? / A. Schurr, E. Goza // *Front. Neurosc.* – 2015. – Vol. 9. – P. 1–3.
138. Seaver L. C. Are respiratory enzymes the primary sources of intracellular hydrogen peroxide? / L. C. Seaver, J. A. Imlay // *J. Biol. Chem.* – 2004. – Vol. 279. – P. 48742–48750.
139. Sestakova N. Determination of motor activity and anxiety-related behaviour in rodents: methodological aspects and role of nitric oxide / N. Sestakova, A. Puzserova, M. Kluknavsky, I. Bernatova // *Interdiscip. Toxicol.* – 2013. – Vol. 6. – P. 126–135.
140. Sevela M. A method for estimation of lactic dehydrogenase in body liquids / M. Sevela, J. Tovarek // *J. Czech Physiol.* – 1959. – Vol 98. – P. 844–848.
141. Sharanova N. E. Effects of taurine supplementation on apoptosis, lipid peroxidation and proteomic pools of subcellular fractions of rat hepatocytes in experiment / N. E. Sharanova, Z. V. Karagodina, S. N. Kulakova, E. N. Trushina // *Vopr. Pit.* – 2012. – Vol. 81. – P. 45–50.
142. Shennan D. B. Swelling-induced taurine transport: relationship with chloride channels, anion-exchangers and other swelling-activated transport pathways. / D. B. Shennan // *Cell Physiol Biochem.* – 2008. – Vol. 21. – P. 15–28.
143. Shimada K. Role of ROS production and turnover in the antioxidant activity of taurine / K. Shimada, C. J. Jong, K. Takahashi, S. W. Schaffer // *Taurine 9, Adv. Exp. Med. Biol.* – 2015. – Vol. 803. – P. 581–596.

144. Sokolov S. S. Negative feedback of glycolysis and oxidative phosphorylation: mechanisms of and reasons for it / S. S. Sokolov, A. V. Balakireva, O. V. Markova, F. F. Severin // *Biochem.* – 2015. – Vol. 80. – P. 559–564.
145. Spaeth D. G. Taurine synthesis, concentration, and bile salt conjugation in rat, guinea pig, and rabbit / D. G. Spaeth, D. L. Schneid // *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* – 1974. – Vol. 174. – P. 855–858.
146. Stark H. Causes of upregulation of glycolysis in lymphocytes upon stimulation. A comparison with other cell types. / H. Stark, M. Fichtner, R. König, S. Lorkowski [et al.] // *Biochimie.* – 2015. [Epub ahead of print]
147. Stefankiv Yu., Babsky A., Shostakovska I.. Peculiarities of norepinephrine action on respiration of the rat liver mitochondria stimulated by ADP and Ca²⁺ ions / Yu. Stefankiv, A. Babsky, I. Shostakovska // *Ukr Biokhim Zh.* – 1995. – Vol. 67. – P 22–27. (in Ukrainian)
148. Suzuki T. Taurine as a constituent of mitochondrial tRNAs: new insights into the functions of taurine and human mitochondrial disease / T. Suzuki, T. Suzuki, T. Wada, K. Saigo [et al.] // *The EMBO Journal.* – 2002. – Vol. 21. – P. 6581–6589.
149. Takamiya R. Glycoredox: New Paradigm for Glycosylation and Redox Signaling Research / R. Takamiya, K. Ohtsubo, N. Taniguchi // *Glycoscience: Biology and Medicine.* – 2015. – Vol. 1. P. 1275–1281.
150. Taranukhin A.G. Lethality of taurine and alcohol coadministration in mice / A.G. Taranukhin, P. Saransaari, S.S. Oja // *Adv Exp Med Biol.* – 2013. – Vol. 776. – P. 29–38.
151. Tarhonskaya H. Kinetic investigations of the role of factor inhibiting Hypoxia-inducible Factor (FIH) as an oxygen sensor / H.Tarhonskaya, A. P. Hardy, E. A. Howe, N. D. Loik // *J. Biolog. Chem.* – Vol. 290. – P. 19726–19742.
152. Terrill J. R. Increasing taurine intake and taurine synthesis improves skeletal muscle function in the mdx mouse model for Duchenne Muscular Dystrophy / J.

- R.Terrill, G.J. Pinniger, J.A. Graves, M. D. Grounds [et al.] // *J Physiol.* – 2015. [Epub ahead of print]
153. Tsounapi P. Antioxidant treatment with edaravone or taurine ameliorates diabetes-induced testicular dysfunction in the rat / P. Tsounapi, M.Saito, F. Dimitriadis, S. Koukos [et al.] // *Mol. Cell Biochem.* – 2012. – Vol. 369. – P. 195–204.
 154. Umemoto S. Calcium antagonist reduces oxidative stress by upregulating Cu/Zn superoxide dismutase in stroke-prone spontaneously hypertensive rats / S. Umemoto, M. Tanaka, S. Kawahara, M. Kubo [et al.] // *Hypertens. Res.* – 2004. – Vol. 27. – P. 877–885.
 155. Valko M. Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease / M. Valko, D. Leibfritz, J. Moncol, M. T. Cronin // *Intern. J. Biochem. Cell Biol.* – 2007. – Vol. 39. – P. 44–84.
 156. Van Vranken J.G. Protein-mediated assembly of succinate dehydrogenase and its cofactors / J.G. Van Vranken, U. Na, D. R. Winge, J. Rutter // *Crit Rev Biochem Mol Biol.* – 2015. – Vol. 50. – P. 1–13.
 157. Vander Heiden M.G. Understanding the Warburg effect: the metabolic requirements of cell proliferation / M.G. Vander Heiden, L.C. Cantley, C.B. Thompson // *Science.* – 2009. – Vol. 324 P. 1029–1033.
 158. Vanderperre B. Mitochondrial pyruvate import and its effects on homeostasis/ B. Vanderperre, T. Bender, E. R. Kunji, J. Martinou // *Cur. Op. Cell Biol.* – 2015. – Vol. 33. – P. 35–41.
 159. Vazquez-Memije M. E. Respiratory chain complexes and membrane fatty acids composition in rat testis mitochondria throughout development and ageing / M. E. Vazquez-Memije, M. J. Cardenas-Mendez, A. Tolosa, M. El Hafidi // *Exper. Gerontol.* – 2005. – Vol. 40. – P. 482–490.
 160. Vos M. H. Time-resolved infrared spectroscopic studies of ligand dynamics in the active site from cytochrome c oxidase / M. H. Vos, U. Liebl // *Biochim. Biophys. Acta.* – 2015. – Vol. 1847. – P. 79–85.

161. Wan B. Regulation of Citric Acid Cycle by Calcium / B. Wan, K. F. LaNoue, J. Y. Cheung, R. C. Scaduto, Jr. // *J. Biol. Chem.* – 1989. – Vol. 264. – P. 13430–13439.
162. Warskulat U. Chronic liver disease is triggered by taurine transporter knockout in the mouse / U. Warskulat, E. Borsch, R. Reinehr, B. Heller-Stilb [et al.] // *FASEB J.* – 2006. – Vol. 20. – P. 574–576.
163. Williams G. S. Mitochondrial calcium and the regulation of metabolism in the heart / G. S. Williams, L. Boyman, W. Jonathan Lederer // *J. Mol. Cel. Cardiol.* – 2015. – Vol. 78. – P. 35–45.
164. Wodbury W. An improved procedure using ferricyanide for detecting catalase isozymes / W. Wodbury, A.K. Spencer, M.A. Stahmann // *Analyt. Biochem.* — 1971. — V. 44, No. 1. — P. 301–305.
165. Worden J. A. A comparison by species, age and sex of cysteinesulfinate decarboxylase activity and taurine concentration in liver and brain of animals / J. A. Worden, M. H. Stipanuk // *Comp. Biochem. Physiol.* – 1983. – Vol. 82. – P. 233–239.
166. Wu F. Krebs cycle metabolon: structural evidence of substrate channeling revealed by cross-linking and mass spectrometry / F. Wu S. Minter // *Angew. Chem. Int. Ed.* – 2014. – Vol. 53. – P. 1–5.
167. Yang R. Alanine aminotransferase isoenzymes: molecular cloning and quantitative analysis of tissue expression in rats and serum elevation in liver toxicity / R. Yang, S. Park, W. J. Reagan, R. Goldstein [et al.] // *Hepatology.* – 2009. – Vol. 49. – P. 598–607.
168. Yang H. Antioxidant enzymes as redox-based biomarkers: a brief review / H. Yang, T. Lee // *BMB Rep.* – 2015. – Vol. 48. – P. 200–208.
169. Yin X. Metabolic engineering in the biotechnological production of organic acids in the tricarboxylic acid cycle of microorganisms: Advances and prospects / X. Yin, J. Li, H. Shin, G. Du [et al.] // *Biotech. Adv.* – 2015. – Vol. 33. – P. 830–41.

170. Yokota S. Immunocytochemical localization of catalase in rat liver / S. Yokota, H. D. Fahim // *J. Histochem. Cytochem.* – 1981. – Vol. 27. – P. 805–812.
171. Yoshida M. ATP synthase – a marvelous rotary engine of the cell / M. Yoshida, E. Muneyuki, T. Hisabori // *Nat. Rev.* – 2001. – Vol. 2. – P. 669–677.
172. Yoshida G. J. Metabolic reprogramming: the emerging concept and associated therapeutic strategies. / G. J. Yoshida // *J. Exp. Clin. Cancer Res.* – 2015. – Vol. 34. – P. 1–10.
173. Zengin E. Activity of superoxide dismutase copper/zinc type and prognosis in a cohort of patients with coronary artery disease / E. Zengin, C. Sinning, T. Zeller, H. Rupprecht [et al.] // *Biomark. Med.* – 2015. – Vol. 9. – P. 597–604.
174. Zheng J. Energy metabolism of cancer: glycolysis versus oxidative phosphorylation (Review). / J. Zheng // *Oncol Lett.* – 2012. – Vol. 6. – P. 1151–1157.
175. Zorov D. B. Mitochondrial ROS-induced ROS release: An update and review / D. B. Zorov, M. Juhaszova, S. J. Sollott // *Biochim. Biophys. Act.* – 2006. – Vol. 1757. – P. 509–517.