

УДК 577.15:616.36

## ОКСИДАТИВНЫЙ СТАТУС И АКТИВНОСТИ АКОНИТАТГИДРАТАЗЫ И NADP-ИЗОЦИТРАТДЕГИДРОГЕНАЗЫ В ГЕПАТОЦИТАХ КРЫС В НОРМЕ И ПРИ ТОКСИЧЕСКОМ ГЕПАТИТЕ

© 2001 г. Е.М. Андреещева, Т.Н. Попова, В.Г. Артюхов, Л.В. Матасова

*Воронежский государственный университет*

Изучение интенсивности свободнорадикальных процессов в печени крыс методом хемилюминесценции показало, что при токсическом гепатите увеличиваются светосумма (S) и максимальная интенсивность хемилюминесцентного сигнала ( $I_{\max}$ ) в 4,2 и 2 раза соответственно, а также наблюдается снижение тангенса угла наклона кинетической кривой ( $\text{tg} \alpha$ ) на 10% и отношение  $I_{\max}/S$ , отражающее антиоксидантный потенциал организма, на 53%. При этом количества малонового диальдегида и диеновых конъюгатов возрастают в 3,4 и 1,9 раз соответственно. Вместе с тем, при токсическом гепатите активность аконитатгидратазы (КФ 4.2.1.3.; АГ) снижается в 1,3 раза, а активность NADP-изоцитратдегидрогеназы (КФ 1.1.1.42; NADP-ИДГ) увеличивается в 1,4 раза. Предполагается, что АГ и NADP-ИДГ могут участвовать в контроле интенсивности свободнорадикальных процессов при токсическом гепатите.

### ВВЕДЕНИЕ

В настоящее время принято считать, что ключевым неспецифическим звеном в развитии ряда заболеваний печени различной этиологии является возрастание интенсивности образования активных форм кислорода (АФК). Высокорекреационноспособные АФК, обладающие высоким окислительным потенциалом и способностью к быстрым превращениям, вызывают цепные свободнорадикальные процессы в клетках, ведущим из которых является пероксидное окисление липидов (ПОЛ) [1, 2, 3, 4, 5]. Субстратами ПОЛ являются липиды с высоким содержанием ненасыщенных жирных кислот, играющие важную роль в структурно-функциональной организации биомембран. [3]. В норме ПОЛ способствует обновлению мембран, однако усиленная генерация АФК и интенсификация свободнорадикальных процессов сопровождают развитие различных патологических состояний и процесс биологического старения. При всем многообразии воздействий, оказываемых продуктами пероксидного окисления на клетки, одним из основных эффектов ПОЛ является нарушение функционирования биомембран [2]. В настоящее время считается, что ведущим патогенетическим фактором при развитии поражения гепатоцитов вследствие канцерогенеза, воспаления, химического и лекарственного отравления является дисбаланс между гиперпродукцией АФК и активацией ПОЛ, с одной стороны, и недостаточностью антиоксидантных систем (АОС) организма, с другой [6]. Предполагают, что существенное значение для антиоксидантного потенциала имеет уровень цитрата, от содержания которого зависит ин-

тенсивность образования одной из наиболее агрессивных АФК – гидроксильного радикала в реакции Фентона, субстратами которой являются пероксид водорода и  $\text{Fe}^{2+}$ . Цитрат обладает хелатирующими свойствами по отношению к  $\text{Fe}^{2+}$  [7], и в этой связи существенный интерес представляет аконитатгидратаза (КФ 4.2.1.3; АГ)- фермент, катализирующий одну из начальных стадий цикла трикарбоновых кислот (ЦТК)- превращение цитрата в изоцитрат [8]. Окислительное декарбоксилирование изоцитрата до 2-оксоглутарата, сопровождающееся восстановлением NADP, катализируется NADP-специфичной изоцитратдегидрогеназой (КФ 1.1.1.42; NADP-ИДГ) [9]. NADPH, образующийся в данной ферментативной реакции, может использоваться глутатионредуктазной / глутатионпероксидазной антиоксидантной ферментной системой, обеспечивающей детоксикацию пероксидов [10].

В настоящей работе осуществлена оценка уровня свободнорадикальных процессов и антиоксидантного потенциала и активностей АГ и NADP-ИДГ в гепатоцитах крыс в норме и при экспериментальном токсическом гепатите.

### МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

В качестве объекта исследования использовали самцов белых лабораторных крыс (*Rattus rattus* L.), массой 250-300г. Экспериментальную модель токсического гепатита создавали следующим образом: после суточной пищевой депривации крысе с помощью специального зонда в пищевод вводили раствор  $\text{CCl}_4$  в вазелиновом масле (доза – 0,064 мл на 100 г веса животного). Как известно, четыреххлористый углерод

является органоспецифическим токсином, обладающим гепатотропным эффектом [11]. Максимальный цитолиз гепатоцитов под действием данного токсина наблюдается на 3-4 сутки после однократного введения  $CCl_4$  [10].

Извлечение печени крысы осуществляли следующим образом: под кетаминным наркозом животных забивали декапитацией, печень отмывали от крови ледяным физиологическим раствором. Для этого после лапаротомии под портальную вену подводили лигатуру, надсекали и канюлировали ее на 10 мм ниже синуса, переднюю полую вену пересекали в диафрагмальной области и перфузировали печень ледяным изотоническим раствором со скоростью 5 мл/мин в течение 5 минут (до желтого цвета). Печень здоровых животных и крыс с токсическим гепатитом использовали для дальнейших исследований.

Навеску печени крысы гомогенизировали в фарфоровой ступке в 4-кратном объеме охлажденной среды следующего состава: 50 ммоль/л трис-НСI-буфер, рН 7,6. Гомогенат процеживали через капрон и центрифугировали при 10000 g 10 минут. Супернатант использовали для дальнейших исследований.

Определение активности АГ проводили спектрофотометрически при длине волны 233 нм, активность NADP-ИДГ – при 340 нм. Активности выражали в ферментативных единицах или в виде удельной активности. За единицу ферментативной активности (ФЕ) принимали количество фермента, катализирующее образование 1 мкмоль продукта реакции за 1 минуту при температуре 25°C. О скорости окислительного декарбокислирования изоцитрата в ходе ИДГ-реакции судили по возрастанию оптической плотности в результате перехода кофермента NADP в восстановленную форму; о скорости АГ-реакции судили по увеличению оптической плотности в результате образования двойной связи цис-аконитага.

Определение вторичного продукта ПОЛ – малонового диальдегида, проводили по качественной реакции с тиобарбитуровой кислотой [12]. Определение содержания первичных продуктов ПОЛ – диеновых конъюгатов, осуществляли спектрофотометрически в экстрагированной гептановой фазе липидов при 233 нм [13].

Оценку интенсивности свободнорадикальных процессов в норме и при экспериментальном токсическом гепатите осуществляли методом  $Fe^{2+}$ -индуцированной хемилюминесценции. Регистрацию протекания свободнорадикального процесса осуществляли на биохемилюминометре БХЛ-6 с программным обеспечением в течение 40 секунд, т.е. наиболее информативного отрезка времени, характеризующего интенсивность процесса. В измерительную кювету вносили 0,40 мл 0,125 моль/л калий-фосфатного буфера, рН 7,4, 0,40 мл 0,010 ммоль/л  $FeSO_4$ , 0,05 мл гомогената печени и инициировали хемилюминесценцию введением 0,02 мл 2%  $H_2O_2$ . Регистрировали следующие показатели: светосумму хемилюминесценции (S), интенсивность максимальной вспышки ( $I_{max}$ ), тангенс угла падения кинетической кривой ( $tg\alpha_2$ ) [14]. Статистическую обработку проводили с использованием стандартных методов [15]. Обсуждаются различия при  $P < 0,05$ .

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

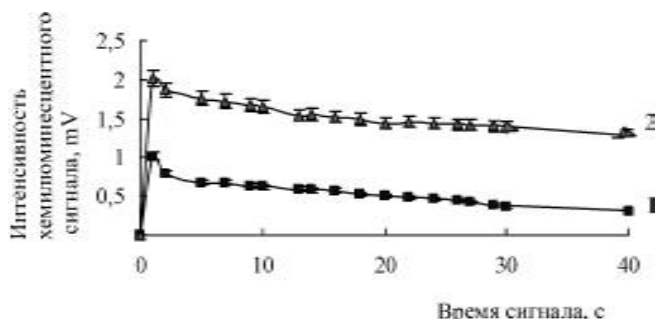
Исследования показали, что в группе контрольных (здоровых) животных концентрация продуктов ПОЛ находится в пределах  $1,63 \cdot 10^{-5}$  мкмоль/г ДК и  $0,19 \cdot 10^{-5}$  мкмоль/г МДА (табл. 1.), что свидетельствует о протекании пероксидного окисления липидов на низком стационарном уровне. Известно, что при определенной интенсивности ПОЛ является частью нормальных метаболических процессов и способствует самообновлению мембранных структур, что воздействует на проницаемость мембран, ионный транспорт и активность мембранно-связанных ферментов [16, 17]. При изучении процесса пероксидного окисления липидов в ишемизированной ткани печени крыс было показано, что содержание ДК увеличивается в гомогенате до  $3,10 \cdot 10^{-5}$  мкмоль/г сырой массы, т.е. в 1,9 раз, а МДА – до  $0,65 \cdot 10^{-5}$  мкмоль/г сырой массы, т.е. в 3,4 раза по сравнению с нормой (табл. 1).

При оценке интенсивности ПОЛ методом хемилюминесценции было показано, что в печени крыс с экспериментальным токсическим гепатитом параметры хемилюминесценции – светосумма максимальной вспышки (S) и интенсивность максимальной вспышки ( $I_{max}$ ) – также возрастают в сравнении с нормой. Типичные кривые хемилюминесценции исследуемых

Таблица 1

### Содержание продуктов пероксидного окисления липидов в гепатоцитах крыс в норме и при экспериментальном токсическом гепатите

Условия опыта	Диеновые конъюгаты, мкмоль/г сырой массы $\cdot 10^{-5}$	Малоновый диальдегид, мкмоль/г сырой массы $\cdot 10^{-5}$	Соотношение малоновый диальдегид/диеновые конъюгаты
Норма	$1,63 \pm 0,02$	$0,19 \pm 0,04$	$0,47 \pm 0,05$
Токсический гепатит	$3,10 \pm 0,03$	$0,65 \pm 0,02$	$0,25 \pm 0,01$



**Рис. 1.** Кривые хемилюминесценции исследуемых образцов из печени крыс (1 – норма; 2 – токсический гепатит)

образцов в норме и при токсическом гепатите представлены на рис. 1. Так, наблюдается увеличение средних значений светосуммы в 4,2 раза по сравнению с нормой и увеличение максимальной интенсивности хемилюминесценции в 2 раза (табл. 2). Данные изменения свидетельствуют о значительном возрастании интенсивности свободнорадикальных процессов в ткани печени, подвергнутой экспериментальному токсическому гепатиту. При этом величины, характеризующие антиокислительную активность образцов – тангенс угла наклона кинетической кривой  $tg\alpha_2$  и коэффициент  $k$ , определяемый по соотношению  $I_{max}/S$ , уменьшаются. Так, при экспериментальном токсическом гепатите наблюдается снижение тангенса угла наклона на 10%, а коэффициента  $k$  на 53%. Полученные результаты отражают снижение антиоксидантного потенциала исследуемой пробы на данном этапе развития ишемии, индуцированной токсическим гепатитом.

В таблице 3 представлены значения активностей АГ и NADP-ИДГ в норме и при экспериментальном токсическом гепатите. Выявлено, что при токсическом гепатите происходит увеличение активности NADP-ИДГ в 1,4 раза, что свидетельствует о возрастании про-

дуцирования NADPH, который может использоваться глутатионредуктазной/глутатионпероксидазной антиоксидантной системой. Вместе с тем наблюдается снижение активности АГ в 1,3 раза, это может также иметь определенное значение для регуляции генерирования АФК: с одной стороны, это обеспечивает накопление цитрата в клетке, а с другой стороны – ингибирование ЦТК на стадии аконитазной реакции приводит к окислению ферментов дыхательной цепи – восстановителем  $O_2$  до супероксид-радикала.

Таким образом, очевидно, существует взаимосвязь между интенсивностью свободнорадикальных процессов и активностями АГ и NADP-ИДГ в гепатоцитах крысы. Снижение активности АГ, сопровождающееся накоплением цитрата, может обеспечивать торможение реакции Фентона за счет хелатирования ионов  $Fe^{2+}$ . Возрастание уровня NADPH в результате активации NADP-ИДГ может способствовать функционированию глутатионредуктазной/глутатионпероксидазной антиоксидантной системы. В этой связи представляется возможным участие АГ и NADP-ИДГ в контроле интенсивности свободнорадикальных процессов при токсическом гепатите.

*Работа поддержана грантом Минобразования РФ Е 00-6.0-23.2001г.*

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Каган В.Е., Прилипко Л.Л., Саввов В.М. // Биофизика. 1979. Т.44. №3. С.482-489.
2. Якушев В.С., Шкопинский Е.А. // Украинский биохимический журнал. 1987. Т.59. №3. С.88-91.
3. Храпова Н.Г. Биохимия липидов и их роль в обмене веществ. М.: Наука. 1981. С.147-155.
4. Каган В.Е., Прилипко Л.Л., Саввов В.М. // Биофизика. 1979. Т.44. №3. С.482-489.

Таблица 2

**Параметры хемилюминесценции в гепатоцитах крыс в норме и при экспериментальном токсическом гепатите**

Опыт	Светосумма вспышки хемилюминесценции (S)	Интенсивность вспышки ( $I_{max}$ )	Тангенс угла наклона ( $tg \alpha_2$ )	Коэффициент ( $K=I_{max}/S$ )
Норма	10,340±0,520	1,010±0,050	0,310±0,020	0,098±0,005
Токсический гепатит	43,890±2,190	2,010±0,100	0,280±0,010	0,047±0,002

Таблица 3

**Активности аконитатгидратазы и NADP-специфичной изоцитратдегидрогеназы в печени крыс в норме и при экспериментальном токсическом гепатите**

Условия опыта	Активность, ФЕ/г сырой массы		Удельная активность, ФЕ/мг белка	
	АГ	NADP-ИДГ	АГ	NADP-ИДГ
Норма	3,320±0,170	37,300±1,860	0,066±0,003	0,530±0,010
Токсический гепатит	2,550±0,130	47,300±2,360	0,051±0,002	0,730±0,010

5. *Владимиров Ю.А., Антонов В.Ф., Роцупкин Д.И., Сулова Т.Б.* // Всесоюзный биохим. съезд. 1985. Т.1. М.: Наука. С.300.
6. *Пескин А.В.* // Русский медицинский журнал. 1999. №5. С.13-15.
7. *Скулачев В.П.* // Биохимия. 1999. Т.64. №12. С.1679-1688.
8. *Ленинджер А.* Основы биохимии.- М: Мир. 1985.- Т. 2-376 с.
9. *Попова Т.Н.* Дис. докт. биол. наук. М. 1994: С. 17-20.
10. *Федорова Н.Ю.* Дисс. канд. биол. наук. Воронеж. 1999. С. 44-45.
11. *Сидорова В.Ф., Рябина З.А.* Регенерация печени у млекопитающих. М.: Медицина. 1996. 240 с.
12. *Стальная И.Д., Гаршивили Т.Г.* Современные методы в биохимии (под ред. Ореховича В.Н.). 1997. М.: Медицина. С.66-68.
13. *Стальная И.Д., Гаршивили Т.Г.* Современные методы в биохимии (под ред. Ореховича В.Н.). 1997. М.: Медицина. С.63-64.
14. *Кузьменко А.И., Морозова Р.П., Николенко И.А., Корниец Г.В., Холодова Ю.А.* Биохимия. 1997 Т.62. С.712-715.
15. *Ллойд Э., Ледерман У.* Справочник по прикладной статистике.-М.: Финансы и статистика. 1990. С.493-513.
16. *Бурлакова Е.Б.* // Физ.-хим. основы авторегуляции в клетках. М. 1968. С.15-25.
17. *Баласявичус Р.В., Толейкис А.И., Праткявичус А.К., Ясайтис А.А.* // Биохимия. 1985. №10. С.1685-1692.