

УДК 591.436.2.08:616/36-002

## МЕТОД ОПРЕДЕЛЕНИЯ СУБКЛЕТОЧНОЙ ГЕНЕРАЦИИ СУПЕРОКСИДАНИОНА У ЗДОРОВЫХ ЖИВОТНЫХ И ПРИ ТОКСИЧЕСКОМ ПОВРЕЖДЕНИИ ПЕЧЕНИ

© 2004 г. Г.Н. Близнецова, О.И. Цебржинский\*, А.К. Нацвина, М.И. Рецкий

*Воронежский государственный университет*

*\*Украинская медицинская стоматологическая академия, г.Полтава*

Для оценки локализации преимущественной субклеточной продукции супероксиданиона предложен спектрофотометрический метод с использованием нитросинего тетразолия (НСТ). Данный метод позволяет определить суммарную спонтанную (нестимулированную) продукцию супероксиданиона, а также оценить потенциальную преимущественную генерацию супероксиданиона в митохондриальной и микросомальной электронотранспортной цепи (ЭТЦ). Показано, что токсическое повреждение печени, вызванное введением крысам  $CCl_4$  сопровождается повышением почти на 80 % уровня нестимулированной (спонтанной) продукция  $O_2^{\cdot -}$  в гомогенате печени. НАДН-индуцированная (митохондриальная) генерация  $O_2^{\cdot -}$  возрастает на 166,5 %, а НАДФН – стимулированная (микросомальная) – на 202,1 %.

### ВВЕДЕНИЕ

Имеющиеся к настоящему времени данные позволяют считать, что течение многих патологических процессов сопряжено с интенсификацией процессов свободнорадикального окисления [1]. Это связано с резким увеличением продукции активных форм кислорода (АФК), среди которых центральное место принадлежит супероксиданиону ( $O_2^{\cdot -}$ ) как основному индуктору оксидативного стресса [2]. Практически любое экстремальное состояние организма сопровождаются увеличением продукции АФК, в частности, супероксиданионрадикала. Этот радикал может генерироваться при аэробном дыхании в митохондриях, вследствие недостаточной эффективности переноса электронов во всех компонентах дыхательной цепи. Генерация  $O_2^{\cdot -}$  в заметных количествах происходит при активации цитохром  $P_{450}$  – зависимых оксидоредуктаз эндоплазматического ретикулаума, автоокислении самого цитохрома  $P_{450}$ , функционировании различных мембранносвязанных оксидаз. При этом АФК часто возникают не только спонтанно, но и ферментативно [3].

При изучении роли окислительного напряжения в патогенезе большинства заболеваний представляет интерес не только констатация изменения концентрации  $O_2^{\cdot -}$  и измерения уровня продуктов пероксидного окисления липидов, что является вполне закономерным, а и изучение субклеточной генерации  $O_2^{\cdot -}$  и вклада в этот процесс определенных клеточных органелл.

Предложены разные варианты гистохимических методов для оценки дыхательного взрыва нейтрофи-

лов с использованием нитросинего тетразолия (НСТ) [4, 5], однако точность определения при их использовании мала и зависит от ряда субъективных факторов. Этого недостатка лишен спектрофотометрический метод, предложенный только для нейтрофилов и основанный на том, что нитросиний тетразолий, вступая в реакцию с  $O_2^{\cdot -}$ , превращается в формазан, имеющий максимум поглощения в смеси хлороформ-диметилсульфоксид в пределах 515-565 нм [6].

Целью данного исследования было усовершенствование, оценка возможности и специфичности определения интенсивности образования супероксиданиона в различных субклеточных фракциях спектрофотометрическим методом с использованием нитросинего тетразолия (НСТ) у здоровых животных и животных с токсическим повреждением печени.

### МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Исследования проведены на крысах-самцах с массой тела 200-250 г, содержащихся в стандартных условиях вивария.

У животных опытной группы (n=20) токсический гепатозо-гепатит вызывали внутрибрюшинным двукратным введением один раз в сутки  $CCl_4$  в виде 40% раствора в оливковом масле в дозе 0,2 мл/100 г массы тела [7]. Животным контрольной группы (n=20) в этой же дозе вводили чистое оливковое масло. Исследования проводили через сутки после второго введения  $CCl_4$ .

Разделение клеточных фракций печени осуществляли методом дифференциального центрифугирования [8]. Для получения гомогената печени использовали

0,25 М раствор сахарозы в 50 мМ/л трис-НСI буфере (рН 7,4), содержащем 1мМ/л ЭДТА. Гомогенат в соотношении (1:3 вес/объем) фильтровали через два слоя капрона и центрифугировали при 1000 g в течение 10 минут для отделения неразрушенных клеточных элементов и ядер. Супернатант центрифугировали при 14000 g в течение 15 минут. В надосадочной жидкости, представляющую главным образом цитоплазматическую фракцию и осадке, содержащем митохондрию, определяли интенсивность спонтанной и стимулированной генерации супероксиданиона. Степень перекрестного загрязнения субклеточных фракций печени оценивали по активности маркерных ферментов – лактатдегидрогеназы (цитозольный маркер) и сукцинатдегидрогеназы (митохондриальный маркер) [9]. Белок определяли биуретовым методом. Измерение оптической плотности проводили на спектроколориметре “Spekol 210”. Статистическую обработку полученных данных проводили с использованием прикладной программы “Statistica 5.0”. Достоверность различий оценивали методом парных сравнений с использованием t-критерия Стьюдента.

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Метод основан на том, что использование в качестве индуктора НАДН, позволяет оценить потенциальную преимущественную генерацию супероксиданиона главным образом в митохондриальной электротранспортной цепи (ЭТЦ), а НАДФН – в микросомальной ЭТЦ.

Предлагается следующий вариант проведения исследования.

0,3 г печени гомогенизируют в 2,7 мл 0,03 М фосфатного буфера рН 7,4. По 0,05 мл гомогената помещают в 3 пробирки (“А”, “Б” и “В”). В пробу “А” добавляют 0,05 мл фосфатного буфера раствора (рН 7,4) для определения спонтанной генерации супероксиданиона. В пробу “Б” – 0,05 мл 0,3% раствора НАДФН для определения преимущественной продукции супероксиданиона в микросомальной ЭТЦ. В пробу “В” – 0,05 мл раствора 0,3 % НАДН для определения преимущественной генерации супероксиданиона в митохондриальной ЭТЦ.

Содержимое всех проб перемешивают и преинкубируют при 37 °С в течение 30 мин для пробы “А” и 10 мин для проб “Б” и “В”. Затем добавляют по 0,05 мл 0,2% раствора НСТ на трис-буфере (рН 7,4) в каждую пробирку, перемешивают и пробу “А” инкубируют при 37 °С в течение 30 мин, пробы “Б” и “В” – 5 мин.

Для элюирования окрашенного формазана используют смесь диметилсульфоксид-хлороформ в объемном соотношении 2:1. В каждую пробу добавляют по 2,0 мл смеси и взбалтывают 1 мин. Затем

пробы центрифугируют 10 мин при 1000 g. Оптическую плотность окрашенного супернатанта определяют при  $\lambda = 540$  нм.

В качестве контроля используют: 1) при определении спонтанной генерации (проба “А”) – 0,05 мл фосфатного буфера + 0,05 мл НСТ + 0,05 мл воды; 2) при определении генерации супероксиданиона в микросомальной ЭТЦ (проба “Б”) – 0,05 мл фосфатного буфера + 0,05 мл НСТ + 0,05 мл НАДФН; 3) при определении генерации супероксиданиона в митохондриальной ЭТЦ (проба “В”) – 0,05 мл фосфатного буфера + 0,05 мл НСТ + 0,05 мл НАДН. Контрольные пробы инкубируют так же 10 и 30 мин, соответственно, при 37 °С и элюируют окрашенный формазан указанной смесью.

Для построения калибровочной кривой 0,2 г НСТ растворяют в 100 мл трис-буфера рН 7,4. В пробирки отмеряют 0,01; 0,02; 0,05; 0,07; 0,1 и 0,2 мл 0,2% раствора НСТ, добавляют по 0,1 мл 0,1Н КОН и по 0,1 мл 10 мМ раствора аскорбиновой кислоты, перемешивают и инкубируют 10 мин при 37 °С. Затем добавляют по 2 мл элюирующей смеси и определяют оптическую плотность проб при 540 нм.

По калибровочному графику находят количество супероксиданиона в нМоль  $O_2^{\cdot -}$ , содержащегося в пробе.

Расчет производят по формуле: ИПС (нМоль  $O_2^{\cdot -}$  /гхсек) =  $A \times K$ , где ИПС – интенсивность продукции супероксиданиона; А – величина продукции  $O_2^{\cdot -}$  в нМоль, найденная по калибровочному графику; К – коэффициент пересчета на грамм в сек с учетом навески и времени инкубации. Для пробы “А”  $K=11,11$ , а для проб “Б” и “В”  $K=66,67$ .

При использовании данного метода установлено, что величина спонтанной (нестимулированной) продукции супероксиданиона в гомогенате печени здоровых животных колеблется в пределах от 0,30 до 0,60 нмоль  $O_2^{\cdot -}$ /гхсек, а величины НАДН- и НАДФН-стимулированной продукции  $O_2^{\cdot -}$  примерно одинаковы и составляют от 5 до 12 нмоль  $O_2^{\cdot -}$ /гхсек.

Для подтверждения правомочности использования НАДН и НАДФН в качестве селективных индукторов генерации  $O_2^{\cdot -}$  соответственно в митохондриальной ЭТЦ и в микросомальной ЭТЦ, была изучена степень стимуляции продукции супероксиданиона в митохондриальной и цитоплазматической фракциях. При выделении субклеточных фракций перекрестное загрязнение для цитоплазматической фракции по активности СДГ составило 11,2 %, а митохондриальной фракции – по ЛДГ- 7,2 %, что свидетельствует о достаточной степени чистоты полученных субклеточных фракций (табл. 1).

Далее было проведено определение величин спонтанной, НАДН- и НАДФН-стимулированной

## Активность СДГ и ЛДГ в субклеточных фракциях печени крыс

Субклеточная фракция	Активность ЛДГ		Активность СДГ	
	ФЕ	ФЕ/мг белка	ФЕ	ФЕ/мг белка
Цитоплазматическая	59,8 ± 1,95	175,9 ± 1,32	3,2 ± 0,21	9,5 ± 0,38
Митохондриальная	2,3 ± 0,17	13,7 ± 1,51	12,9 ± 0,60	76,4 ± 1,04

Таблица 2

Интенсивность продукции  $O_2^{\bullet}$  в цитоплазматической и митохондриальной фракциях печени здоровых крыс

Субклеточная фракция	Продукция $O_2^{\bullet}$ , нмоль/г×сек		
	Спонтанная	НАДФН-стимулированная	НАДН-стимулированная
Цитоплазматическая	1,30 ± 0,081	17,44 ± 0,630	5,21 ± 0,184
Митохондриальная	0,28 ± 0,010*	4,17 ± 0,261*	16,87 ± 1,614*

Таблица 3

Влияние  $CCl_4$  на уровень спонтанной, НАДН- и НАДФН-стимулированной продукции  $O_2^{\bullet}$  в печени крыс

Группа животных	Продукция $O_2^{\bullet}$ , нмоль/г×сек		
	Спонтанная	НАДН-стимулированная	НАДФН-стимулированная
Контроль	0,50 ± 0,021	6,34 ± 0,082	7,25 ± 0,098
$CCl_4$	0,83 ± 0,024*	14,36 ± 0,512*	20,04 ± 0,987*

продукции  $O_2^{\bullet}$  в каждой из фракции. Как видно из данных представленных в таблице 2 спонтанная генерация супероксиданиона в норме у здоровых животных в цитоплазматической фракции значительно выше (в 4,6 раза), чем в митохондриальной, что связано, очевидно, с его постоянной продукцией в микросомальной ЭТЦ печени, где постоянно протекают процессы микросомального окисления [10].

НАДФН-стимулированная продукция супероксиданиона в цитоплазматической фракции превышала уровень НАДН-стимулированной генерации в 3,3 раза. Для митохондриальной фракции в большей степени была выражена НАДН-стимулированная генерация  $O_2^{\bullet}$ , которая превышала НАДФН-стимулированную более, чем в 4 раза.

Чтобы убедиться в правильности наших рассуждений представляло интерес оценить интенсивность продукции супероксиданиона в печени при применении животным вещества, активирующего процессы микросомального окисления. В качестве такого агента был выбран тетрахлорметан, который поступая в организм превращается в радикал  $CCl_3^{\bullet}$ , инициирую-

щий свободнорадикальное окисление (СРО) [11].

Как видно из данных, представленных в таблице 3, в печени крыс контрольной группы интенсивность стимулированной генерации  $O_2^{\bullet}$  в митохондриальной и микросомальной ЭТЦ находится примерно на одинаковом уровне.

При интенсификации СРО тетрахлорметаном спонтанная продукция  $O_2^{\bullet}$  в гомогенате печени статистически достоверно увеличивалась на 76,7%, НАДН-индуцированная (преимущественно митохондриальная) генерация  $O_2^{\bullet}$  возрастает в 1,66 раза, а НАДФН-стимулированная (преимущественно микросомальная) – на 202,1%. Более существенное увеличение продукции супероксиданиона в микросомальной ЭТЦ связано с ведущей ролью в механизме биотрансформации  $CCl_4$  цитохрома  $P_{450}$  микросомальной фракции.

Конечно при интерпретации полученных результатов необходимо учитывать, что кроме  $O_2^{\bullet}$ , электроны могут поступать и от других источников. В частности в микросомальном окислении это НАДФН-оксидоредуктаза (КФ1.6.99.1), НАДФН-феррицитохром С-2-оксидоредуктаза (КФ1.6.2.5), а

в митохондриальном – НАДН-дегидрогеназа (КФ1.6.99.3), липоамиддегидрогеназа (КФ1.6.4.3). Следует учитывать также наличие системы НАДН-цитохром P<sub>450</sub> в мембранах эндоплазматического ретикулума [12] и системы НАДФН-цитохром P<sub>450</sub> в мембранах митохондрий [13].

Таким образом, при использовании в качестве селективных индукторов генерации O<sub>2</sub><sup>•</sup> НАДН и НАДФН можно с определенной степенью вероятности судить об интенсивности продукции супероксиданиона в митохондриальной или микросомальной ЭТЦ. Однако с учетом наличия системы НАДН-цитохром-оксидоредуктаз в мембранах эндоплазматического ретикулума и системы НАДФН-цитохром-оксидоредуктаз в митохондриях, правильнее говорить о потенциальной преимущественной стимулированной генерации O<sub>2</sub><sup>•</sup> в тех или иных субклеточных компартментах.

Представление о субклеточной локализации основных источников образования O<sub>2</sub><sup>•</sup> при том или ином воздействии позволяет направленно влиять на интенсивность проявления оксидативного стресса. Так, в частности, воздействуя на микросомальные механизмы генерации O<sub>2</sub><sup>•</sup> можно существенно ослабить повреждающие эффекты гепатотропных ядов.

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Зенков Н.К., Ланкин В.З., Меньщикова Е.Б.* Оксидативный стресс. Биохимический и патофизиологический аспекты. М.: МАИК “Наука / Интерпериодика”, 2001. - 343 с.
2. *Осипов А.Н., Азизова Ю.А., Владимиров Ю.А.* /Успехи биол. химии. 1990. Т. 31. №2. С.180-208.
3. *Han. D., Antunes F., Canali R. et al.* //J.Biol.Chem. 2002. V.65. №3. P.289-297.
4. *Долгушин И.И., Бухарин О.В.* Нейтрофилы и гомеостаз. Екатеринбург: УрО РАН, 2001. -278 с.
5. *Маянский А.Н., Пикуза О.И.* Клинические аспекты фагоцитоза. Казань.: Магариф, 1993. -192 с.
6. *Metcalf J.A., Gallin J.I., Nauseef W.M. et al.* Laboratory manual of neutrophil function. N.-Y.: Raven Press, 1986. -192 p.
7. *Кутина С.Н., Зубахин А.А.* //Бюлл. exper. биол. и мед. 2000. Т.129. №6. С. 620-622.
8. *Кочетов Г.А.* Практическое руководство по энзимологии. М.: Высшая школа, 1980. 270 с.
9. *Guilbault G.G.* Handbook of enzymatic methods of analysis. N.-Y.: Marcel Dekker, 1976. 300 p.
10. *Morehouse L. A., Aust S. D.* // Basic Life Sci. 1988. V. 49. P. 517-521.
11. *Wen Zhu, Fung P.C.W.* // Free Radic.Biol. Med. 2000. V.29. №9. P.870-880.
12. *Mohazzab K. M., Wolin M. S.* //Am. J. Physiol. 1994. V.267. №6. P. L823-L831.
13. *Zhang L., Yu L., Yu C. A.* //J.Biol.Chem. 1998. V.273. № 51. P.33972-33976.