

УДК 616.36.-002:678.044.42:599.323.4

## ИССЛЕДОВАНИЕ ВЛИЯНИЯ РАЗЛИЧНЫХ ДОЗ ТИОКТОВОЙ КИСЛОТЫ НА АКТИВНОСТЬ ГЛУТАТИНОВОЙ СИСТЕМЫ В ПЕЧЕНИ КРЫС В НОРМЕ И ПРИ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОМ ТОКСИЧЕСКОМ ГЕПАТИТЕ

© 2005 г. А.В. Волоскова, Т.Н. Попова, Л.В. Матасова

*Воронежский государственный университет*

Проведено исследование влияния различных доз тиоктовой кислоты на активность антиоксидантной глутатионзависимой системы. Выявлено, что степень мобилизации данной системы, вызванная токсическим поражением печени  $CCl_4$ , снижалась под действием тиоктовой кислоты. При этом содержание восстановленного глутатиона в гомогенате печени крыс изменялось в сторону нормы. Так, при введении тиоктовой кислоты в дозе 16 мг/кг и 35 мг/кг животным с токсическим поражением печени уровень восстановленного глутатиона снижался в 1,2 и 1,8 раза, соответственно. Это сопровождалось уменьшением активности глутатионредуктазы и глутатионпероксидазы под действием тиоктовой кислоты на фоне развития токсического гепатита. Таким образом, проведенные исследования показали, что тиоктовая кислота может выступать как фактор, регулирующий степень развития окислительного стресса и состояние глутатионовой антиоксидантной системы.

### ВВЕДЕНИЕ

Известно, что спектр биологического действия антиоксидантов весьма разнообразен и обусловлен в основном их защитными функциями, выраженными в способности нейтрализовать негативное действие свободных радикалов [1]. С развитием современных представлений об “окислительном стрессе” и пероксидном окислении липидов (ПОЛ) как об универсальном патогенетическом механизме повреждения клеток и тканей связано формирование новых подходов в лечении заболеваний дисметаболической природы. Известно, что наличие в структуре молекулы тиоктовой кислоты (ТК) активных тиоловых групп, способных обезвреживать разнообразные токсические вещества, придает ей свойства физиологического антиоксиданта [2]. Помимо того, что ТК является звеном эндогенной антиоксидантной системы организма, она также выступает в качестве кофактора ряда метаболических процессов ( $\alpha$ -кетоглутаратдегидрогеназного, пируватдегидрогеназного и дегидрогеназного комплекса), нормализуя энергетический, углеводный и липидный обмен [3]. К основным компонентам глутатионовой антипероксидантной системы, являющейся частью общей антиоксидантной системы организма, относят глутатион, глутатионредуктазу (ГР) и глутатионпероксидазу (ГП), которые при участии NADPH защищают клетки от окислительного стресса. Восстановленная форма глутатиона (GSH) проявляет антиоксидантные свойства, взаимодействуя со свободными радикалами, а

также служит субстратом для ГП [4]. В последние годы широко обсуждается патогенетическая роль активных форм кислорода и инициируемых ими процессов ПОЛ в развитии тяжелых заболеваний, в том числе и токсических повреждений печени. При этом установлено, что изменения активности антиоксидантной системы приводит к накоплению высокотоксических интермедиатов ПОЛ, нарушающих общий гомеостаз организма. В связи с этим нами было предпринято исследование влияния различных доз ТК на активность глутатионовой антиоксидантной системы как одного из возможных механизмов терапевтического действия этого агента при токсическом поражении печени крыс.

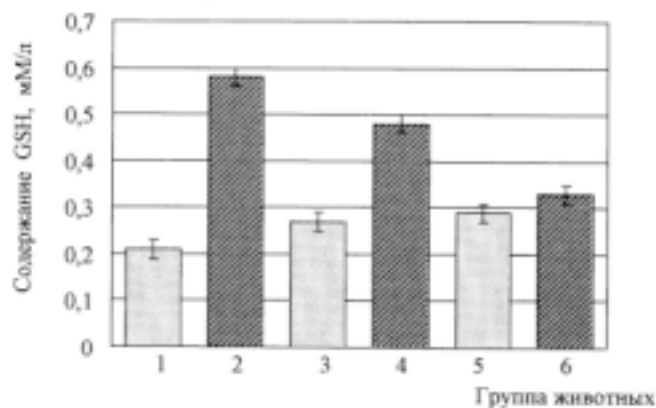
### МЕТОДИКА ИССЛЕДОВАНИЯ

Объектом исследования служили самцы белых лабораторных крыс (*Rattus rattus* L.) массой 150-200г. Крысы были разделены на 6 экспериментальных групп: в 1-й группе (контроль; n = 8) животных содержали на стандартном режиме вивария; во 2-й группе (n = 8) животным для индуцирования токсического гепатита вводили гепатотропный токсин  $CCl_4$  в дозе 0,064 мл на 100 г веса после суточной пищевой депривации, максимальный цитолиз гепатоцитов имел место на 3 сутки после однократного введения токсина [5]; в 3-й группе (n = 5) интактным животным внутрибрюшинно вводили тиоктовую кислоту (16 мг/кг), ежедневно в течение 3-х дней; в 4-й группе (n = 7) животным после индуцирования токсичес-

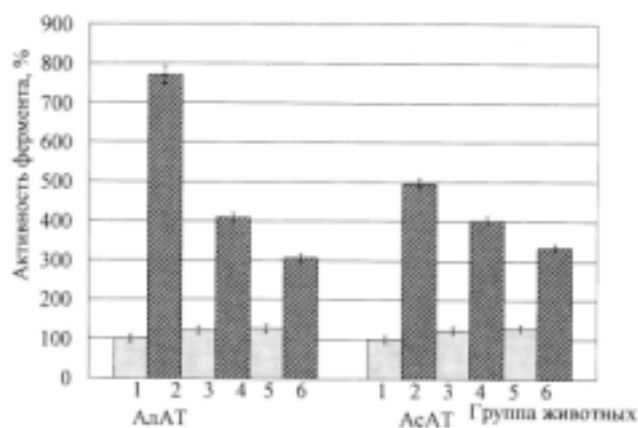
кого гепатита вводили ТК в той же дозе в течение 3-х дней; в 5-й группе (n = 5) интактным животным внутривенно вводили ТК (35 мг/кг), ежедневно в течение 3-х дней; в 6-й группе (n = 8) животным после индуцирования токсического гепатита вводили ТК в дозе 35 мг/кг в течение 3-х дней. Печень у животных извлекали под наркозом после перфузирования физиологическим раствором. Для получения гомогената навеску печени крысы гомогенизировали в 4-х кратном объеме охлажденной среды выделения (0,1М трис-НСl-буфер (рН 7,8), содержащий 1мМ ЭДТА и 1% β-меркаптоэтанол). Гомогенат центрифугировали при 7000g в течение 10 мин. Активность исследуемых ферментов определяли спектрофотометрически при 340 нм. За ферментативную единицу (ФЕ) принимали количество фермента, катализирующее превращение микромоля субстрата или образование микромоля продукта за 1 мин при 25 °С. Концентрацию GSH определяли с помощью реакции с 5,5- дитио- бис- (2-нитробензойной) кислотой [6]. Для определения активностей АлАТ и АсАТ использовали стандартные наборы «Bio-La-Test». Общий белок определяли по методу Лоури. Определение содержания первичных продуктов ПОЛ – диеновых конъюгатов (ДК) оценивали спектрофотометрически 233 нм [7]. Опыты повторяли 3-4 раза, аналитические определения для каждой пробы – 2 раза. Данные обрабатывали с использованием t – критерия Стьюдента, различия считали достоверными при p < 0,05. Использовали изоцитрат (“Sigma”), НАДФН, трис-НСl-буфер, ЭДТА (“Reanal”), тиоктовую кислоту, глутатион окисленный и восстановленный (“ICN”), остальные реактивы отечественного производства марки «хч» или «чда».

### РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Исследования показали, что при экспериментальном токсическом гепатите (ЭТГ), вызванном действием CCl<sub>4</sub>, уровень GSH в гомогенате печени крыс повышается в 2,8 раза по сравнению с контролем. При этом существует тенденция снижения содержания GSH с увеличением дозы ТК на фоне развития ЭТГ. Так, при введении ТК, животным с пораженной печенью, в дозе 16 мг/кг уровень GSH снижался в 1,2 раза, а в дозе 35 мг/кг в 1,8 раза (рис.1). Вероятно, изменение содержания GSH в сторону нормы может быть сопряжено со снижением интенсивности свободнорадикального окисления под действием ТК, которая может выступать донором сульфгидрильных групп, замещая GSH. Однако при введении ТК контрольным животным в дозе 16 мг/кг и 35 мг/кг уровень GSH возрастал в 1,3 и 1,4 раза, со-



**Рис. 1.** Содержание восстановленного глутатиона: в норме (1); при экспериментальном токсическом гепатите (2); при введении тиоктовой кислоты в дозе 16 мг/кг контрольным животным (3); при введении тиоктовой кислоты в дозе 16 мг/кг животным с пораженной печенью (4); при введении тиоктовой кислоты в дозе 35 мг/кг контрольным животным (5); при введении тиоктовой кислоты в дозе 35 мг/кг животным с пораженной печенью (6).



**Рис. 2.** Активности АлАТ и АсАТ в сыворотке крови крыс: в норме (1); при экспериментальном токсическом гепатите (2); при введении тиоктовой кислоты в дозе 16 мг/кг контрольным животным (3); при введении тиоктовой кислоты в дозе 16 мг/кг животным с пораженной печенью (4); при введении тиоктовой кислоты в дозе 35 мг/кг контрольным животным (5); при введении тиоктовой кислоты в дозе 35 мг/кг животным с пораженной печенью (6).

ответственно. Полученные результаты согласуются с данными о том, что ТК не только обладает самостоятельным антиоксидантным потенциалом, но и обеспечивает мощную поддержку работы других антиоксидантных звеньев в организме. В этом отношении ее протекторное действие тесно связано с гомеостазом в системе глутатиона [8].

При ЭТГ происходило возрастание удельной активности ГП более чем в 3 раза и ГР более чем в 2 раза. При введении животным с токсическим поражением печени ТК в дозе 16 мг/кг и 35 мг/кг наблюдалось

Активность глутатионпероксидазы и глутатионредуктазы в печени крыс в норме, при экспериментальном токсическом гепатите и действии тиоктовой кислоты

Группа животных	Активность глутатионпероксидазы		Активность глутатионредуктазы	
	ФЕ/ мг белка	ФЕ/ г с.м.	ФЕ/ мг белка	ФЕ/ г с.м.
1-я	0,012±0,001	0,135±0,006	0,068±0,002	0,780±0,031
2-я	0,040±0,002*	0,62±0,028*	0,128±0,003*	1,193±0,044*
3-я	0,020±0,001*	0,235±0,011*	0,069±0,002	0,79±0,032
4-я	0,025±0,001*	0,39±0,015*	0,113±0,004*	1,06±0,041*
5-я	0,013±0,001	0,195±0,008*	0,069±0,002	0,79±0,031
6-я	0,015±0,001*	0,280±0,012*	0,085±0,003*	0,82±0,034*

Примечание: \* – отличия от нормы достоверны (уровень значимости  $P < 0,05$ )

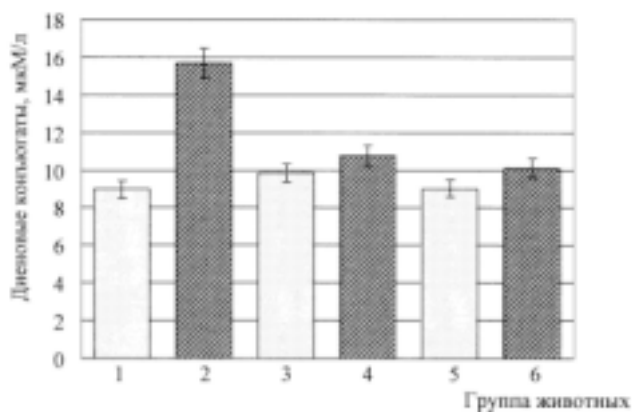


Рис. 3. Уровень диеновых конъюгатов: в норме (1); при экспериментальном токсическом гепатите (2); при введении тиоктовой кислоты в дозе 16 мг/кг контрольным животным (3); при введении тиоктовой кислоты в дозе 16 мг/кг животным с пораженной печенью (4); при введении тиоктовой кислоты в дозе 35 мг/кг контрольным животным (5); при введении тиоктовой кислоты в дозе 35 мг/кг животным с пораженной печенью (6).

уменьшение удельной активности ГП на 37,5% и 62,5%, а ГР на 11,7% и 33,6% по сравнению с данными полученными для 2-ой опытной группы (табл.1).

Для оценки состояния клеток печени и уровня свободнорадикального окисления измеряли активности АлАТ и АсАТ в сыворотке крови, а также уровень ДК в норме, при ЭТГ и при введении ТК. На 3-й день развития ЭТГ активность АлАТ возрастала более чем в 7 раз и АсАТ ~ 4,9 раза. Уровень ДК увеличивался в 1,8 раза по сравнению с нормой. Однако при введении ТК в дозе 16 мг/кг и 35 мг/кг активность АлАТ снижалась в 1,9 и 2,5 раза, а активность АсАТ в 1,2 и 1,5 раза по сравнению с животными подвергнутыми ЭТГ (рис.2). Также происходило снижение уровня ДК у животных с поражен-

ной печенью под действием ТК. Показано, что при введении ТК в дозе 16 мг/кг животным с ЭТГ уровень ДК снижался в 1,5 раза, а в дозе 35 мг/кг в 1,6 раза по сравнению с животными 2-ой опытной группы (рис.3). После введения ТК контрольным животным активности АлАТ и АсАТ, а также уровень ДК достоверно не отличались от нормы.

Таким образом проведенные исследования показали, что ТК, обладая антиоксидантными свойствами, может оказывать позитивное действие на функционирование глутатионовой антиоксидантной системы. Выявлено, что ТК нормализует работу данной системы при токсическом гепатите, который сопровождается оксидативным стрессом.

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Кулинский В.И. Активные формы кислорода и оксидативная модификация макромолекул: польза, вред и защита / В.И. Кулинский // Соросовский Образовательный Журнал. – 1999. – Т.38, №1. – С.2-7.
- Zacharias E. Suntres Prophylaxis against lipopolysaccharide-induced liver injuries by lipoic acid in rats / E. Suntres Zacharias // Pharmacological Research. – 2003. -№ 48. – P. 585-591.
- Packer L.  $\alpha$ -Lipoic acid: a metabolic antioxidant which regulates NF-kB signal transduction and protects against oxidative injury / L. Packer // Drug Matab. Rev. -1998. – № 30. – P. 245-275.
- Matsubara L.S. Age-related changer of glutathione content, glutathione reductase and glutathione peroxidase activity of human erythrocytes / L.S. Matsubara, Machado P.E. // Braz. J. Med. Res. – 1991. – №24. – P. 449-551.
- Горожанская Э.Г. Роль глутатионзависимых пероксидаз в регуляции утилизации липопероксидов в злокачественных опухолях / Э.Г. Горожанская,

В.Б. Ларионова, Г.Н. Зубрихина [и др]. // Биохимия. – 2001. – том 66, вып. 2. – С. 273-278.

6. Сидорова В.Ф. Регенерация печени у млекопитающих / В.Ф. Сидорова, З.А. Рябина. – М.: Медицина, 1996.

7. Стальная И.Д. Современные методы в биохимии / И.Д. Стальная, Т.Г. Гаришвили. – М.: Медицина, 1997. – С.63-64.

8. Arivazhagan P. Effect of DL- $\alpha$ -lipoic acid on glutathione metabolic enzymes in aged rats / P. Arivazhagan, K. Ramanathan, C. Pannerselvam. // Exp. Gerontol. – 2001. – № 37. – P. 81-87.