

АКТИВАЦИЯ ГЛУТАТИОНЗАВИСИМОЙ АНТИОКСИДАНТНОЙ СИСТЕМЫ В ПЕЧЕНИ КРЫС ПРИ ИНТОКСИКАЦИИ СУЛЬФАТОМ ГИДРАЗИНА

М. М. Свиридов, Т. Н. Попова, А. В. Семенихина

Воронежский государственный университет

Проведено исследование содержания глутатиона и активности ферментов глутатионредуктазной/глутатионпероксидазной антиоксидантной системы в печени крыс при интоксикации сульфатом гидразина. Показано изменение данных показателей в зависимости от времени интоксикации.

ВВЕДЕНИЕ

Среди большого количества химических соединений, с которыми в последние десятилетия непрерывно возрастает вероятность контакта человека, гидразин и его производные занимают особое место. Их широкое применение в медицине, пищевой и сельскохозяйственной промышленности значительно увеличивает количество лиц, контактирующих с данными веществами, что повышает риск возникновения острых и хронических отравлений.

Существуют данные, подтверждающие участие систем антиоксидантной защиты и, в частности, системы глутатиона, в процессах детоксикации гидразина и его производных [1—3]. Имеются отдельные сведения о влиянии гидразина и его производных на протекание реакций свободнорадикального окисления и уровень восстановленного глутатиона в клетках экспериментальных животных.

Исходя из этого, целью работы явилось изучение роли глутатионзависимой антиоксидантной системы в процессах метаболизма гидразина.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

В качестве объекта исследования использовались взрослые лабораторные белые крысы (*Rattus rattus L.*), самцы массой 180—200 г. Животные содержались на стандартном рационе питания вивария. Токсическое повреждение печени моделировали внутрибрюшинным введением сульфата гидразина в расчете 2 ммоль/кг [4]. Забой животных производили после 3, 6, 12 и 24 часов от момента введения токсического агента. Контрольным животным вводили соответствующую аликвоту физиологического раствора с 2 ммоль/кг Na_2SO_4 . Печень извлекали после многократного перфузирования ледяным физиологическим раствором.

Навеску ткани печени гомогенизировали в 3-кратном объеме среды выделения следующего состава: 50 ммоль/л трис-НСI буфер (рН 7,8), содержащий 1 ммоль/л ЭДТА, 0,01% β -меркаптоэтанол. Гомогенат фильтровали и центрифугировали при 5000 г в течение 10 мин.

Для определения активности аланинаминотрансферазы (АЛТ) и аспартат-аминотрансферазы (АСТ) в сыворотке крови использовали стандартные наборы для биохимических исследований (LA СHEMA). Оптическую плотность определяли на спектрофотометре СФ-56 при длине волны 530 нм.

Активность глутатионзависимых ферментов определяли спектрофотометрически на СФ-56 при 340 нм. О скорости протекания реакции судили по уменьшению оптической плотности опытных образцов в результате окисления НАДФН. За единицу активности принимали количество фермента, катализирующее образование 1 мкмоль продукта за 1 мин при 25 °С. Активность ферментов выражали в Е на мг белка и или в Е на г сырой массы. Содержание белка определяли по методу Лоури [5].

Метод определения концентрации восстановленного глутатиона (GSH) основан на взаимодействии SH-групп с 5,5-дитио-бис-(2-нитробензойной) кислотой (реактив Элмана) в результате чего в эквимольных количествах образуется окрашенный тионитрофенильный анион (ТНФА), имеющий максимум поглощения при 412 нм [6].

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Согласно литературным данным, метаболизм гидразина клетками печени крыс может проходить по двум путям — образование конъюгатов главным образом с восстановленным глутатионом и окисление микросомальной оксидазой P_{450} до азота [1, 2, 7]. Оба процесса начинаются с формирования

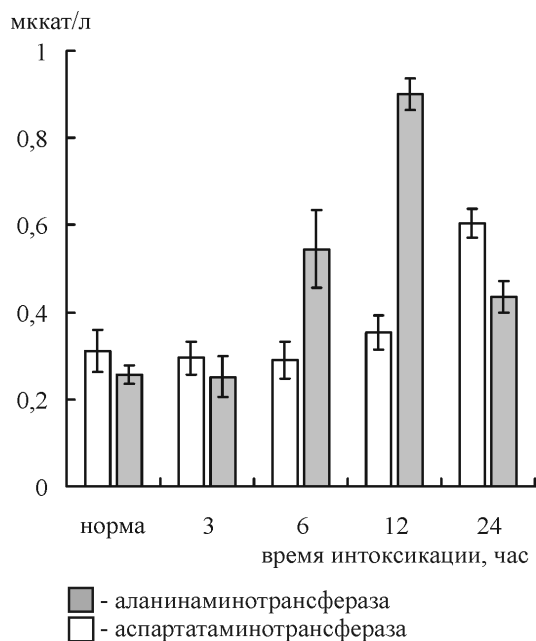


Рис. 1. Активность аланинаминотрансферазы и аспаратаминотрансферазы в сыворотке крови крыс контрольной группы и при интоксикации сульфатом гидразина

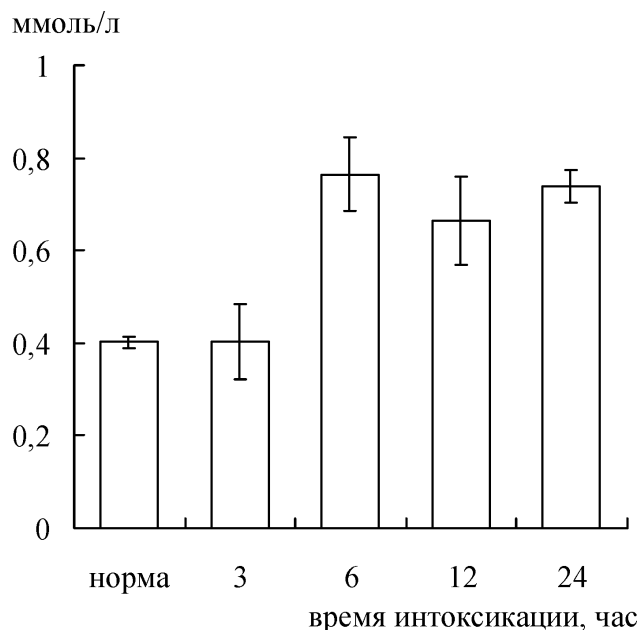


Рис. 2. Концентрация восстановленного глутатиона в печени крыс в норме и при развитии патологии

свободного радикала гидразина. Окисление гидразина до азота сопровождается образованием супероксидного анион-радикала и, как следствие активацией процессов пероксидного окисления липидов (ПОЛ).

В динамике развития интоксикации наблюдается увеличение активности аланинаминотрансферазы в 4 раза к 12 часам и аспаратаминотрансферазы в 2,4 раза к 24 часам интоксикации (рис. 1), что свидетельствует о цитолизе гепатоцитов. Низкие активности трансаминаз в сыворотке крови крыс в первые часы развития патологии могут быть связаны с ингибирующим действием гидразина на активность пиридоксальзависимых ферментов [4, 8].

Через 3 часа не происходит достоверного изменения концентрации восстановленного глутатиона в гомогенате печени. К 6 часам воздействия гидразина наблюдалось увеличение его концентрации в 3,3 раза в гомогенате печени крыс (рис. 2).

Повышение концентрации восстановленного глутатиона в клетках печени крыс с 6 часа воздействия токсического агента может быть связано как с процессом синтеза *de novo* [9], так и с восстановлением окисленного глутатиона в сопряженной системе НАДФН-глутатионредуктазы (ГР)/глутатионпероксидазы (ГП) [9, 10].

К 3 часу развития патологии происходит снижение удельной активности ГР в 3,6 раза, а значение ферментативной активности, выраженной на

г сырой массы уменьшается в 1,7 раз (рис. 3). Удельная активность фермента восстанавливалась на 6 час воздействия гидразина на организм крысы, и постепенно снижалась к 24 часу интоксикации. Сходное изменение ферментативной активности было получено при исследовании активности ГП в гомогенате печени крыс. К 3 часу наблюдается снижение удельной активности фермента в 3,8 раза, по сравнению с контрольными значениями (рис. 4). В дальнейшем происходит увеличение удельной активности ГП на 50% к 12 часу, а значение ферментативной активности, выраженной на грамм сырой массы увеличивается в 2,5 раз (рис. 4). Уменьшение активностей ГР и ГП в первые часы развития патологии может быть связано с ингибирующим влиянием гидразина на активность ферментов [4,11]. Наблюдаемое восстановление или увеличение ферментативной активности ГР и ГП в более позднее время (6—12 часов) свидетельствует об активации глутатионзависимой антиоксидантной системы в печени крыс.

Работа поддержана проектом по программе «Развитие научного потенциала высшей школы» РНП 2.1.1.4429.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Kleno T.G. Mechanisms of hydrazine toxicity in rat liver investigated by proteomics and multivariate data analysis / T.G. Kleno, L.R. Leonardsen, H.O. Kjeldal et al. // *Proteomics*. — 2004. — V.4, N.3. — P. 868—880.

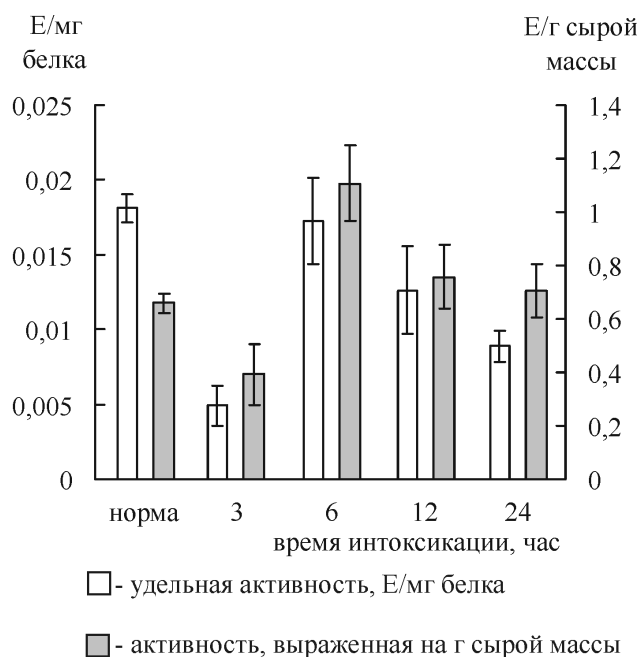


Рис. 3. Активность глутатионредуктазы в гомогенате печени крыс в норме и при интоксикации сульфатом гидразина

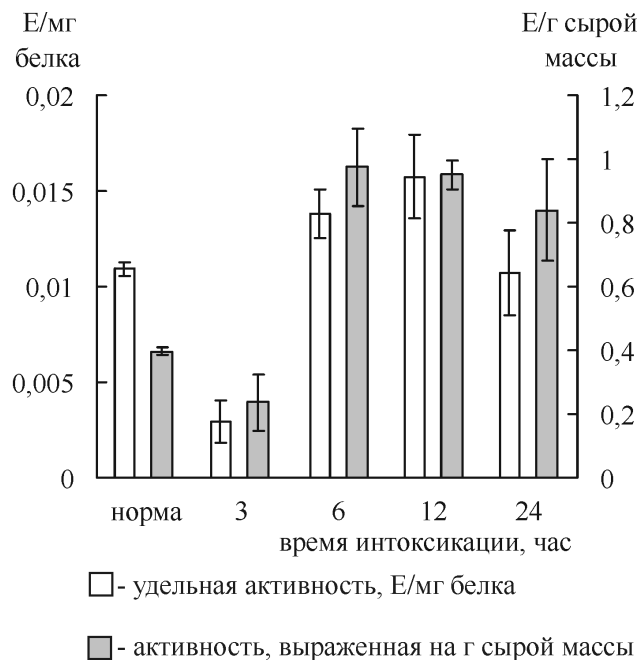


Рис. 4. Активность глутатионпероксидазы в гомогенате печени крыс в норме и при развитии патологии

2. Trohalaki S. Risk Assessment of High-Energy Chemicals by in Vitro Toxicity Screening and Quantitative Structure-Activity Relationships / S. Trohalaki, R.J. Zellmer, R. Pachter et al. // *Toxicol. Sci.* — 2002. — V.68. — P. 498 — 507.

3. Rummyantseva G.V. Transition Metal-catalyzed Reactions in the Microsomal Metabolism of Alkyl Hydrazines to Carbon-centered Free Radicals / G.V. Rummyantseva, C.H. Kennedy, R.P. Mason // *J. Biol. Chem.* — 1991. — V. 266, N.32. — P. 21422—21427.

4. Ray P.D. Inhibition by Hydrazine of Gluconeogenesis in the Rat / P.D. Ray, R.L. Hanson, H.A. Lardy // *J. Biol. Chem.* — 1970 — V.245. — P.690 — 696.

5. Lowry O. Protein measurement with the Folin-Phenol reagent / O. Lowry, N. Rosebrough, A. Farr // *J. Biol. Chem.* — 1951. — V. 194, №1. — P. 265—271.

6. Бузлама В.С. Методическое пособие по изучению процессов перекисного окисления липидов и систем антиоксидантной защиты организма у животных. — Воронеж, 1997.

7. Noda A. Hydrazine radical formation catalyzed by rat microsomal NADPH-cytochrome P-450 reductase / A. Noda, H. Noda, A. Misaka et al. // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* — 1988 — V.153, N.1. — P. 256—260.

8. Runge-Morris M. Effects of hydrazine, phenelzine, and hydralazine treatment on rat hepatic and renal drug-metabolizing enzyme expression / M. Runge-Morris, Y. Feng, R.C. Zangar et al. // *Drug Metab. Dispos.* — 1996. — V.24. — P. 734—737.

9. Гулак П.В. Гепатоцит: функционально-метаболические свойства / П.В. Гулак, Л.М. Дудченко, В.В. Зайцев и др. — М.: Наука, 1985. — 272с.

10. Кения М.В. Роль низкомолекулярных антиоксидантов при окислительном стрессе / М.В. Кения, А.И. Лукаш, Е.П. Гуськов // *Успехи сов. биол.* — 1993. — Т.113, вып.4. — С. 456—469.

11. Preece N.E. Investigation of lipid peroxidation induced by hydrazine compounds in vivo in the rat. / N.E. Preece, J.A. Timbrell // *Pharmacol. Toxicol.* — 1989. — V.64, N.3. — P. 282—285.