

## ФУНКЦИОНИРОВАНИЕ ГЛУТАТИОНПЕРОКСИДАЗНОЙ/ ГЛУТАТИОНРЕДУКТАЗНОЙ СИСТЕМЫ В ТКАНЯХ КРЫС ПРИ ДЕЙСТВИИ ЦИТРАТА НА ФОНЕ РАЗВИТИЯ ТИРЕОТОКСИКОЗА

О. А. Сафонова, Т. Н. Попова, Л. Саиди

*Воронежский государственный университет*

Поступила в редакцию 11.02.2011 г.

**Аннотация.** Выявлено снижение активности глутатионпероксидазы, глутатионредуктазы и глюкозо-6-фосфатдегидрогеназы в тканях крыс с тиреотоксикозом, которым вводили цитрат, по сравнению со значениями при патологии, то есть их изменение в сторону нормы. Содержание восстановленного глутатиона в тканях животных, изменяющееся при экспериментальном гипертиреозе, после введения цитрата также приближается к контрольным величинам.

**Ключевые слова:** крысы, тиреотоксикоз, цитрат, печень, сердце, сыворотка крови, восстановленный глутатион, глутатионпероксидаза, глутатионредуктаза, глюкозо-6-фосфатдегидрогеназа, НАДФ-изоцитратдегидрогеназа.

**Abstract.** Glutathione peroxidase, glutathione reductase and glucose-6-phosphate dehydrogenase activities decrease has been observed in tissues of rats with hyperthyroidism after citrate injections in comparison with pathological meanings. So, their changes to the side of norm take place. Reduced glutathione content in animals tissues, changing under experimental hyperthyroidism, also comes nearer to norm after citrate injections.

**Keywords:** rats, hyperthyroidism, citrate, liver, heart, blood serum, reduced glutathione, glutathione peroxidase, glutathione reductase, glucose-6-phosphate dehydrogenase, NADP-isocitrate dehydrogenase.

### ВВЕДЕНИЕ

К распространенным патологическим состояниям эндокринной системы относят синдром тиреотоксикоза, проявления которого включают различные многосистемные сдвиги, возникающие под действием избытка тиреоидных гормонов (ТГ), в том числе поражения сердечно-сосудистой и центральной нервной систем, печени, эндокринные нарушения и др. Имеются данные, что ТГ при больших концентрациях индуцируют окислительный стресс в печени [1], сердце и скелетной мускулатуре крыс [2]. В основе данного действия гормонов может лежать усиление клеточного дыхания и образование супероксид-радикала на уровне убихинона [3], активация NADH-цитохром P<sub>450</sub>-редуктазы и NADPH-оксидазы в микросомах печени крыс, приводящая к увеличению образования активных форм кислорода (АФК) и, как следствие, интенсификации пероксидного окисления липидов (ПОЛ) [1,2,4].

В связи с этим одной из актуальных проблем медицинской биохимии является поиск и биотестирование средств антиоксидантной защиты, которые могли бы использоваться для повышения

клинической эффективности способов стандартной терапии тиреотоксикоза. Особый интерес привлекают средства на основе естественных метаболитов клеток. Одним из важнейших интермедиатов клеточного метаболизма является цитрат [5]. Данное соединение может выступать эффективным антиоксидантом благодаря наличию у него диссоциирующих карбоксильных групп, способных связывать прооксиданты: ионы Fe<sup>2+</sup>, а также ионы Ca<sup>2+</sup>. Было продемонстрировано антиоксидантное действие цитрата при активации ПОЛ в искусственных мембранах липосом [6]. Имеются также данные, что это вещество защищает клетки почечного эпителия от повреждения, вызванного оксалатом и кристаллами оксалата кальция, путем снижения образования АФК и, в результате, предотвращения свободнорадикального окисления (СО) биосубстратов [7].

Одной из важнейших антиоксидантных систем (АОС) организма является ферментативная глутатионпероксидазная/ глутатионредуктазная (ГП/ГР) система, использующая в качестве субстрата глутатион. Для восстановления глутатиона используется НАДФН, поставщиками которого могут служить глюкозо-6-фосфатдегидрогеназа (Г6ФДГ; КФ 1.1.1.49) и НАДФ-изоцитратдегидрогеназа (НАДФ-ИДГ; КФ 1.1.1.42).

В связи с вышесказанным целью данной работы явилось исследование активностей ГП (КФ 1.11.1.9), ГР (КФ 1.6.4.2), Г6ФДГ и НАДФ-ИДГ, а также содержания GSH в печени, сердце и сыворотке крови при введении цитрата на фоне развития экспериментального гипертиреоза (ЭГТ) у крыс.

### МЕТОДИКА ЭКСПЕРИМЕНТА

В качестве объекта исследования использовали самцов белых лабораторных крыс массой 150—200 г. Для индуцирования экспериментального тиреотоксикоза животным вводили внутривенно трийодтиронин в дозе 100 мкг/100 г массы тела в виде раствора в 0,9% NaCl, трижды в течение 6 дней [8]. Цитрат вводили внутривенно в дозе 50 мг/кг в виде раствора в 0,9% NaCl, ежедневно в течение 3-х дней. Образцы для анализа забирали на 7-е сутки после начала эксперимента.

Для исследований использовали гомогенаты печени и сердца, сыворотку крови крыс. Кровь забирали из сердца. Гомогенаты печени и сердца получали путем гомогенизации навески ткани в фарфоровой ступке в 4-х кратном объеме охлажденной среды выделения (50 мМ трис-HCl-буфер (pH 7,8), содержащий 1 мМ ЭДТА, 1%  $\beta$ -меркаптоэтанол) и центрифугирования при 5000g в течение 10 мин.

Определение концентрации восстановленного глутатиона (GSH) проводили спектрофотометрически при длине волны 412 нм с использованием реактива Элмана [9].

Активность ГП, ГР, Г6ФДГ и НАДФ-ИДГ определяли на СФ-56 при длине волны 340 нм. Измерение активности ГП проводили с помощью сопряженной ферментативной реакции в среде спектрофотометрирования следующего состава: 50 мМ калий-фосфатный буфер (pH 7,4), содержащий 1 мМ ЭДТА, 0,12 мМ НАДФН, 0,85 мМ восстановленного глутатиона, 0,37 мМ  $H_2O_2$ , 1 ед/мл ГР. Контрольная проба не содержала восстановленного глутатиона. Определение активности ГР проводили в среде спектрофотометрирования, содержащей 50 мМ калий-фосфатный буфер (pH 7,4), 1 мМ ЭДТА, 0,16 мМ НАДФН и 0,8 мМ окисленного глутатиона. Для измерения активности Г6ФДГ использовали 50 мМ трис-HCl-буфер (pH 7,8), содержащий 3,0 мМ глюкозо-6-фосфат, 0,25 мМ НАДФ, 1,0 мМ  $MnCl_2$ . Среда для определения активности НАДФ-ИДГ имела следующий состав: 50 мМ трис-HCl-буфер (pH 7,6—7,8), содержащий 1,5 мМ изоцитрат, 2 мМ  $MnCl_2$ , 0,25 мМ НАДФ, 0,1 мМ ЭДТА. Реакцию

начинали добавлением ферментного препарата. За единицу ферментативной активности (Е) принимали количество фермента, катализирующее образование 1 мкмоль продукта реакции или превращение 1 мкмоль субстрата за 1 мин при температуре +25 °С.

Опыты проводили как минимум в 8-кратной биологической и 2-кратной аналитической повторностях. Полученные данные обрабатывали с использованием статистических критериев [10]. Обсуждаются статистически достоверные различия при  $p < 0,05$ .

### ПОЛУЧЕННЫЕ РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

При введении цитрата на фоне развития тиреотоксикоза у крыс в тканях животных отмечается снижение содержания восстановленного глутатиона, уровень которого возрастает при ЭГТ [11], по сравнению с данными при патологии. Так, нами было показано, что в печени и сыворотке крови крыс данный параметр уменьшался в 1,2 раза, в сердце — в 1,1 раза, т.е. наблюдалось изменение в сторону контроля (рис. 1). Полученные данные могут быть объяснены ингибирующим влиянием цитрата на уровень СО биомолекул в организме при развитии патологии, что приводит к снижению степени мобилизации АОС.

Ранее было выявлено, что в условиях ЭГТ происходит активация ГП/ГР АОС и такого ферментативного поставщика НАДФН, как Г6ФДГ [11]. По-видимому, повышение активности этих антиоксидантных ферментов является следствием интенсификации свободнорадикальных процессов, наблю-

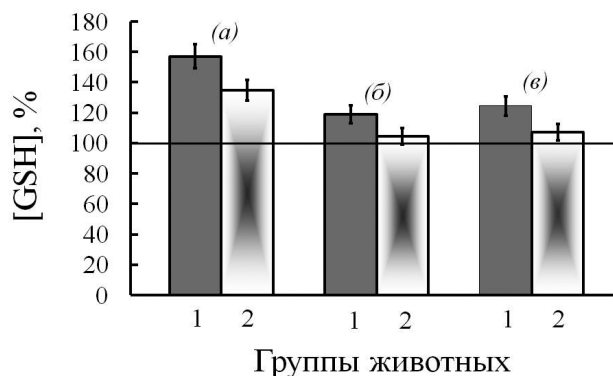


Рис. 1. Содержание восстановленного глутатиона в печени (а), сердце (б) и сыворотке крови (в) крыс: 1 — животные с ЭГТ; 2 — животные с ЭГТ, которым вводили цитрат. За 100% принимали содержание глутатиона в контроле (в печени — 0,21 мМ, в сердце — 0,29 мМ, в сыворотке крови — 0,37 мМ)

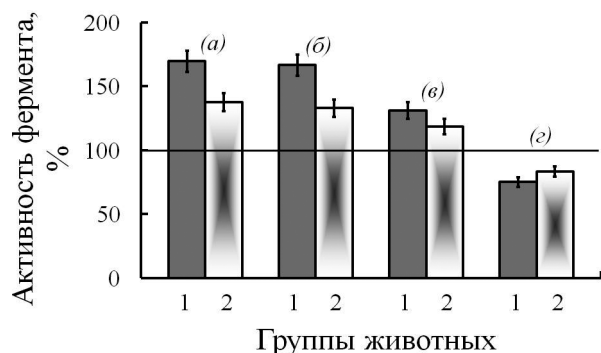


Рис. 2. Активность ГП (а), ГР (б), Г6ФДГ (в) и НАДФ-ИДГ (г) в печени крыс, выраженная в процентах от Е/г сырой массы: 1 — животные с ЭГТ, 2 — животные с ЭГТ, которым вводили цитрат. За 100 % принимали активность фермента в контроле (для ГП — 0,135; для ГР — 0,78; для Г6ФДГ — 0,48; для НАДФ-ИДГ — 1,457 Е/г сырой массы)

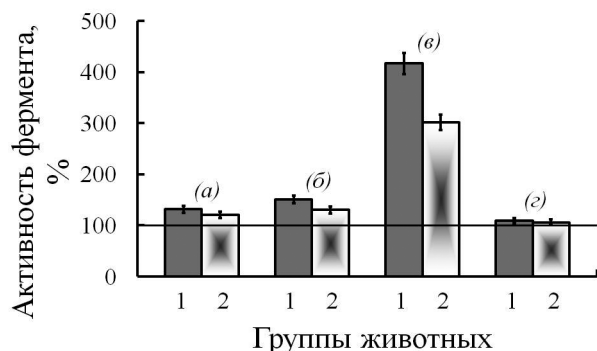


Рис. 3. Активность ГП (а), ГР (б), Г6ФДГ (в) и НАДФ-ИДГ (г) в сердце крыс, выраженная в процентах от Е/г сырой массы: 1 — животные с ЭГТ, 2 — животные с ЭГТ, которым вводили цитрат. За 100 % принимали активность фермента в контроле (для ГП — 0,35; для ГР — 0,106; для Г6ФДГ — 0,156; для НАДФ-ИДГ — 1,51 Е/г сырой массы)

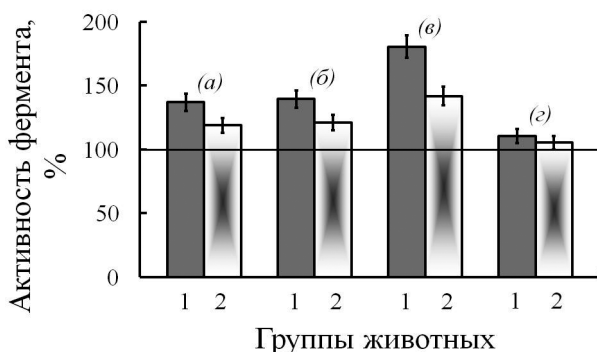


Рис. 4. Активность ГП (а), ГР (б), Г6ФДГ (в) и НАДФ-ИДГ (г) в сыворотке крови крыс, выраженная в процентах от Е/мл: 1 — животные с ЭГТ, 2 — животные с ЭГТ, которым вводили цитрат. За 100 % принимали активность фермента в контроле (для ГП — 0,159; для ГР — 0,038; для Г6ФДГ — 0,0155; для НАДФ-ИДГ — 0,028 Е/мл)

дающей при увеличении уровня ТГ, и носит адаптивный характер. Изменение данных параметров в крови при патологии может являться следствием как активации АОС при усилении свободнорадикального окисления биосубстратов, так и выходом ферментов из клеток при повреждении мембран.

При введении цитрата на фоне развития тиреотоксикоза активность ГП и ГР в печени крыс, выраженная в виде Е на г сырой массы, снижается в 1,2 и 1,3 раза, в сердце — в 1,1 и 1,2 раза, соответственно, по сравнению с животными с патологией (рис. 2, 3). В этих условиях активность данных ферментов в сыворотке крови, выраженная в Е/мл, уменьшается в 1,2 раза (рис. 4).

Активность Г6ФДГ, выраженная в Е/г сырой массы печени или сердца, при введении цитрата животным с индуцированным гипертиреозом снижается в 1,1 и 1,4 раза по сравнению с данными при ЭГТ (рис. 2, 3). В сыворотке крови активность фермента, выраженная в Е/мл, при этом падает в 1,3 раза (рис. 4).

Отмечено, что в условиях развития тиреотоксикоза активность НАДФ-ИДГ в печени уменьшается (рис. 2), в то время как в сердце и сыворотке крови незначительно возрастает по сравнению с контрольным уровнем (рис. 3,4) [11]. По-видимому, это является следствием органоспецифичных изменений в метаболизме при действии высоких доз гормонов щитовидной железы. Исходя из полученных данных, можно предположить, что в изучаемых условиях НАДФ-ИДГ вносит незначительный вклад в усиление поставки НАДФН для работы ГП/ГР АОС, в то время как основная нагрузка по снабжению этой системы восстановительными эквивалентами падает на Г6ФДГ — один из ферментов пентозофосфатного пути. При введении цитрата животным с ЭГТ активность НАДФ-ИДГ в печени, выраженная в Е/г массы, возрастает на 11 % по сравнению с патологией, то есть наблюдается изменение в сторону контроля, в то время как при исследовании ткани сердца и сыворотки крови достоверных изменений данного параметра выявлено не было (рис. 2—4).

Данные по изменению активности исследуемых ферментов в сторону контрольных значений могут быть объяснены с точки зрения хелатирующей способности цитрата по отношению к ионам  $\text{Fe}^{2+}$  и  $\text{Ca}^{2+}$ . В основе прооксидантного эффекта ионов  $\text{Fe}^{2+}$  лежит участие в реакции Фентона, приводящей к образованию самой реакционно-способной АФК — гидроксильного радикала, и

разветвлении цепей ПОЛ, способствующего распространению данных процессов и вовлечению в окисление все новых молекул липидов биомембран [12, 13]. Ионы  $\text{Ca}^{2+}$  могут выступать в качестве активаторов НАДФН-оксидазы, продуцирующей супероксидный анион-радикал, выступающий в качестве родоначальника других АФК, которые играют важнейшую роль в интенсификации СО. Кроме того, ионы  $\text{Ca}^{2+}$  могут увеличивать активность фосфолипазы, что также может способствовать усилению степени повреждения биомембран [14, 15].

В основе протекторного действия цитрата при развитии тиреотоксикоза, сопряженного с интенсификацией процессов СО биосубстратов, может также лежать активирование биосинтеза жирных кислот, так как необходимость в поставке этих соединений возрастает в условиях пероксидного повреждения мембран. В связи с проявлением антиоксидантных свойств цитрата снижается уровень СО, что, по-видимому, сопровождается уменьшением степени активации ГП/ГР АОС и, следовательно, необходимости в поставке НАДФН для работы этой системы по сравнению с уровнем при ЭГТ. Таким образом, можно предположить, что цитрат способствует нормализации обменных процессов и восстановлению окислительно-восстановительного равновесия в организме в условиях повреждающего действия ТГ в высоких концентрациях.

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Согласно результатам проведенного исследования, при введении животным цитрата на фоне развития тиреотоксикоза происходит снижение активности ГП, ГР и ГбФДГ, а также содержания GSH в тканях крыс по сравнению с данными показателями при патологии. По-видимому, в присутствии цитрата, оказывающего антиоксидантное действие, вследствие торможения свободно-радикальных процессов снижается нагрузка на АОС, что и приводит к меньшей степени активации ее глутатионового звена и к снижению необходимости в поставке НАДФН для работы этой системы.

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Fernandez V. Superoxide radical generation, NADPH oxidase activity, and cytochrome P-450 content of rat liver microsomal fractions in an experimental hyperthyroid state: relation to lipid peroxidation / V. Fernandez, X. Barrientos, K. Kipreos // *Endocrinology*. — 1985. — V. 117. — P. 496—501.
2. Asayama K. Lipid peroxidation and free radical scavengers in thyroid dysfunction in the rat: a possible mechanism of injury to heart and skeletal muscle in hyperthyroidism / K. Asayama, K. Dobashi, H. Hayashibe // *Endocrinology*. — 1987. — V. 121, №6. — P. 2112—2118.
3. Turrens J. F. Ubisemiquinone is the electron donor for superoxide formation by complex III of heart mitochondria / J. F. Turrens, A. Alexandre, A. L. Lehninger // *Arch. Biochem. Biophys.* — 1985. — V. 237, №2. — P. 408—414.
4. Оксидативный статус и содержание цитрата в тканях крыс при экспериментальном гипертиреозе и действии мелатонина / С. С. Попов [и др.] // *Бюллетень экспериментальной биологии и медицины*. — 2007, №8. — С. 170—173.
5. Ленинджер А. Биохимия / А. Ленинджер. — М.: Мир, 1977. — 957 с.
6. Суркова И. Г. Влияние природных органических кислот на интенсивность свободнорадикальных процессов в двух модельных системах / И. Г. Суркова, В. Г. Зайцев // *Сб. трудов 4-ой национальной научно-практической конференции с международным участием «Активные формы кислорода, оксид азота, антиоксиданты и здоровье человека»*. — Смоленск, 26—30 октября 2005. — С. 94—95.
7. Byer K. Citrate provides protection against oxalate and calcium oxalate crystal induced oxidative damage to renal epithelium / K. Byer, S. R. Khan // *J. Urol.* — 2005. — V. 173, № 2. — P. 640—646.
8. Fernandez V. Effects of hyperthyroidism on rat liver glutathione metabolism: Related enzymes' activities, efflux, and turnover / V. Fernandez, K. Simizu, S. B. M. Barros // *Endocrinology*. — 1991. — V. 129. — P. 85—91.
9. Бузлама В. С. Методическое пособие по изучению процессов перекисного окисления липидов и системы антиоксидантной защиты организма у животных / В. С. Бузлама. — Воронеж, 1997. — 35 с.
10. Ллойд Э. Справочник по прикладной статистике / Э. Ллойд, У. Ледерман. — М.: Финансы и статистика, 1990. — 525 с.
11. Активность глутатионовой антиоксидантной системы при гипертиреозе и действии мелатонина / С. С. Попов [и др.] // *Проблемы эндокринологии*. — 2008. — №3. — С. 47—51.
12. Кухтина Е. Н. Влияние железа, цинка, меди на процессы перекисного окисления липидов / Е. Н. Кухтина, Н. Н. Глущенко // *Биохимия*. — 1996. — Т. 61, №6. — С. 993—997.
13. Осипов А. Н. Активные формы кислорода и их роль в организме / А. Н. Осипов, О. А. Азизова, Ю. А. Владимиров // *Успехи биологической химии*. — 1990. — Т. 31, № 2. — С. 180—208.
14. Гордеева А. В. Взаимосвязь между активными формами кислорода и кальцием в живых клетках / А. В. Гордеева, Р. А. Звягильская, Ю. А. Лабас // *Биохимия*. — 2003. — Т. 68, вып. 10. — С. 1318—1322.
15. Меерсон Ф. З. Патогенез и предупреждение стрессорных и ишемических повреждений сердца / Ф. З. Меерсон. — М.: Медицина, 1984. — 272 с.

*Сафонова Ольга Анатольевна* — ассистент, к.б.н., кафедра медицинской биохимии и микробиологии, биолого-почвенный факультет, Воронежский государственный университет; тел.: (4732) 208278, e-mail: solga@bio.vsu.ru

*Попова Татьяна Николаевна* — зав. кафедрой, проф., д.б.н., кафедра медицинской биохимии и микробиологии, Воронежский государственный университет; тел.: (4732) 208278, e-mail: tpopova@bio.vsu.ru

*Сауди Лайла* — аспирант, кафедра медицинской биохимии и микробиологии, биолого-почвенный факультет, Воронежский государственный университет; тел.: (4732) 208278

*Safonova Olga A.* — the Assistant, Dr. of Biology, Department of Medical Biochemistry and Microbiology, Biology and Soil Science Faculty, Voronezh State University; tel.: (4732) 208278, e-mail: solga@bio.vsu.ru

*Popova Tatyana N.* — the Head of the Department, Prof., Dr. of Biology, Department of Medical Biochemistry and Microbiology, Biology and Soil Science Faculty, Voronezh State University; tel.: (4732) 208278, e-mail: tpopova@bio.vsu.ru

*Saidi Laila* — the Post-graduate Student, Department of Medical Biochemistry and Microbiology, Biology and Soil Science Faculty, Voronezh State University; tel.: (4732) 208278