



В.М. Жадан, В.І. Коржов

ДУ «Національний інститут фізіотерії і пульмонології імені Ф.Г. Яновського НАМН України», Київ

Оцінка активності глутатінозалежних ферментів еритроцитів при експериментальній емфіземі легень

Мета роботи — оцінка активності ферментів глутатінової системи еритроцитів в умовах експериментальної емфіземи легень у разі введення різних доз папаїну в динаміці розвитку патології.

Матеріали та методи. Дослідження проведено на 62 білих безпородних щурах обох статей. Емфізему легень відтворювали шляхом одноразового інтратрахеального введення під легким ефірним наркозом 0,5 мл розчину папаїну в дозах 50 мг/кг, 75 мг/кг та 100 мг/кг. Стан глутатінозалежної ферментної системи вивчали за активністю ферментів — глутатіон-редуктази, глутатіон-трансферази та глутатіон-пероксидази.

Результати та обговорення. Досліджено і оцінено показники глутатінозалежної ферментної системи крові за умов експериментальної емфіземи легень залежно від дози папаїну в динаміці розвитку патології. Виявлено зниження активності основних глутатінозалежних ферментів, що свідчить про зниження процесів антиоксидантного захисту, яке може призводити до системних метаболічних порушень. Не встановлено чітких закономірностей між біохімічними порушеннями і дозою папаїну та часом, який минув після моделювання патології. Зміни активності ферментів не були пропорційні ступеню тяжкості експериментальної емфіземи легень. Інактивація основних глутатінозалежних ферментів є однією з важливих ланок патогенезу емфіземи.

Висновки. Експериментальна емфізема легень супроводжується декомпенсаторними порушеннями з боку ферментативної ланки антипероксидного захисту в крові (зниження активності глутатінозалежних ферментів), що побічно може свідчити про початок зриву компенсаторних механізмів у системі глутатіону.

Ключові слова

Емфізема легень, ферменти обміну глутатіону: глутатіон-редуктаза, глутатіон-трансфераза, глутатіон-пероксидаза.

Терміном «емфізема легень» позначають патологічні процеси в легенях, що характеризуються підвищеним вмістом повітря в легеневої тканині. Це хронічне легеневе захворювання, що характеризується порушенням дихання й газообміну в легенях. Назва хвороби походить від греч. *emphysao* — вдмухувати, роздмухувати. Емфізема легень поряд із хронічним обструктивним бронхітом і бронхіальною астмою належить до групи хронічних обструктивних захворювань легень (ХОЗЛ). Посідає одне із чільних місць серед захворювань органів дихання як за

поширенням, так і тяжкістю перебігу [2, 7]. Захворюваність на емфізему легень постійно зростає, особливо в літніх людей. На автопсії емфізему виявляють у понад 60 % пацієнтів, що померли після 60 років, хоча клініцисти ставлять цей діагноз менше ніж у 20 %. Значна поширеність захворювання, прогресуючий перебіг, тимчасова непрацездатність і рання інвалідизація хворих через розвиток дихальної недостатності й легеневого серця завдають значного економічного збитку, що свідчить про нестачу розробок, які стосуються біохімічних механізмів порушень і можливості корекції їх за такої патології [1].

Вивчаючи значення окисного стресу в патогенезі емфіземи легень, D. Vucević та співавт. [12]

визначили ефектори, що беруть участь у розвитку хвороби. Насамперед до них належать вільні радикали й активні форми кисню. Вони модифікують радикали амінокислотних залишків, зумовлюючи агрегацію білків, розривають пептидні зв'язки, сприяють підвищенню чутливості білків до протеолітичної деградації. Активні форми кисню також можуть порушувати процеси сигналізації, сприяють активізації нейтрофілів і макрофагів. Не менш важливим чинником є дизрегуляція системи антиоксидантного захисту. Також було висловлено думку про асоціацію емфіземи з поліморфізмом генів, що кодують ферменти антиоксидантного захисту: гемоксигенази, супероксиддисмутази й глутатіон-пероксидази [4, 8–10].

У контролі вільнорадикального ушкодження найважливіше місце займає система глутатіону. Відновлений глутатіон (ВГ) як один із головних компонентів системи антиоксидантного захисту (АОЗ) здатний реагувати з вільними радикалами, інгібувати перекисне окиснення ліпідів. У системі захисту клітин від надлишку активних форм кисню функції ВГ найчастіше здійснюються за допомогою ферментативної ланки, яка представлена спектром глутатіонозалежних ферментів [3].

Мета роботи — оцінка активності ферментів глутатіонові системи еритроцитів в умовах експериментальної емфіземи легень у процесі введення різних доз папаїну в динаміці розвитку патології.

Роботу виконано за кошти державного бюджету.

Матеріали та методи

Дослідження проведено на 62 білих безпородних щурах обох статей масою 180–200 г, яких утримували на стандартній дієті віварію.

Експериментальну папаїнову емфізему легень відтворювали шляхом одноразового інтратрахеального введення під легким ефірним наркозом 0,5 мл розчину папаїну в дозах 50 мг/кг, 75 мг/кг та 100 мг/кг відповідно [5].

Тварин розподілено на дві основні групи: перша — інтактні, друга — з експериментальною емфіземою легень.

Після кожної дози папаїну щурів виводили з експерименту шляхом декапітації під легким ефірним наркозом через 2 і 3 тиж після моделювання патології.

Об'єктом дослідження були відмиті від плазми і гемолізовані еритроцити щурів. Матеріал для дослідження брали за суворого дотримання правил роботи з експериментальними тваринами [6].

Про стан глутатіонозалежної ферментної системи крові судили за активністю глутатіон-

редуктази (ГР), глутатіон-трансферази (ГТ) та глутатіон-пероксидази (ГПО).

Математичний аналіз даних виконували за методом варіаційної статистики за стандартними ліцензійними комп'ютерними програмами. Різницю між групами оцінювали за допомогою t-критерію Стьюдента. Вірогідною вважали різницю за ймовірної похибки до 5 % ($p < 0,05$).

Результати та обговорення

Інтратрахеальне введення тваринам папаїну закономірно супроводжувалося розвитком емфіземи, що підтверджували гістоморфологічними дослідженнями тканини легень. Результати свідчать про різницю ступеня емфіземи залежно від дози папаїну. За виразністю гістологічних змін легеневої тканини в разі застосування папаїну в дозі 50 мг/кг спостерігається перший ступінь (слабко виразна). У разі введення папаїну в дозах 75 та 100 мг/кг емфізематозні зміни виражені значно більше, приблизно відповідають I–II ступеню виразності.

Комплекс ферментів — ГР, ГТ і ГПО в умовах окисного стресу є найпотужнішою лінією АОЗ. Глутатіонозалежні ферменти обмежують процеси ПОЛ і виявляють мембраностабілізуючий ефект шляхом детоксикації H_2O_2 і відновлення нестабільних органічних гідропероксидів клітинних мембран. Ступінь порушення стану системи глутатіону, зокрема й декомпенсацію її функціональних можливостей, мабуть, слід оцінювати не тільки за такими параметрами, як рівень відновленого глутатіону й сульфгідрильних груп білків, а й активністю ферментів обміну глутатіону, що входять до неї.

Наведені нижче експериментальні дані дають підстави говорити, що зміни ферментативної ланки обміну глутатіону беруть участь у патогенезі емфіземи легень.

Ефективне виконання системою глутатіону таких функцій, як антирадикальний захист і підтримка тиол-дисульфідної рівноваги здійснюється завдяки збереженню достатнього рівня відновленого глутатіону в тканинах, підтримується який у клітинах двома шляхами: синтезу глутатіону *de novo* в γ -глутамілтрансферазному циклі й відновлення його з окисненої форми. При цьому активність глутатіон-редуктази є чинником, що лімітує підтримку рівня ВГ у тканинах, бо швидкість його синтезу в тканинах значно нижча від НАДФН-залежного відновлення окисненої форми глутатіону за допомогою ГР [3].

При всіх трьох дозах папаїну для моделювання емфіземи легень антиоксидантні ефекти компонентів глутатіонозалежної системи (ГР, ГТ і

Таблиця. Активність глутатіонозалежних ферментів у крові щурів у разі введення папаїну та в динаміці розвитку патології (M ± m, n = 8—10)

Група	Термін	ГР, мкмоль НАДФН × (хв/г Hb) ⁻¹	ГТ, мкмоль GSH × (хв/г Hb) ⁻¹	ГПО, мкмоль GSH × (хв/г Hb) ⁻¹
Інтактні тварини (контроль)	—	3,45 ± 0,19	2,13 ± 0,15	276,04 ± 14,60
Папаїн, 50 мг/кг	2 тиж	2,46 ± 0,17*	1,78 ± 0,13	205,40 ± 18,66*
	3 тиж	2,05 ± 0,17*	1,85 ± 0,13	204,83 ± 36,64*
Папаїн, 75 мг/кг	2 тиж	2,06 ± 0,16*	1,74 ± 0,10*	232,74 ± 16,62
	3 тиж	2,13 ± 0,16*	1,80 ± 0,09*	146,36 ± 15,14*
Папаїн, 100 мг/кг	2 тиж	2,32 ± 0,12*	2,10 ± 0,04	170,84 ± 10,41*
	3 тиж	2,42 ± 0,26*	1,77 ± 0,09*	215,56 ± 15,33*

Примітка. *Різниця показників відносно інтактних тварин вірогідна (p < 0,05).

ГПО) в еритроцитах знижувалися, сприяючи збільшенню виявів окисного стресу.

Порівняльна оцінка динаміки активності ГР в еритроцитах дала змогу виявити такі закономірності. При дозі папаїну 50 мг/кг через 2 тиж після введення препарату знижувалася активність ГР на 28,7 % відносно контролю (таблиця). Вірогідне зниження активності ГР вже на 40,6 % спостерігалось через 3 тиж після введення вказаної дози папаїну. У разі вищої дози для моделювання емфіземи легень (75 мг/кг) активність ГР вірогідно знижувалася через 2 тиж на 40,3 %, через 3 тиж — на 38,3 % відносно показників інтактних щурів. Після введення щурам папаїну по 100 мг/кг через 2 тиж після моделювання експериментальної патології знизилася ферментативна активність ГР порівняно з контролем на 32,8 %, через 3 тиж — на 29,9 %.

Таким чином, розвиток емфіземи легень супроводжується вірогідним зниженням глутатіоноредуктазної активності, на виразність якої помітно не впливали як доза папаїну, так і термін спостереження. Пригнічення активності ГР у крові може свідчити про виснаження резервів досліджуваної біохімічної системи в умовах гострої дихальної недостатності, тобто про глибокі порушення функції її саморегуляції, і призводити до пригнічення активності ферментів, які використовують відновлений глутатіон для утилізації продуктів пероксидації — глутатіонтрансферази й глутатіон-пероксидази.

ГТ посідає одне із центральних місць у механізмах природної детоксикації, включно з особистою участю як у процесах кон'югації, так і захисті клітини від органічних гідропероксидів. У зміні активності ГТ за експериментальної емфіземи легень відбувалися такі процеси: у разі введення папаїну по 50 мг/кг активність ГТ мала тенденцію до зниження, тобто була невірогідно знижена на 16,4 % через 2 тиж і на 13,2 % — через 3 тиж після моделювання патології порівняно з

контролем. У разі введення папаїну в дозі 75 мг/кг активність ГТ вірогідно знижувалася в обидва терміни дослідження. Так, через 2 тиж її активність була вірогідно нижчою від показників інтактних щурів на 18,3 %, через 3 тиж — на 15,5 % відповідно. У разі введення папаїну по 100 мг/кг через 2 тиж активність ГТ майже не відрізнялася від контролю, проте через 3 тиж вона вірогідно знижувалася на 17,0 %. Через зниження активності глутатіон-трансферази в крові зростає кількість токсичних для легеневої тканини ліпопероксидних та фенольних сполук, які відіграють певну роль у розвитку патологічного процесу.

В умовах окисного стресу особливо важлива роль ГПО, бо вона запобігає виникненню й розвитку пероксидації, усуває її джерела й продукти. ГПО є одним із найважливіших компонентів ферментативної антиоксидантної системи. Під час дослідження встановлено, що розвиток емфіземи супроводжувався зниженням ферментативної активності ГПО в крові лабораторних тварин. Після введення папаїну в дозі 50 мг/кг через 2 тиж активність ферменту вірогідно знижувалася на 25,6 %, через 3 тиж — на 25,8 % порівняно з контролем. У разі введення папаїну по 75 мг/кг через 2 тиж активність ГПО мала тенденцію до зниження, тобто була невірогідно знижена на 15,7 %, проте через 3 тиж після моделювання емфіземи її активність уже була вірогідно знижена на 47,0 %. Після введення щурам папаїну в дозі 100 мг/кг активність ГПО через 2 тиж вірогідно знижувалася на 38,1 %, а через 3 тиж — на 21,9 %. Така метаболічна особливість може свідчити про високу інтенсивність системного оксидативного стресу.

Отже, виявлено зниження активності основних глутатіонозалежних ферментів у крові щурів з експериментальною емфіземою легень, що свідчить про зниження процесів антиоксидантного захисту, яке може призводити до системних

метаболических порушень. Не встановлено чітких закономірностей між виявленими біохімічними порушеннями і дозою папаїну та часом, який минув після моделювання патології, зміни активності ферментів не були пропорційні ступеню тяжкості експериментальної емфіземи.

Зниження активності глутатинозалежних ферментів може бути зумовлене збільшенням утворення активних форм кисню (АФК) при емфіземі, оскільки процес розвитку дихальної недостатності супроводжується генерацією великої кількості АФК [11]. Інактивація редокс-системи глутатіону також може бути пов'язана з безпосередньою модифікуючою дією АФК на ферментативні білки і через опосередковані механізми, тобто через продукти їхньої первинної взаємодії з іншими біомолекулами.

Таким чином, зміни показників ферментної системи глутатіону дають змогу внести певну ясність у біохімічний механізм розвитку папаїнової емфіземи легень. Клінічний перебіг згаданої патології зумовлений не тільки міжорганними, а й загальнобіологічними порушеннями.

Зниження активності ферментів глутатинового метаболізму можна вважати однією з важливих ланок патогенезу емфіземи. Подальше вивчення функціонування системи глутатіону, її адаптаційних можливостей, а також корекція її стану за допомогою сукцинатовмісних препаратів (препаратів, що мають детоксикаційний ефект, знижують виразність ендогенної інтоксикації і одночасно поліпшують енергетичний метаболізм) дадуть змогу вирішити питання з розробки нових методів профілактики й терапії емфіземи легень.

Конфлікту інтересів немає. Участь авторів: концепція і дизайн дослідження — В. Жадан, В. Коржов; написання тексту — В. Жадан, В. Коржов; редагування — В. Жадан, В. Коржов.

Список літератури

1. Григорьева Н.Ю., Кузнецов А.Н., Шарабрин Е.Г. Хроническая обструктивная болезнь легких: новое о патогенетических механизмах // СТМ.— 2011.— № 1.— С. 112–116.
2. Григорьева Н.Ю., Шарабрин Е.Г., Кузнецов А.Н. Хроническая обструктивная болезнь легких: определение, механизмы развития и естественное течение // Мед. альманах.— 2008.— № 5.— С. 35–38.
3. Минаева Л.В. Экспериментальная оценка роли изменений системы глутатиона в реализации побочных цитотоксических эффектов повторного введения циклофосфана: дис. ... канд. мед. наук.— СПб, 2007.— 178 с.
4. Муравлева Л.Е., Ключев Д.А., Демидчик Л.А., Колесникова Е.А. Роль окислительного стресса в патогенезе хронической обструктивной болезни легких // Успехи современного естествознания.— 2012.— № 9.— С. 12–16.
5. Серебровская М.Т., Шишканов В.В., Айтукоев М.Т. Сурфактантная система легких при экспериментальной папаиновой эмфиземе // Пат. физиол. и экспер. терап.— 1982.— № 5.— С. 63–64.
6. Червонская Г.П., Панкратова Г.П., Миронова Л.А. Этика медико-биологического эксперимента в доклинических исследованиях // Токсикол. вестник.— 1998.— № 3.— С. 2–8.
7. Чучалин А.Г. Хронические обструктивные болезни легких.— М.: ЗАО «Издательство БИНОМ», 1999.— 512 с.
8. Boots A.W., Haenen G.R., Bast A. Oxidant metabolism in chronic obstructive pulmonary disease // Eur. Respir. J.— 2003.— Vol. 22 (Suppl. 46).— P. 14–27.
9. Fischer B.M., Pavlisko E., Voynow J.A. Pathogenic triad in COPD: oxidative stress, protease-antiprotease imbalance, and inflammation // Int. J. Chron. Obstruct. Pulmon. Dis.— 2011.— Vol. 6.— P. 413–421.
10. Lin J.L., Thomas P.S. Current perspectives of oxidative stress and its measurement in chronic obstructive pulmonary disease // COPD.— 2010.— Vol. 7, N 4.— P. 291–306.
11. Miller D.P. Purification and characterization of a glutathione dependent dehydroascorbate reductase from human erythrocytes // Biochem. Biophys. Res. Commun.— 1995.— Vol. 64, N 3.— P.485–491.
12. Vucević D., Radosavljević T., Zunić S., Dordević-Denić G., Pešić B.C., Radak D. The role of oxidative stress in the pathogenesis of pulmonary emphysema // Med. Pregl.— 2005.— Vol. 58, N 9–10.— P. 472–477.

В.Н. Жадан, В.И. Коржов

ГУ «Национальный институт фтизиатрии и пульмонологии имени Ф.Г. Яновского НАМН Украины», Киев

Оценка активности глутатионзависимых ферментов эритроцитов при экспериментальной эмфиземе легких

Цель работы — оценка активности ферментов глутатионовой системы эритроцитов в условиях экспериментальной эмфиземы легких при введении разных доз папаина в динамике развития патологии.

Материалы и методы. Исследование проведено на 62 белых беспородных крысах обоих полов. Эмфизему легких моделировали путем одноразового интратрахеального введения под легким эфирным наркозом 0,5 мл раствора папаина в дозах 50 мг/кг, 75 мг/кг и 100 мг/кг. Состояние глутатионзависимой ферментной системы изучали по активности ферментов — глутатион-редуктазы, глутатион-трансферазы и глутатион-пероксидазы.

Результаты и обсуждение. Исследованы и оценены показатели глутатионзависимой ферментной системы крови при экспериментальной эмфиземе легких в зависимости от дозы папаина в динамике развития патологии. Выявлено снижение активности основных глутатионзависимых ферментов, свидетельствующее о снижении процессов антиоксидантной защиты, которое может приводить к системным метаболическим нарушениям. Не установлены четкие закономерности между биохимическими нарушениями и дозой папаина, а также временем, прошедшим после моделирования патологии. Изменения активности ферментов не были пропорциональны степени тяжести экспериментальной эмфиземы легких. Инактивация основных глутатионзависимых ферментов является одним из важных звеньев патогенеза эмфиземы.

Выводы. Экспериментальная эмфизема легких сопровождается декомпенсаторными сдвигами со стороны ферментативного звена антипероксидной защиты в крови (снижение активности глутатионзависимых ферментов), что косвенно может свидетельствовать о начале срыва компенсаторных механизмов в системе глутатиона.

Ключевые слова: эмфизема легких, ферменты обмена глутатиона: глутатион-редуктаза, глутатион-трансфераза, глутатион-пероксидаза.

V.M. Zhadan, V.I. Korzhov

SI «National Institute of Phthiisology and Pulmonology named after F.G. Yanovsky of NAMS of Ukraine», Kyiv, Ukraine

Evaluation of activity of glutathionedependent enzymes of erythrocytes in experimental emphysema

Objective — to evaluation of the activity of glutathione system enzymes of erythrocytes in experimental emphysema when administered different doses of papain in the dynamics of pathology development.

Materials and methods. The study was conducted on 62 white mongrel rats of both sexes. Experimental emphysema was reproduced by single intratracheal introduction under light ether anesthesia of a 0.5 ml of papain solution in doses 0 mg/kg, 75 mg/kg and 100 mg/kg of body weight. State of glutathionedependent enzyme system was studied by enzymes activity — glutathione-reductase, glutathionetransferase, and glutathioneperoxidase.

Results and discussion. In the work it was investigated and evaluated parameters of blood glutathionedependent enzyme system at experimental pulmonary emphysema depending on the applied doses of papain in the development of the pathology. The decreasing in the activity of key glutathionedependent enzymes was revealed, which indicates the reducing of the processes of antioxidant protection, which may lead to systemic metabolic disturbances. No clear interdependencies were revealed between biochemical disturbances and a dose of papain and the time that has passed after modeling pathology, changes of enzyme activity no were proportional to the severity degree of experimental lung emphysema. Inactivation of the key glutathionedependent enzymes is one of the important links of pathogenesis of emphysema.

Conclusions. Experimental pulmonary emphysema is accompanied by serious disturbances from fermentative link of antiperoxide protection in the blood (decreasing of the activity of glutathionedependent enzymes), which indirectly may be evidence about the beginning of the breakdown of compensatory mechanisms in the glutathione system.

Key words: pulmonary emphysema, enzymes of glutathione metabolism (glutathionereductase, glutathionetransferase, glutathioneperoxidase).

Контактна інформація:

Жадан Вікторія Миколаївна, к. біол. н., ст. наук. співр. лабораторії біохімії
03680, м. Київ, вул. М. Амосова, 10
Тел. (044) 275-40-00
E-mail: nik.nik-ukraine@yandex.ru

Стаття надійшла до редакції 18 травня 2016 р.