

УДК: 577.7: 577.152

АКТИВНІСТЬ РЯДУ АНТИОКСИДАНТНИХ ФЕРМЕНТІВ І ВМІСТ ВІДНОВЛЕНОГО ГЛУТАТІОНУ В ПЕЧІНЦІ ЩУРІВ ПРИ ДІЇ ХЛОРИДУ КАДМІЮ

Т.В.Бараннік

Харківський національний університет імені В.Н.Каразіна (Харків, Україна)

Встановлено зниження активності глутатіонредуктази в печінці в перші години після введення хлориду кадмію *in vivo*, що не супроводжувалось змінами вмісту відновленого глутатіону. Попереднє введення токоферолу запобігало змінам активностей глутатіон-S-трансферази та глутатіонредуктази під впливом хлориду кадмію, але не попереджало підвищення активності глюкозо-6-фосфатдегідрогенази. Введення унітіолу, навпроти, запобігало росту глюкозо-6-фосфатдегідрогеназної активності і викликало більш раннє та тривале підвищення глутатіон-S-трансферазної активності під впливом хлориду кадмію. Різний ефект токоферолу та унітіолу на зміни активності глутатіон-S-трансферази та глюкозо-6-фосфатдегідрогенази в печінці при введенні хлориду кадмію може висвітлювати особливості їх регуляції, в тому числі роль вільнорадикального окислення та прямої дії іонів кадмію на активність або експресію вказаних ферментів.

Ключові слова: *відновлений глутатіон, глутатіон-S-трансфераза, глутатіонредуктаза, глюкозо-6-фосфатдегідрогеназа, печінка, хлорид кадмію, токоферол, унітіол.*

Вступ

Значне накопичення важких металів в навколишньому середовищі обумовлює актуальність дослідження механізмів їх дії та пошуку шляхів корекції викликаних ними метаболічних порушень в організмі людини та тварин. Важлива роль в детоксикації та виведенні з організму іонів важких металів та продуктів пероксидного окислення ліпідів, що накопичуються вже в перші години дії металів, належить системі відновленого глутатіону та глутатіон-залежних антиоксидантних ферментів печінки (Meister, Anderson, 1983). Одним з важких металів, що активно використовується у промисловості, є кадмій. В роботах останніх років показана здатність іонів кадмію викликати апоптоз клітин ссавців (Kim et al., 2000) та індукцію генів *c-fos* и *c-jun* (Shukla et al., 2000), але дані щодо його впливу на глутатіонову антиоксидантну систему в печінці ссавців малочислені та суперечливі (Sarkar et al., 1995, Kartakar et al., 1999, 2000).

Приймаючи до уваги вищесказане, а також роль генерації NADPH для відновлення глутатіону, метою цієї роботи було дослідження глутатіон-S-трансферазної, глутатіон-редуктазної та глюкозо-6-фосфатдегідрогеназної активностей та вмісту відновленого глутатіону в печінці щурів в перші години після введення *in vivo* хлориду кадмію, в тому числі за умов попереднього введення унітіолу або ліпофільного антиоксиданту токоферолу.

Матеріали та методи дослідження

Досліди проведено на статевозрілих щурах-самцях лінії Wistar вагою 160–180 г. Контрольній групі тварин вводили відповідний об'єм фізіологічного розчину. CdCl₂, розчинений у 0,9% NaCl, вводили внутрішньочеревинно у дозі 1,4 мг/100 г маси тіла. Ацетат α -токоферолу вводили внутрішньом'язово в дозі 5 мг/100 г маси тіла за 2 год. до введення солі кадмію. Унітіол (димеркаптопропансульфонат) вводили внутрішньочеревинно в дозі 7 мг/100 г маси тіла за 30 хв. до введення хлориду кадмію. Тварин декапітували під ефірним наркозом через 30 хв., 2, 6 та 24 год. після введення CdCl₂ при дослідженні динаміки змін вибраних показників, через 2, 6 та 24 год. при дослідженні сумісної дії хлориду кадмію та унітіолу або через 2 та 24 год. при дослідженні сумісної дії хлориду кадмію та токоферолу. Об'єктом досліджень була печінка.

Вміст відновленого глутатіону (GSH) визначали спектрофотометрично на СФ-26. Для цього навіски печінки (500 мг) гомогенізували з 5% розчином метафосфорної кислоти (4,5 мл) та центрифугували (3 тис.об/хв.). Для реакції використовували безбілковий центрифугат. Вміст відновленого глутатіону розраховували за допомогою калібрувальної прямої (з використанням стандартного розчину відновленого глутатіону) за поглинанням комплексу глутатіону з алоксаном при 305 нм і виражали в мкмоль/г тканини (Путилина, 1982).

Для дослідження активності ферментів з печінки отримували гомогенат після перфузії 0,9% розчином NaCl *in situ*. Гомогенати печінки готували на середовищі виділення: 0,1М КН₂РО₄/0,2М Na₂НРО₄·12Н₂О, рН 7,45. Глутатіон-S-трансферазну, глутатіон-редуктазну та глюкозо-6-

фосфатдегідрогеназну активності визначали спектрофотометрично на двупроменевому спектрофотометрі "Spekord UV-VIS" в термостатованих кюветках (+37 °С) при 340 нм.

Про глутатіон-S-трансферазну (Г-S-T) активність судили по зміні поглинання комплексу GSH з 1-хлор-2,4-динітробензолом в кюветі з гомогенатом проти реакційної суміші без гомогенату. Реакційна суміш містила 0,1М К-фосфатний буфер, рН 7,4, 1мМ ЕДТА, 1мМ 1-хлор-2,4-динітробензол, 5мМ GSH, і постійно перемішувалась. Активність ферменту розраховували з використанням коефіцієнту екстинкції $0,0096 \text{ нМ}^{-1}\text{см}^{-1}$ і виражали в нмоль 1-хлор-2,4-динітробензолу/мг білку за хв. (Мартинчик, Бондарев, 1986).

Інкубаційне середовище для визначення активності глутатіонредуктази (ГР): 0,1М KH_2PO_4 /0,1М K_2HPO_4 , рН 7,4, 0,1мМ NADPH, 0,5мМ ЕДТА, 1мМ GSSG. До кюветки з реакційною сумішшю насамперед додавався гомогенат, потім – NADPH (2 хвилини фіксували неферментативний розпад NADPH – контроль), далі реакція починалася додаванням окисленого глутатіону. Проба інкубувалася протягом 3 хвилин. Глутатіонредуктазну активність розраховували по зменшенню поглинання NADPH (проти буферного розчину) за винятком неферментативного розпаду NADPH та виражали в нмоль NADPH/мг білку за хв. (Мартинчик, Бондарев, 1986).

Про глюкозо-6-фосфатдегідрогеназну (ГлбФДГ) активність судили по приросту поглинання NADPH в інкубаційній суміші, що містила 100мМ трис-НСІ-буфер, рН 7,6, 10мМ MgCl_2 , 0,9мМ NADP^+ та 2мМ глюкозо-6-фосфат (Bottomley et al., 1963). Глюкозо-6-фосфат додавали після двохвилинної інкубації. Активність ГлбФДГ виражали в нмоль NADPH/мг білку за хв.

Вміст білку визначали за методом Лоурі в модифікації Міллера за допомогою калібрувальної прямої. В якості стандарту використовували альбумін (Miller, 1959).

Нормальність розподілення отриманих даних в кожній групі оцінювали за допомогою критерію Шапіро-Уїлка. Розраховували середні значення та стандартні ухилення. Для оцінки достовірності розбіжностей між групами використовували дисперсійний аналіз та t-тест Стьюдента для незалежних перемінних. Рівень значимості приймався рівним 0,05.

Результати та обговорення

Як видно з табл. 1, хлорид кадмію викликав зміни вивчених показників в печінці вже в перші години дії. Відомо, що введення хлориду кадмію в обраній дозі викликає ріст вмісту кадмію в печінці більш ніж в 10 разів вже через 30 хв. с поступовим накопиченням кадмію до 200-кратного рівня від контролю через добу (Стрельченко и др., 2002). Одним з наслідків прямої дії іонів кадмію може бути тривале зниження активності глутатіонредуктази в перші 6 годин після введення хлориду кадмію.

Таблиця 1.
Глутатіон-S-трансферазна (Г-S-T), глутатіонредуктазна (ГР), глюкозо-6-фосфатдегідрогеназна (ГлбФДГ) активності та вміст відновленого глутатіону (GSH) в печінці щурів при дії хлориду кадмію
(n=6-7, * – p<0,05 відносно контролю). Одиниці вимірювання вказані в розділі «Методика»

Параметр	Контроль	Час після введення CdCl_2			
		30 хв.	2 год.	6 год.	24 год.
GSH	3,91±0,26	5,9±0,27*	3,75±0,51	3,49±0,4	3,78±0,39
Г-S-T	525,6±36	595,7±49	603,2±32	557,9±30	741,2±43*
ГР	37,4±2,3	28,2±2,1*	30,2±1,4*	30,6±1,8*	36,1±1,8
ГлбФДГ	34,4±3,2	38,6±4,5	30,4±2,5	22,1±1,9	50,2±3,8*

Зростання вмісту GSH до 150% від контролю через 30 хв. і подальше збереження його на контрольному рівні можуть свідчити про незначний вплив глутатіонредуктазної активності на вміст глутатіону в цей проміжок часу дії іонів кадмію. Можна також припустити, що кадмії викликає короточасне інгібування переносу глутатіону з печінки до кров'яного русла і далі до еритроцитів, де раніше було встановлено зниження вмісту GSH через 30 хв. після введення хлориду кадмію (Павиченко, 2002). Іони кадмію можуть викликати активацію синтезу глутатіону de novo з його подальшим використанням в реакціях кон'югації, що не призводить до збільшення вмісту GSH через 2, 6 та 24 год. Підвищення активностей Г-S-T (140% від контролю) та ГлбФДГ (146% від контролю) через 24 год. можуть бути наслідком індукції ферментів. Індукція Г-S-T показана при вивченні ефектів іонів

кадмію в культурі епітеліальних клітин (Shukla et al., 2000) та в печінці in vivo у мишей (Seigers et al., 1987). Підвищення активності ГлбФДГ в печінці збігається з даними роботи (Sarkar et al., 1995).

З метою послабити прооксидантну дію іонів кадмію за 2 год. до CdCl₂ щурам вводився ліпофільний антиоксидант токоферол (E) (табл. 2).

Таблиця 2.

Глутатіон-S-трансферазна, глутатіонредуктазна, глюкозо-6-фосфатдегідрогеназна активності та вміст відновленого глутатіону в печінці щурів при дії хлориду кадмію в умовах попереднього введення токоферолу (n=6-7, * – p<0,05 відносно контролю). Одиниці вимірювання вказані в розділі «Методика».

Параметр	Контроль	2 год.		24 год.	
		CdCl ₂	CdCl ₂ +E	CdCl ₂	CdCl ₂ +E
GSH	4,17±0,42	5,03±0,42	4,09±0,50	4,76±0,65	4,27±0,44
Г-S-T	543±29	590±39	485±54	757±56*	581±39
ГР	42,8±2,3	35,0±2,6*	38,5±3,1	44,3±5,3	46,5±4,4
ГлбФДГ	28,5±2,2	30,7±3,4	34,2±2,9	39,5±4,3*	40,6±2,9*

Показано, що попереднє введення токоферолу запобігає змінам активностей Г-S-T та ГР під впливом хлориду кадмію, що може свідчити про роль вільнорадикального окислення в механізмах дії кадмію на вказані показники. Попереднє введення токоферолу не попереджало підвищення активності ГлбФДГ (до 145% від контролю), що може свідчити про пряму дію іонів кадмію на цей фермент. Останнім часом індукція глюкозо-6-фосфатдегідрогенази при стресі вважається одним із захисних механізмів клітин ссавців (Leopold et al., 2003).

В наступній серії дослідів за 30 хв. до хлориду кадмію тваринам вводили унітіол, що містить дві тіолові групи і здатний хелатувати іони кадмію (Tandon et al., 2002). Встановлено, що унітіол запобігає індукції ГлбФДГ через 24 год., що може бути результатом зв'язування іонів кадмію унітіолом та послаблення його прямої дії на клітини печінки. Раніше було показано, що унітіол в обраній дозі запобігає гемолізу та накопиченню ТБК-активних продуктів в сироватці крові щурів при введенні хлориду кадмію (Павиченко, 2002). Певне значення у збереженні ГлбФДГ активності на рівні контролю може мати більш раннє та тривале підвищення Г-S-T-активності при введенні хлориду кадмію на фоні унітіолу (через 2 год. – 145% від контролю, табл. 3), що може сприяти кон'югації вільних іонів кадмію з їх подальшим виведенням з клітин печінки. Вміст GSH підтримується на рівні контролю у всіх досліджених груп тварин, що може бути пов'язане з посиленням його синтезу de novo.

Таблиця 3.

Глутатіон-S-трансферазна, глюкозо-6-фосфатдегідрогеназна активності та вміст відновленого глутатіону в печінці щурів при дії хлориду кадмію в умовах попереднього введення унітіолу (n=6-7, * – p<0,05 відносно контролю). Одиниці вимірювання вказані в розділі «Методика».

Параметр	Контроль	2 год.		6 год.		24 год.	
		CdCl ₂	CdCl ₂ +унітіол	CdCl ₂	CdCl ₂ +унітіол	CdCl ₂	CdCl ₂ +унітіол
GSH	3,62±0,37	4,63±0,62	4,01±0,17	4,25±0,61	4,36±0,57	4,53±0,39	4,20±0,43
Г-S-T	422±39	539±87	607±71*	541±40	614±65*	895±79*	667±58*
ГлбФДГ	36,7±3,2	34,1±3,4	37,8±4,4	41,5±7,2	42,6±3,0	74,5±8,2*	39,6±4,8

Таким чином, введення хлориду кадмію викликає тривале зниження активності глутатіонредуктази в печінці, що не супроводжується змінами вмісту відновленого глутатіону. Різний ефект токоферолу та унітіолу на підвищення активностей глутатіон-S-трансферази та глюкозо-6-

фосфатдегідрогенази в печінці після введення хлориду кадмію може висвітлювати особливості їх регуляції, в тому числі роль вільнорадикального окислення та прямої дії іонів кадмію на активність або експресію вказаних ферментів. Більш раннє підвищення глутатіон-S-трансферазної активності в печінці може розглядатися як один з механізмів захисної дії унітіолу при отруєнні важкими металами.

Список літератури

- Мартинчик А.Н., Бондарев Г.И. Активность глутатионредуктазы и глутатион-S-арилтрансферазы в печени крыс в зависимости от содержания восстановленного глутатиона // *Вопр. мед. химии.* – 1986. – Т.32, вып.2. – С. 39–43.
- Павиченко О.В. Гемоліз еритроцитів та гемоксигеназна активність у легенях щурів за введення їм хлориду кадмію та фенілгідразину // *Матеріали 8 біохімічного з'їзду.* – Укр. біохім. журн. – 2002. – Т.74, №4б. – С.233.
- Путилина Ф.Е. Определение содержания восстановленного глутатиона в тканях // *Методы биохим. исслед.* / Под ред. М.И.Прохоровой. – Л.: Изд-во Ленинград.ун-та, 1982. – С.183–185.
- Стрельченко Е.В., Никитченко И.В., Калиман П.А. Гемоксигеназная активность в органах крыс при введении хлорида кадмия // *Укр. биохим. журн.* – 2002. – Т.74, №5. – С. 107–111.
- Bottomley R.H., Pilot H.C., Potter V.R., Morris H.P. Metabolic adaptations in rat hepatomas. V. Reciprocal relationship between threonine dehydrase and glucose-6-phosphate dehydrogenase // *Cancer Res.* – 1963. – Vol.23, №3. – P.409.
- Karmakar R., Bhattacharya R., Chatterjee M. Biochemical, haematological and histopathological study in relation to time-related cadmium-induced hepatotoxicity in mice // *Biometals.* – 2000. – Vol.13, №3. – P. 231–239.
- Karmakar R., Roy S., Chatterjee M. The effects of cadmium on the hepatic and renal levels of reduced glutathione, the activity of glutathione S-transferase and gamma glutamyl transpeptidase // *J. Environ. Pathol. Toxicol. Oncol.* – 1999. – Vol.18. – P. 29–35.
- Kim M.S., Kim B.J., Woo H.N. et al. Cadmium induces caspase-mediated cell death: suppression by Bcl-2 // *Toxicology.* – 2000. – Vol.145. – P. 27–37.
- Leopold J.A., Zhang Y-Y., Scribner A.W. et al. Glucose-6-phosphate dehydrogenase overexpression decreases endothelial cell oxidant stress and increases bioavailable nitric oxide // *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* – 2003. – Vol.23. – P. 411–417.
- Meister A., Anderson M.E. Glutathione // *Ann. Rev. Biochem.* – 1983. – Vol.52. – P. 711–760.
- Miller G.L. Protein determination for large numbers of samples // *Anal. Chem.* – 1959. – Vol.31, №5. – P. 964–966.
- Sarkar S., Yadav P., Trivedi R. et al. Cadmium-induced lipid peroxidation and the status of the antioxidant system in rat tissues // *J. Trace Elem. Med. Biol.* – 1995. – Vol.9, №3. – P. 144–149.
- Seigers C.P., Schenke M., Younes M. Influence of cadmium chloride, mercuric chlorides and sodium vanadate on the glutathione-conjugating enzyme system in liver, kidney, and brain of mice // *J. Toxicol. Environ. Health.* – 1987. – Vol.22. – P. 141–148.
- Shukla G.S., Shukla A., Potts R.J. et al. Cadmium-mediated oxidative stress in alveolar epithelial cells induced the expression of gamma-glutamylcysteine synthetase catalytic subunit and glutathione-S-transferase alpha and pi isoforms: potential role of activator protein // *Cell Biol. Toxicol.* – 2000. – Vol.16. – P. 347–362.
- Tandon S.K., Prasad S., Singh S. Chelation in metal intoxication: influence of cysteine of N-acetyl cysteine on the efficiency of 2,3-dimercaptopropane-1-sulphonate in the treatment of cadmium toxicity // *J. Appl. Toxicol.* – 2002. – Vol.22, №1. – P. 67–71.

АКТИВНОСТЬ РЯДА АНТИОКСИДАНТНЫХ ФЕРМЕНТОВ И СОДЕРЖАНИЕ ВОССТАНОВЛЕННОГО ГЛУТАТИОНА В ПЕЧЕНИ КРЫС ПРИ ДЕЙСТВИИ ХЛОРИДА КАДМИЯ

Т.В.Баранник

Установлено снижение активности глутатионредуктазы в печени в первые часы после введения хлорида кадмия *in vivo*, которое не сопровождалось изменениями содержания восстановленного глутатиона. Предварительное введение токоферола предотвращало изменения активностей глутатион-S-трансферазы и глутатионредуктазы под влиянием хлорида кадмия, но не предупреждало повышение активности глюкозо-6-фосфатдегідрогеназы. Введение унітіола, напротив, предотвращало рост глюкозо-6-фосфатдегідрогеназної активності і вызвало більш раннє і довге підвищення глутатіон-S-трансферазної активності под впливом хлориду кадмія. Різний ефект токоферола і унітіола на

изменения активности глутатион-S-трансферазы и глюкозо-6-фосфатдегидрогеназы в печени при введении хлорида кадмия может отражать особенности их регуляции, в том числе роль свободнорадикального окисления и прямого действия ионов кадмия на активность или экспрессию указанных ферментов.

Ключевые слова: *восстановленный глутатион, глутатион-S-трансфераза, глутатионредуктаза, глюкозо-6-фосфатдегидрогеназа, печень, хлорид кадмия, токоферол, унитиол.*

ACTIVITY OF SEVERAL ANTIOXIDANT ENZYMES AND REDUCED GLUTATHIONE CONTENT IN RAT LIVER UNDER CADMIUM CHLORIDE ACTION

T.V.Barannik

The decrease of glutathione reductase activity at first hours after cadmium chloride injection in vivo was found to be not followed by changes of reduced glutathione content. Pretreatment by tocoferol prevented the alterations of glutathione-S-transferase and glutathione reductase activities under cadmium chloride action but didn't prevent the increase of glucose-6-phosphate dehydrogenase activity. Injection of unithiol, on the contrary, prevented the increase of glucose-6-phosphate dehydrogenase activity and caused more early and prolonged increase of glutathione-S-transferase activity under cadmium chloride action. Different effect of tocoferol and unithiol on the alterations of glutathione-S-transferase and glucose-6-phosphate dehydrogenase activities in liver under cadmium chloride action could reflect the peculiarities of their regulation including the role of free radical oxidation and direct action of cadmium ions on activity or expression of enzymes mentioned.

Key words: *reduced glutathione, glutathione-S-transferase, glutathione reductase, glucose-6-phosphate dehydrogenase, liver, cadmium chloride, tocoferol, unithiol.*

Представлено О.П.Білозоровим
Рекомендовано до друку Є.Е.Перським