*Биомедицинская химия, 2006, том 52, вып. 5, с. 469-478.*

УДК 577.32: 577.151.04


# ГИПОХЛОРНАЯ КИСЛОТА МОДИФИЦИРУЕТ ФЕРМЕНТЫ ПЕНТОЗО-ФОСФАТНОГО ПУТИ И АНТИОКСИДАНТНОЙ ЗАЩИТЫ В ТКАНЯХ ПЕЧЕНИ И СЕРДЦА КРЫСЫ *IN VITRO*

***Е.А. Лапшина, Е.Ю. Судникович, В.Л. Кубышин, С.В. Забродская, Ю.З. Максимчик, И.Б. Заводник***

Институт биохимии НАН Беларуси, Беларусь, 230017, Гродно,
Бульвар Ленинского Комсомола–50; тел.: +375 152 337935;
факс: +375 152 334121; эл. почта: hepato@biochem.unibel.by

Гипохлорная кислота - биологический окислитель, генерируемый активированными нейтрофилами, - играет роль важнейшего медиатора воспалительных повреждений в тканях млекопитающих. Целью настоящей работы было изучение окислительной модификации гипохлорной кислотой ферментов антиоксидантной защиты и ферментов пентозофосфатного пути поставляющего восстановительные эквиваленты для систем антиоксидантной защиты. Гипохлорная кислота HOCl (100-1000 мкМ) *in vitro* дозозависимо ингибировала ферменты пентозофосфатного пути постмитохондриальной фракции гомогенатов печени. При концентрации окислителя 100 нмоль/мг белка активность транскетолазы в ткани печени уменьшалась на 65±5 %, глюкозо-6-фосфатдегидрогеназы – на 50±5%, 6-фосфоглюконатдегидрогеназы – на 55±5%; активности глутатионпероксидазы и каталазы уменьшались незначительно. В постмитохондриальной фракции гомогената ткани сердца гипохлорная кислота в том же диапазоне концентраций значительно ингибировала каталазу, повышала активность глутатионпероксидазы и существенно уменьшала активность ключевых ферментов пентозофосфатного пути. Ингибирование ферментов пентозофосфатного пути сопровождалось уменьшением уровня внутриклеточного глутатиона, окислительной модификацией белков (образованием белковых карбонилов, смешанных дисульфидов глутатиона с белками, хлораминов), а также перекисным окислением мембранных липидов. Клеточные компоненты сердечной мышцы более чувствительны к окислительному повреждению гипохлорной кислотой по сравнению с компонентами ткани печени.

**Ключевые слова:** окислительный стресс, гипохлорная кислота, пентозо-фосфатный путь, глутатионпероксидаза, каталаза.

**ВВЕДЕНИЕ.** Многие патологические процессы в тканях сопровождаются инфильтрацией лейкоцитов, развитием воспаления и последующим некрозом. Важнейшую роль в воспалительных повреждениях тканей играет гипохлорная кислота (HOCl), образуемая активированными нейтрофилами и моноцитами в очагах воспаления [1,2], например, в очагах ишемии-реперфузии миокарда [3]. Концентрация HOCl может достигать в тканях при патологических состояниях 200 мкМ [4]. Высокая цитотоксичность гипохлорной кислоты, которая взаимодействует с большинством биологических молекул как двух-электронный окисляющий агент или хлорирующий агент [5], продемонстрирована на различных типах клеток. Ранее, используя клетки линии B14 китайского хомячка, мы продемонстрировали, что цитотоксичность гипохлорной кислоты обусловлена повреждением ДНК и клеточных белков (образованием белковых карбонилов и окислением SH-групп) [6]. Индуцируемая HOCl гибель клеток протекает как по некротическому, так и по апоптотическому механизмам, в зависимости от концентрации окислителя [7].

HOCl легко проникает через клеточную мембрану и взаимодействует с внутриклеточными компонентами, в первую очередь, с клеточными тиолами. В эритроцитах, экспонированных HOCl, восстановленный глутатион (GSH) первоначально превращался в дисульфидную форму [8]; в эндотелиальных клетках в качестве основного продукта окисления GSH предполагают глутатион сульфонамид [7]. HOCl легко окисляет остатки цистеина и метионина белков [9], хлорирует аминогруппы лизина и N-концевые аминогруппы с образованием хлораминов [10], хлорирует остатки тирозина и триптофана [11]. Одновременно, гипохлорная кислота индуцирует перекисное окисление липидов липопротеинов плазмы крови и фосфолипидных липосом [12]. Следует отметить, что в клетке отсутствуют специфические ферментные системы детоксикации гипохлорной кислоты.

Существенную роль в предотвращении окислительных повреждений тканей играют ферменты антиоксидантной защиты: глутатионпероксидаза (GSH:$H_2O_2$ оксидоредуктаза, КФ 1.11.1.9), каталаза (перекись водорода: оксидоредуктаза, КФ 1.11.1.6), супероксиддисмутаза (перекись: перекись оксидоредуктаза, КФ 1.15.1.1), а также важнейший внутриклеточный антиоксидант - восстановленный глутатион GSH. Аэробный пентозофосфатный путь обмена глюкозы играет важнейшую роль в поддержании восстановленного состояния пиридиннуклеотидов (NADPH). NADPH, в свою очередь, обеспечивает восстановление глутатиона из его дисульфидной формы в глутатионредуктазном цикле. Цель настоящей работы - изучение процессов окислительной модификации *in vitro* гипохлорной кислотой ферментов антиоксидантной защиты и ферментов пентозофосфатного пути, поставляющие восстановительные эквиваленты для систем антиоксидантной защиты. В качестве объектов исследования были выбраны постмитохондриальные фракции гомогенатов ткани сердца и печени крыс. Подобного рода исследования могут оказаться полезными при изучении механизмов гепато- и кардиотоксичности и поиске эффективных гепато- и кардиопротекторов при окислительном (электрофильном) повреждении тканей.

**МЕТОДИКА.** В работе использовали гипохлорит натрия (NaOCl), 5,5’-дитиобис (2-нитробензойную кислоту) (реактив Эллмана), 2-тиобарбитуровую кислоту (ТБК), трихлоруксусную кислоту (ТХУ), метионин, 2,4-динитрофенилгидразин (ДНФГ), гуанидин гидрохлорид, NADH, GSH (“”Sigma-Aldrich Chemie GmbH”, Германия); рибозо-5-фосфата динатриевую соль, глюкозо-6-фосфата динатриевую соль, 6-фосфоглюконата трициклогексиламмониевую соль (“Reanal”, Венгрия).

В работе использовали ткани сердца и печени крыс-самцов линии Вистар массой 170-190 г. Животных декапитировали под эфирным наркозом, печень и сердце немедленно перфузировали холодным (4°C) 0,15 М раствором KCl, извлекали и гомогенизировали в том же растворе (печень – в 3-х объемах, сердце – в 5 объемах) в стеклянном гомогенизаторе с тефлоновым пестиком. Постмитохондриальную фракцию получали последовательным центрифугированием при 3000 g в течение 10 мин и 12000 g в течение 20 мин при 4°C.

Окислительную модификацию проводили, инкубируя постмитохондриальные фракции гомогенатов тканей с различными концентрациями HOCl в течение 1 часа при 22°C. Концентрацию HOCl определяли спектрофотометрически, используя коэффициент экстинкции 350 $M^{-1}\cdot см^{-1}$ (292 нм) при pH 9,0 [13]. Концентрация белка в пробе составляла 5-8 мг/мл. Реакцию HOCl с клеточными компонентами останавливали метионином (1 мМ). Окислительные повреждения тканей оценивали, измеряя активность ферментов пентозофосфатного пути и антиоксидантной защиты, регистрируя уровень модификации функциональных групп белков, содержание восстановленного глутатиона и продуктов перекисного окисления липидов мембран.

Активность глутатионпероксидазы в постмитохондриальной фракции печени и сердца определяли по методу, предложенному Martinez и соавт. [14]. Инкубационная среда содержала 0,1 М трис-HCl буфер, pH 8,0, 1 мМ ЭДТА, 12 мМ азид натрия, 2 мМ третбутилгидропероксид (ТБГП) и 4,8 мМ GSH (последние в качестве косубстратов глутатион пероксидазной реакции). Концентрация белка в пробе составляла 0,04 мг/мл в случае постмитохондриальной фракции ткани печени и 0,05 мг/мл – в случае постмитохондриальной фракции ткани сердца, объем пробы – 1 мл. Реакцию останавливали добавлением 0,2 мл 25% ТХУ через 10 мин инкубации при 37°C. Активность фермента определяли по количеству GSH, окисленного в глутатионпероксидазной реакции, используя реактив Эллмана [15].

Активность каталазы определяли по методу, предложенному Aebi [16] в модификации Королюка и соавт. [17]. Количество перекиси водорода, расщепляемой в каталазной реакции, измеряли по концентрации окрашенного комплекса, образуемого $H_2O_2$ с молибдатом аммония, используя полученное нами значение коэффициента экстинкции комплекса $H_2O_2$-молибдат 103 $М^{-1}\cdot см^{-1}$. Реакционная среда содержала 8 мМ $H_2O_2$ в воде, концентрация белка в пробе - 0,014 мг/мл в случае ткани печени и 0,12 мг/мл в случае ткани сердца, объём пробы – 2 мл. Реакцию останавливали, добавляя 1 мл 4% молибдата аммония через 5 мин инкубации при 37°C используя полученное нами значение коэффициента экстинкции комплекса $H_2O_2$-молибдат 103 $М^{-1}\cdot см^{-1}$. В используемом интервале времени количество субстрата, потребляемого в глутатионпероксидазной и каталазной реакции, линейно зависело от времени реакции.

Ферментативную активность транскетолазы (ТК) определяли спектрофотометрически по скорости окисления NADH в 50 мМ трис-HCl буфере, pH 7,6 при 18±1°C, регистрируя убыль оптической плотности при 340 нм [18]. Реакционная среда (1,7 мл) содержала 0,1 мМ NADH, 3 мМ $MgCl_2$, 5 мМ рибозо-5-фосфат; триозофосфатизомеразу, эпимеразу/изомеразу фосфопентоз и глицеролфосфатдегидрогеназу в избытке, концентрация белка в пробе – 0,5 мг/мл. Реакцию инициировали внесением субстрата, рибозо-5-фосфата.

Активность глюкозо-6-фосфатдегидрогеназы (Г6ФДГ) и 6-фосфоглюконат-дегидрогеназы (6ФГДГ) определяли спектрофотометрически по скорости восстановления $NADP^+$, регистрируя возрастание оптической плотности при 340 нм в 0,1 М трис-HCl буфере, pH 7,6, при 18±1°C [18]. Концентрация белка в пробе составляла в случае Г6ФДГ – 0,05 мг/мл и в случае 6ФГДГ – 0,1 мг/мл, реакцию инициировали внесением насыщающих концентраций субстратов – динатриевой соли глюкозо-6-фосфата в случае Г6ФДГ и трициклогексиламмониевой соли 6-фосфоглюконата в случае 6ФГДГ.

Уровень белковых карбонильных групп определяли спектрофотометрически по образованию окрашенных продуктов взаимодействия карбонилов с ДНФГ по методу Levine et al. [19], используя коэффициент экстинкции образующихся гидразонов 22000 $М^{-1}\cdot см^{-1}$ (350-375 нм) [19].

Содержание продуктов перекисного окисления липидов определяли спектрофотометрически как количество ТБК-реактивных продуктов (ТБКП) в кислоторастворимой фракции постмитохондриального супернатанта гомогенатов печени и сердца крыс по методу Stocks и Dormandy [20]. Концентрацию GSH определяли спектрофотометрически в кислоторастворимой фракции постмитохондриального супернатанта гомогенатов печени и сердца крыс по методу Эллмана, используя коэффициент экстинции 13,6 $М^{-1}\cdot см^{-1}$ (412 нм) [15]. Концентрацию смешанных дисульфидов с белками PSSG определяли по методу, описанному Rossi at al. [21]. Содержание долгоживущих хлораминов в постмитохондриальной фракции гомогенатов печени и сердца крыс определяли по окислению 5-тио-2-нитробензойной кислоты, которую получали щелочным гидролизом (0,1 М NaOH) реактива Эллмана, как описано ранее [22]. Концентрацию белка определяли по методу Лоури [23].

*Статистический анализ.* Все результаты представляли в виде средних значений 5-7 измерений ± стандартное отклонение, достоверность измерений анализировали статистически с помощью вариационного анализа (ANOVA).

**РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ.** Базальный уровень активности каталазы значительно превышал уровень активности глутатионпероксидазы в нативных тканях печени и сердца (таблица). Можно предположить, что каталаза играет основную роль в детоксикации образующихся гидроперекисей. Активность каталазы и глутатионпероксидазы, уровень восстановленного глутатиона были значительно выше в ткани печени по сравнению с тканью сердца (таблица).

Таблица. Базальный уровень компонентов системы антиоксидантной защиты в тканях сердца и печени крыс.

| Параметр, ед. измерения | Сердце | Печень |
|---|---|---|
| Глутатионпероксидаза, мкмоль GSH/мин на мг белка | 3,3±0,5 | 6,6±1,0* |
| Каталаза, мкмоль $H_2O_2$/мин на мг белка | 8,1±1,2 | 129,8±19,4* |
| GSH, нмоль/мг белка | 24,3±5,4 | 40,5±7,0* |
| ТБКП, нмоль/мг белка | 0,055±0,012 | 0,09±0,02* |
| Белковые карбонилы, нмоль/мг белка | 0,8±0,16 | 1,9±0,3* |
| Смешанные дисульфиды глутатиона с белками, нмоль/мг белка | - | 2,1±0,35 |

Примечание: * - p< 0,05 по сравнению с соответствующими значениями параметров в ткани сердца.

На рисунках 1 и 2 приведены кривые ингибирования гипохлорной кислотой основных ферментов пентозофосфатного пути: транскетолазы, глюкозо-6-фосфатдегидрогеназы и 6-фосфоглюконат дегидрогеназы в тканях печени и сердца крыс. Экспонирование постмитохондриальной фракции ткани печени окислителю в концентрации 100 нмоль/мг белка ингибирует транскетолазную реакцию на 65±5%, Г6ФДГ реакцию на 50±5%, 6ФГДГ реакцию – на 55±5%. В случае экспонирования ткани сердца с той же концентрацией окислителя степень ингибирования составила соответственно: для ТК реакции - 55±5%, для Г6ФГ реакции - 55±5% и для 6ФГДГ реакции - 15±3%.

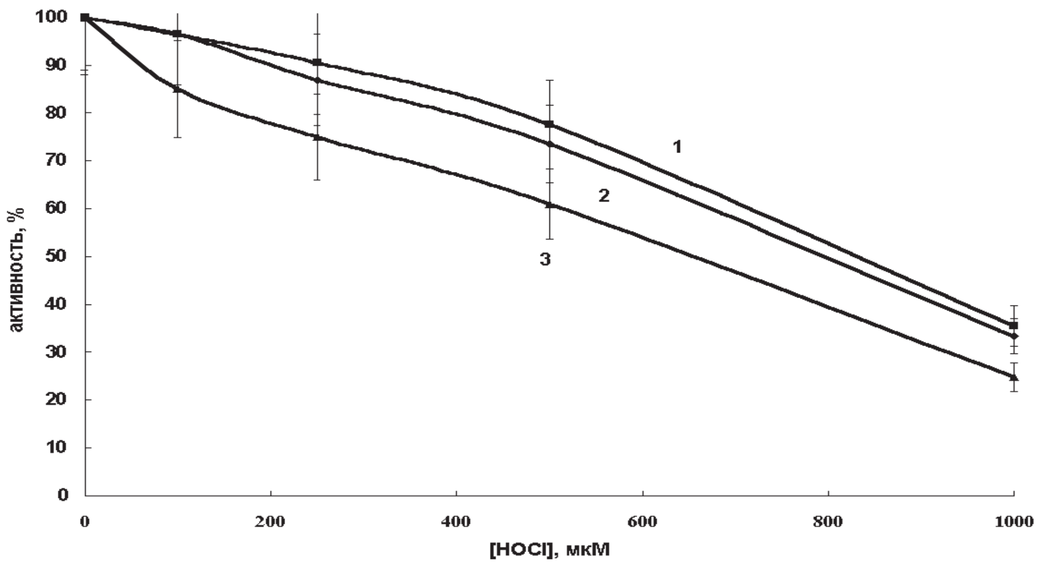


**Рисунок 1.**
Ингибирование гипохлорной кислотой ферментов пентозо-фосфатного пути: 1) глюкозо-6-фосфатдегидрогеназы; 2) 6-фосфоглюконатдегидрогеназы и 3) транскетолазы в постмитохондриальной фракции ткани печени. Концентрация белка - 8 мг/мл, 0,15 М KCl, 22°C, время экспонирования с окислителем – 1 час.

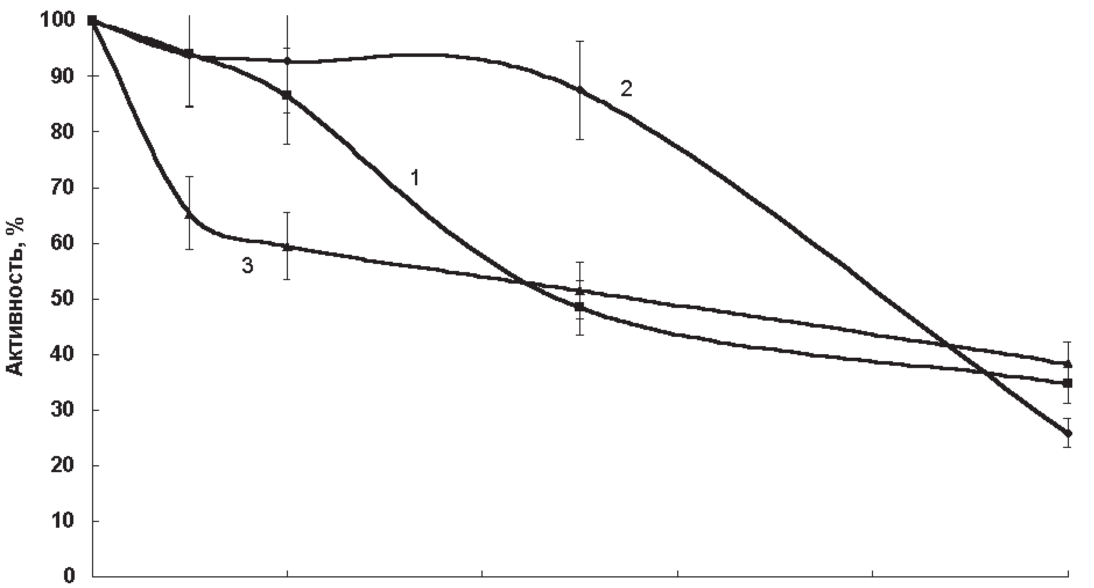


**Рисунок 2.**
Ингибирование гипохлорной кислотой ферментов пентозо-фосфатного пути: 1) глюкозо-6-фосфатдегидрогеназы; 2) 6-фосфоглюконатдегидрогеназы и 3) транскетолазы в постмитохондриальной фракции ткани сердца. Концентрация белка - 5 мг/мл, 0,15 М KCl, 22°C, время экспонирования с окислителем – 1 час.

Ингибирование ферментов пентозофосфатного пути в тканях печени и сердца сопровождалось эффективным окислением внутриклеточного глутатиона (рис. 3), который рассматривают как важнейший скэвенжер генерируемых провоспалительными клетками окислительных агентов, в первую очередь, гипохлорной кислоты и хлораминов. HOCl в концентрации 50 нмоль/мг белка окисляла ~ 15 нмоль GSH/мг белка в ткани сердца и ~10 нмоль GSH/мг белка в ткани печени. Стехиометрия окисления внутриклеточного глутатиона в тканях печени и сердца оказалась равной [HOCl]/[окисленный GSH] = 5/1 (рис. 3). Ранее, в случае эритроцитов человека определенная нами стехиометрия процесса окисления GSH составила [HOCl]/[окисленный GSH] = 4/1 [24].

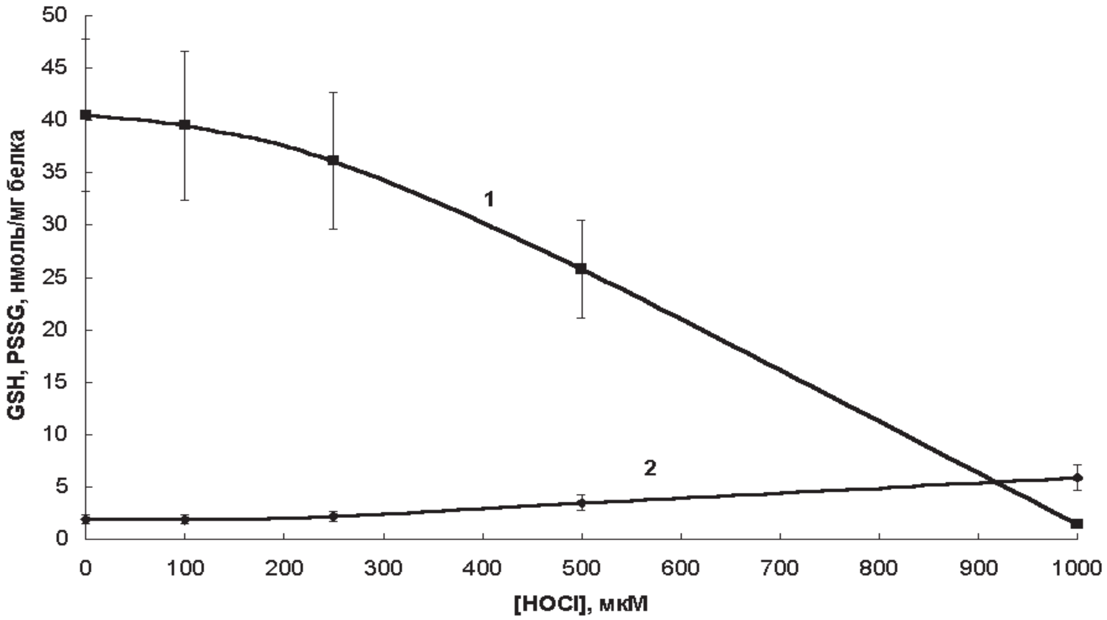


**Рисунок 3.**
Окисление восстановленного глутатиона GSH (1) и образование смешанных дисульфидов глутатиона с белками PSSG (2) в постмитохондриальной фракции ткани печени в присутствии гипохлорной кислоты. Концентрация белка - 8 мг/мл, 0,15 М KCl, 22°C, время экспонирования с окислителем – 1 час.

Обнаруженная нами инактивация ферментов пентозофосфатного пути, индуцированная гипохлорной кислотой, коррелировала с накоплением продуктов окислительной модификации белков (рис. 3, кривая 2, и рис. 4, кривые 1 и 2). При полном окислении внутриклеточного GSH около 10-12% от уровня общего глутатиона расходовалось на образование смешанных дисульфидов с гепатоцитарными белками (рис. 3). Рисунок 4 показывает образование белковых карбонильных групп (кривая 1) и хлораминов (кривая 2) в тканях печени в присутствии гипохлорной кислоты. Как видно из рисунка 4, содержание карбонильных групп белков в тканях печени при окислительном воздействии увеличивалось почти на 50%. Уровень белковых карбонилов возрастал в тканях сердца от 0,8 нмоль/мг белка в контрольных образцах до 1,2 нмоль/мг белка при концентрации окислителя 1 мМ. Как видно, модификация затрагивает сульфгидрильные группы (образование смешанных дисульфидов глутатиона с белками) и аминогруппы (эффективное образование хлораминов и карбонильных групп) белков. Образование белковых хлораминов и смешанных дисульфидов глутатиона с белками наблюдали лишь после окисления значительной части восстановленного глутатиона (рис. 3).

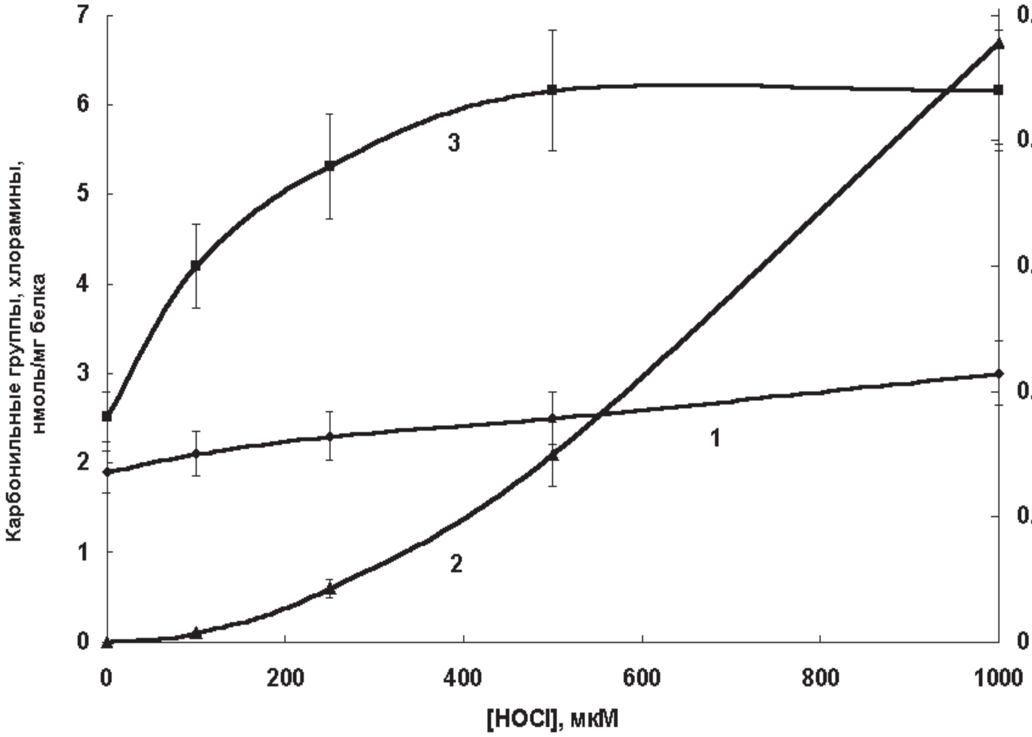


**Рисунок 4.**
Образование белковых карбонильных групп (1), хлораминов (2) и окисление мембранных липидов (образование ТБКП) (3) в постмитохондриальной фракции ткани печени в присутствии гипохлорной кислоты. Концентрация белка - 8 мг/мл, 0,15 M KCl, 22°C, время экспонирования с окислителем – 1 час.

Одновременно мы наблюдали перекисное окисление мембранных липидов (рис. 4 и 5). Ранее было показано, что гипохлорная кислота ингибировала активность изолированных глюкозо-6-фосфатдегидрогеназы, вызывая фрагментацию фермента [25] и глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназы, окисляя сульфгидрильную группу активного центра фермента [26].

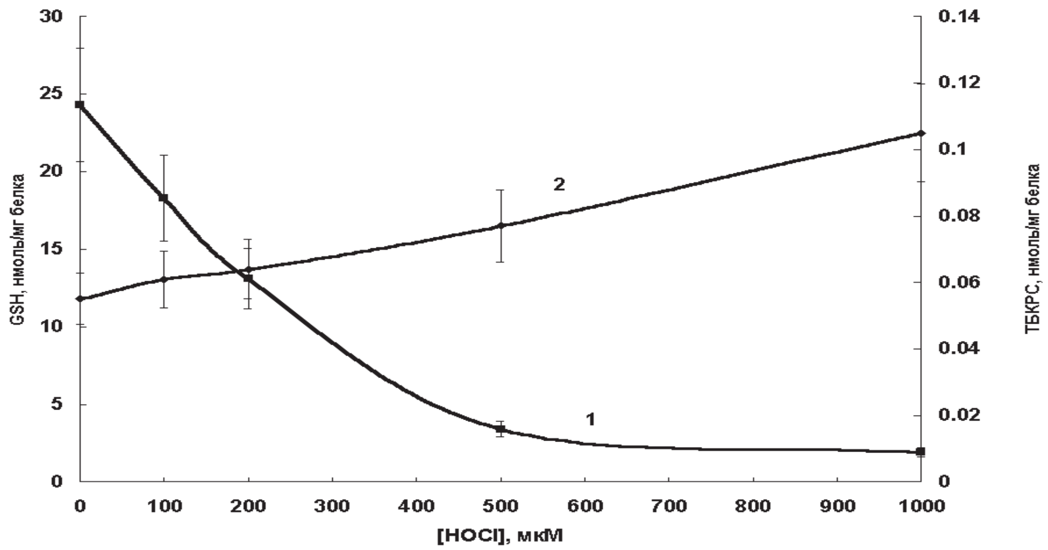


**Рисунок 5.**
Окисление восстановленного глутатиона GSH (1) и образование продуктов перекисного окисления липидов (ТБКП) (2) в постмитохондриальной фракции ткани сердца в присутствии гипохлорной кислоты. Концентрация белка - 5 мг/мл, 0,15 M KCl, 22°C, время экспонирования с окислителем – 1 час.

В постмитохондриальной фракции ткани печени гипохлорная кислота ингибировала основные ферменты антиоксидантной защиты клетки. При концентрации окислителя 500 мкМ активность глутатионпероксидазы уменьшалась на 10±3,5% и каталазы - на 25±5% (рис. 6). В ткани миокарда гипохлорная кислота в той же концентрации значительно ингибировала каталазу (на 75±5%). Обнаруженное при этом достоверное повышение активности глутатионпероксидазы (на 20±5 %) (рис. 7) можно рассматривать как способ адаптации ткани миокарда к окислительному воздействию. Как видно из данных рисунков 6 и 7 чувствительность ферментов антиоксидантной защиты миокарда к окислительному стрессу, индуцируемому HOCl, выше по сравнению с ферментами печени.

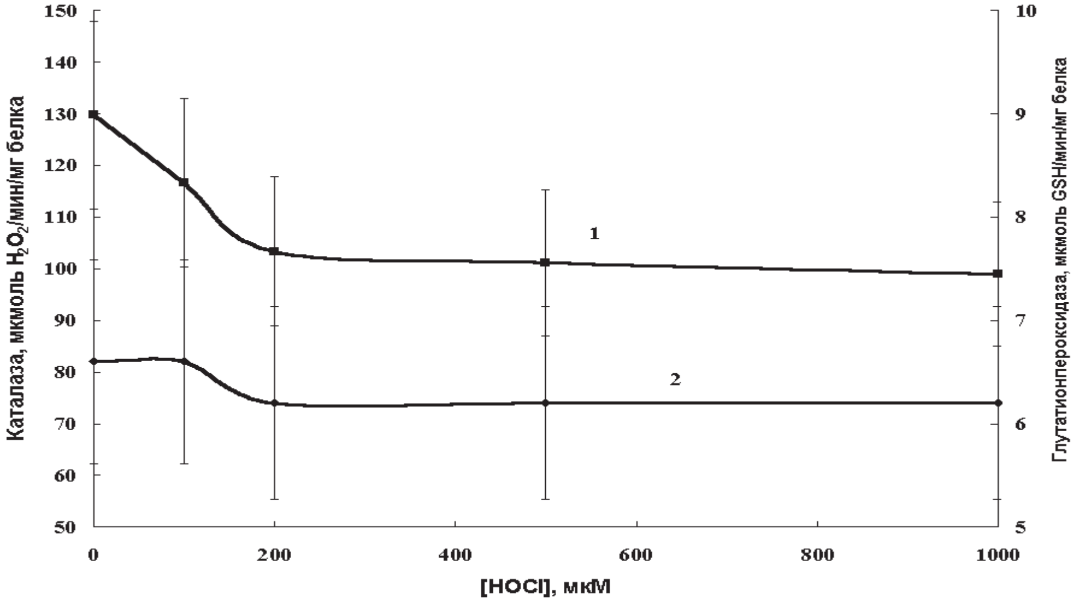


**Рисунок 6.**
Ингибирование гипохлорной кислотой каталазы (1) и глутатионпероксидазы (2) в постмитохондриальной фракции ткани печени. Концентрация белка - 8 мг/мл, 0,15 M KCl, 22°C, время экспонирования с окислителем – 1 час.

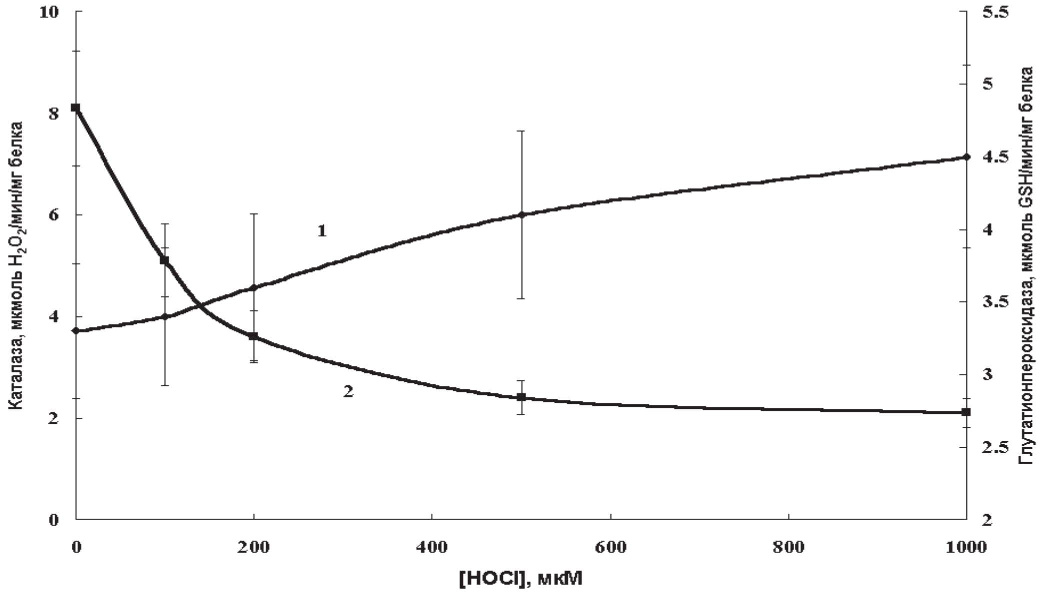


**Рисунок 7.**
Эффект гипохлорной кислоты на активность глутатионпероксидазы (1) и каталазы (2) в постмитохондриальной фракции ткани сердца. Концентрация белка - 5 мг/мл, 0,15 M KCl, 22°C, время экспонирования с окислителем – 1 час.

Ранее была показана быстрая инактивация глутатионпероксидазы и каталазы гипохлорной кислотой [27, 28]. В случае каталазы была предложена схема процесса, включающая аксиальное лигандирование одного или двух ионов $OCl^-$ ионом железа гема с последующим расщеплением O-Cl связи [28].

**ЗАКЛЮЧЕНИЕ И ВЫВОДЫ.** Многие патологические процессы в органах и тканях, в частности, ишемия-реперфузия сердца или печени, сопровождаются инфильтрацией и активацией полиморфноядерных лейкоцитов и генерацией HOCl. В настоящей работе мы продемонстрировали, что развивающийся в присутствии HOCl окислительный стресс приводит к деградации клеточных тиолов, в первую очередь, GSH, окислительной модификации белков и мембран. Одновременно наблюдали ингибирование ферментов антиоксидантной защиты, в частности, каталазы сердца. Процессы восстановления глутатиона и метаболизма ксенобиотиков сопровождаются истощением NADPH, что должно усиливать метаболизм через пентозофосфатный шунт, окислительная ветвь которого является основным источником NADPH в клетке. Показанное нами ингибирование ферментов пентозофосфатного пути будет нарушать синтез NADPH, необходимого для глутатионредуктазного цикла. Ткань сердца оказалась более чувствительной к HOCl-индуцируемым окислительным повреждениям по сравнению с тканью печени.

## ЛИТЕРАТУРА


1. *Davies J.M., Horwitz D.A., Davies K.J.* (1993) Free Radic. Biol. Med., **15**, 434-437.
2. *Klebanoff S.J.* (1988) in Inflammation: Basic principles and clinical correlates. Raven Press, New York, pp. 391-443.
3. *Kukreja R.C., Weaver A.B., Hess, M.L.* (1990) Am. J. Physiol, **259**, H1330-H1336.
4. *Favero T.G., Colter D., Hooper P.F., Abramson J.J.* (1998) J. Appl. Physiol., **84**, 425-430.
5. *Kampf C., Roomans, G.M.* (2001) Free Rad. Res., **34**, 499-511.
6. *Zavodnik I.B., Lapshina E.A., Zavodnik L.B., Labieniec M., Bryszewska M., Reiter R.J.*, (2004) Mutat. Res., **559**, 39-48.
7. *Pullar J.V., Vissers M.C.M., Winterbourn C.C.* (2000) IUBMB Life, **50**, 259-266.
8. *Carr A.C., Winterbourn C.C.* (1997) Biochem. J., **327**, 275-281.
9. *Armstrong D.A., Buchanan J.D.* (1978) Photochem. Photobiol, **28**, 743-755.
10. *Thomas E.L., Learn D.B.* (1991) in Peroxidases in Chemistry and Biology. (Everse J., Everse K.E., Grisham, M.B., eds.), CRC Press, Boca Raton, FL, pp. 83-103.
11. *Domigan N.M., Charlton T.S., Duncan M.W., Winterbourn C.C., Kettle, A.J.* (1995) J. Biol. Chem., **270**, 16542-16548.
12. *Panasenko O.M., Evgina S.A., Driomina E.S., Sharov V.S., Sergienko V.I., Vladimirov Yu.A.* (1995) Free Radic. Biol. Med., **19**, 133-140.
13. *Morris J.C.* (1966) J. Phys. Chem., **70**, 3798-3805.
14. *Martinez J.I.R., Launay J.M., Dreux C.* (1979) Anal. Biochem., **98**, 154-159.
15. *Ellman G.* (1959) Arch. Biochem. Biophys., **82**, 70-77.
16. *Aebi H.* (1984) Meth. Enzymol., **105**, 121-126.
17. *Королюк М.А., Иванова Л. И., Майорова И.Г., Токарев В.Е.* (1988) Лаб. дело, № 1, 16-19.
18. *Кочетов Г.А.* (1980) Практическое руководство по энзимологии, Высшая школа, Москва.
19. *Levine R.L., Williams J.A., Stadtman E.R., Shacter E.* (1994) Methods Enzymol., **186,** 346-357.
20. *Stocks J., Dormandy T.L.* (1971) Br. J. Haemol., **20**, 95-111.
21. *Rossi R., Cardaioli E., Scaloni A., Amiconi G., Di Sipplicio P.* (1995) Biochim. Biophys. Acta, **1243**, 230-238.

22. *Vissers M.C.M., Winterbourn, C.C.* (1995) Biochem. J., **307**, 57-62.
23. *Lowry O.H., Rosebrough N.J., Farr A.L., Randall R.J.* (1951) J. Biol. Chem., **193**, 265-275.
24. *Soszynski M., Zavodnik I.B., Zavodnik L.B., Zylinska L., Bartosz G., Bryszewska M.* (2002) Biochim. Biophys. Acta, **1564**, 479-486.
25. *Ullrich O., Reinheckel T., Sitte N., Grune T.* (1999) Free Radic. Biol. Med., **27**, 487-492.
26. *Pullar J.V., Winterbourn C.C., Vissers M.C.M.,* (1999) Am. J. Physiol. **277**, H1505-H1512.
27. *Aruoma O.I., Halliwell B.* (1987) Biochem. J., **15**, 973-976.
28. *Mashino T., Fridovich I.* (1988) Biochim. Biophys. Acta, **31**, 63-69.


Поступила: 15. 04. 2005.

## HYPOCLOROUS ACID MODIFIES RAT LIVER AND HEART ENZYMES OF THE PENTOSE PHOSPHATE PATHWAY AND ANTIOXIDATIVE DEFENCE *IN VITRO*

***E.A. Lapshina, E.Ju. Sudnikovich, V.L. Kubyshin, S.V. Zabrodskaya, Ju.Z. Maksimchik, I.B. Zavodnik***

Institute of Biochemistry, NAS of Belarus, BLK–50, Grodno, 230017 Belarus;
tel.: + 375152337935; fax: +375152334121; e-mail: hepato@biochem.unibel.by

Hypoclorous acid is an effective biological oxidant produced by activated neutrophils. HOCl plays a role of the major inflammation mediator in mammalian tissues. The aim of the present study was to investigate the mechanisms of hypochlorous acid-induced modification of antioxidant enzymes, which defence the cell under oxidative stress, and enzymes of the pentose phosphate pathway, which supply reducing equivalents in the cell. HOCl (100-1000 μM) *in vitro* inhibited considerably in a dose-dependent manner the activity of the enzymes of the pentose phosphate pathway in the rat liver postmitochondrial fraction. HOCl at a concentration of 100 nmol/mg protein inhibited transketolase activity by 65±5%, glucose-6-phosphate dehydrogenase - by 50±5% and 6-phosphogluconate dehydrogenase - by 55±5%. The activities of glutathione peroxidase and catalase slightly decreased. On the contrary, in the rat heart postmitochondrial fraction HOCl (100-1000 μM) inhibited considerably catalase, increased glutathione peroxidase activity and decreased significantly the activity of the key enzymes of the pentose phosphate pathway. The inhibition of the pentose phosphate pathway enzymes was accompanied by oxidation of intracellular reduced glutathione, oxidative protein modification (protein carbonyl group accumulation, mixed protein-glutathione disulphides and chloramine formation), and membrane lipid peroxidation. The sensitivity of rat heart cell components to oxidative damage by HOCl was higher in comparison with that of the liver.

**Key words:** oxidative stress, hypoclorous acid, pentose phosphate pathway, glutathione peroxidase, catalase.