

УДК 616.36-002:577.34+577.15
© Коллектив авторов

ДЕЙСТВИЕ ТИОКТОВОЙ КИСЛОТЫ НА ФУНКЦИОНИРОВАНИЕ АНТИОКСИДАНТНОЙ ГЛУТАТИОНЗАВИСИМОЙ СИСТЕМЫ ПРИ ТОКСИЧЕСКОМ ГЕПАТИТЕ У КРЫС

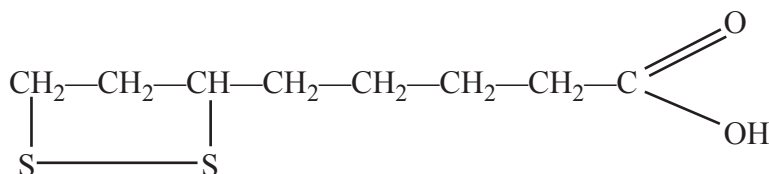
А.В. Макеева, Т.Н. Попова, Л.В. Матасова*

Воронежский государственный университет, биолого-почвенный факультет,
394693, г. Воронеж, Университетская пл., 1;
тел.: (0732) 20-82-78; факс: (0732) 20-87-55; эл. почта: tpopova@bio.vsu.ru

Проведено исследование действия тиоктовой кислоты при токсическом гепатите у крыс на функционирование антиоксидантной глутатионзависимой системы и активность ферментов, поставляющих для работы данной системы NADPH. При введении тиоктовой кислоты животным с токсическим поражением печени наблюдалось снижение активности глутатионредуктазы и глутатионпероксидазы в сторону нормы. Кроме того, в условиях токсического гепатита введение тиоктовой кислоты вызывало снижение активности NADP-зависимой изоцитратдегидрогеназы и глюкозо-6-фосфатдегидрогеназы, что, очевидно, связано с уменьшением необходимости поставки NADPH для работы глутатионзависимой системы. Таким образом, проведенные исследования показали, что тиоктовая кислота может выступать как фактор, регулирующий степень развития окислительного стресса и состояние глутатионовой антиоксидантной системы.

Ключевые слова: тиоктовая кислота, токсический гепатит, антиоксиданты.

ВВЕДЕНИЕ. Известно, что токсический гепатит может приводить к усилению пероксидного окисления липидов и деструкции гепатоцитов [1]. В связи с этим представляет интерес поиск гепатопротекторов с антиоксидантными свойствами. Недавние исследования показали, что тиоктовая кислота (6,8-дитиооктановая кислота; ТК), являясь простетической группой в 2-оксoglутаратдегидрогеназном комплексе митохондрий, способна влиять на редокс статус клеток и взаимодействовать с тиолами и другими антиоксидантами [2, 3].



Предполагают, что это соединение является эффективным тушителем свободных радикалов, хелатором ионов железа и участвует в реакциях восстановления аскорбата и витамина Е [4]. В последнее время ТК все чаще

*Адресат для переписки

применяется в качестве терапевтического средства при ряде патологических состояний [5]. Однако механизм протекторного действия ТК в различных органах до конца не ясен. Известно, что важнейшая роль в защите от окислительного стресса принадлежит глутатионредуктазной/глутатионпероксидазной антиоксидантной системе, поставщиками NADPH для которой могут служить NADP-зависимая изоцитратдегидрогеназа (NADP-ИДГ; КФ 1.1.1.42) [6] и глюкозо-6-фосфатдегидрогеназа (Г6ФДГ; КФ 1.1.1.49) [7]. В связи с этим целью данной работы явилось изучение действия ТК на функционирование антиоксидантной глутатионзависимой системы и активность ферментов, поставляющих для данной системы NADPH в условиях интенсификации свободнорадикального окисления при токсическом гепатите у крыс.

МЕТОДИКА. В качестве объекта исследования использовали самцов белых лабораторных крыс (*Rattus rattus L.*) массой 150-200 г. Крысы были разделены на 4 экспериментальные группы: в 1-й группе (контроль; n = 8) животных содержали на стандартном режиме вивария; во 2-й группе (n = 8) животным для индуцирования экспериментального токсического гепатита (ЭТГ) вводили гепатотропный токсин CCl_4 в дозе 0,064 мл на 100 г веса после суточной пищевой депривации, максимальный цитолиз гепатоцитов имел место на 4 сутки после однократного введения токсина [7]; в 3-й группе (n = 7) интактным животным внутрибрюшинно вводили ТК (35 мг/кг), ежедневно в течение 3-х дней; в 4-й группе (n = 9) животным после индуцирования ЭТГ вводили ТК в той же дозе в течение 3-х дней. Печень у животных извлекали под наркозом после перфузирования физиологическим раствором. Для получения гомогената навеску печени крысы гомогенизировали в 4-х кратном объеме охлажденной среды выделения (0,1 М трис-HCl-буфер (pH 7,8), содержащий 1 мМ ЭДТА и 1% - меркаптоэтанол). Гомогенат центрифугировали при 7000 g в течение 10 мин. Забор крови осуществляли из сердца. Кровь помещали на 0,5 часа в термостат при 37°C, затем центрифугировали при 3000 g в течение 10 мин. Сыворотку крови использовали для дальнейших исследований. Активность глутатионпероксидазы (ГП; КФ 1.11.1.9), глутатионредуктазы (ГР; КФ 1.6.4.2), Г6ФДГ и NADP-ИДГ определяли спектрофотометрически при 340 нм [8]. За ферментативную единицу (ФЕ) принимали количество фермента, катализирующее превращение 1 микромоля субстрата или образование микромоля продукта за 1 мин при 25°C. Концентрацию восстановленного глутатиона (GSH) определяли с помощью реакции с 5,5-дитио-бис-(2-нитробензойной) кислотой [9]. Для определения активностей аланинаминотрансферазы (АлАТ) и аспартатаминотрансферазы (АсАТ) использовали стандартные наборы "Bio-La-Test". Общий белок определяли по методу Лоури [10]. Содержание первичных продуктов ПОЛ - диеновых конъюгатов (ДК) оценивали спектрофотометрически при 233 нм [11]. Опыты повторяли 3-4 раза, аналитические определения для каждой пробы – 2 раза. Данные обрабатывали с использованием t-критерия Стьюдента, различия считали достоверными при $p < 0,05$. В ходе работы использовали изоцитрат ("Sigma", США), NADPH, трис-HCl-буфер, ЭДТА ("Reanal", Венгрия), тиоктовую кислоту, глутатион окисленный и восстановленный ("ICN", Германия), глутатионредуктазу ("Serva", Германия), 2-ДТНБ ("Merck", Германия), остальные реактивы отечественного производства марки "хч" или "чда".

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ. На 4-й день развития ЭТГ активность АлАТ увеличивалась в 7,7 раза, а активность АсАТ в 4,9 раза по сравнению с группой контрольных животных [8]. Это свидетельствует о развитии цитолитического синдрома, так как эти ферменты являются маркерами степени поражения ткани печени. При введении ТК на фоне развития ЭТГ наблюдалось снижение активности АлАТ в 2,5 раза и активности АсАТ в 1,5 раза по сравнению с животными с патологически измененной печенью. После введения ТК контрольным животным активности АлАТ и АсАТ достоверно не отличались от нормы. Снижение активности АлАТ и АсАТ под действием ТК, очевидно, может

свидетельствовать о позитивном действии этого вещества на клетки печени. Это подтверждается тем, что количество ДК, возрастающее при ЭТГ в печени крыс 1,8 раза [8], а в сыворотке крови в 2,1 раза [12], также снижалось под действием тиоктовой кислоты. Так, содержание ДК в сыворотке крови крыс при введении ТК на фоне развития ЭТГ снижалось в 1,5 раза, а в гомогенате печени крыс на 35,5% относительно данного показателя у животных, подвергнутых токсическому гепатиту (таблица). Очевидно, ТК способствует торможению свободнорадикального окисления при токсическом повреждении печени.

Таблица. Содержание диеновых конъюгатов и восстановленного глутатиона в гомогенате печени и сыворотке крови крыс в норме, при экспериментальном токсическом гепатите и действии тиоктовой кислоты.

Группа животных	Концентрация диеновых конъюгатов, % от контроля		Содержание восстановленного глутатиона, % от контроля	
	Гомогенат печени	Сыворотка крови	Гомогенат печени	Сыворотка крови
2-я	175,0±6,98*	213,0±8,52*	276,0±11,04*	81,1±3,24*
3-я	100,6±4,02	118,8±4,75	109,5±4,38	97,3±3,89
4-я	112,8±4,51*	138,4±5,54*	142,9±5,72*	86,5±3,46*

Примечание: * - отличия от нормы достоверны при $p < 0,05$. За 100 % принимали значение содержания диеновых конъюгатов и восстановленного глутатиона в норме: содержание диеновых конъюгатов в сыворотке крови – 7,5 мкМ, в гомогенате печени крыс – 8,97 мкМ; содержание восстановленного глутатиона в сыворотке крови – 0,37 мМ, в гомогенате печени крыс – 0,21 мМ.

Предполагается, что ТК не только обладает самостоятельным антиоксидантным потенциалом, благодаря наличию тиоловых групп, но и обеспечивает мощную поддержку работы других антиоксидантных звеньев в организме. В этом отношении ее протективное действие тесно связано с гомеостазом в системе глутатиона [13]. В связи с этим, было проведено исследование влияния ТК на уровень GSH в ткани печени и сыворотке крови крыс в норме и при ЭТГ. Содержание GSH, возрастающее под действием ЭТГ в гомогенате печени крыс в 2,8 раза [8], снижалось под влиянием ТК в 1,9 раза по сравнению с животными с патологически измененной печенью (таблица). После введения ТК контрольным животным уровень GSH достоверно не отличался от нормы. Однако введение ТК животным с ЭТГ практически не влияло на содержание GSH в сыворотке крови крыс.

Под действием ТК на фоне развития ЭТГ наблюдалось снижение активности ГП и ГР в гомогенате печени и сыворотке крови крыс, возрастающих при ЭТГ. Установлено, что при введении ТК активность ГП и ГР в гомогенате печени крыс, выраженная в количестве ФЕ на г сырой массы снижалась в 2,2 (рис. 1а) и 1,2 (рис. 2а) раза, а удельная активность - в 2,5 (рис. 1) и 1,5 (рис. 2) раза, соответственно, по сравнению с крысами, подвергнутыми ЭТГ. Сходная тенденция изменения активности ГП и ГР наблюдалась и в сыворотке крови. Возможно, ТК, уменьшая интенсивность свободнорадикального окисления приводила к снижению активности ГП, действие которой направлено на обезвреживание гидроперекисей липидов. При снижении потребности в GSH уменьшалась активность ГР.

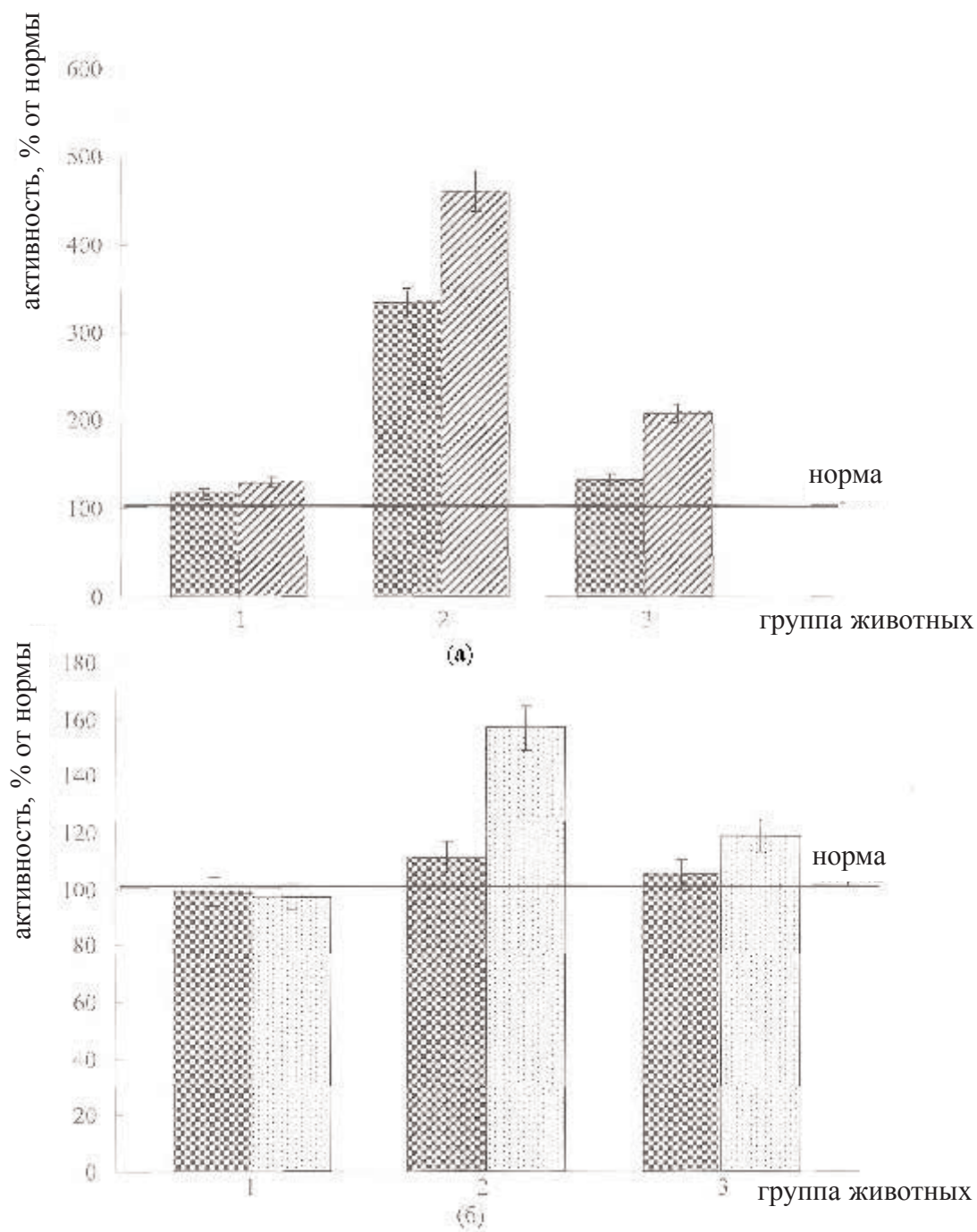





Рисунок 1.

Изменение активности глутатионпероксидазы в печени крыс (а) и в сыворотке крови (б) после введения тиоктовой кислоты intactным животным (1), у крыс с экспериментальным токсическим гепатитом (2) и после введения тиоктовой кислоты животным с токсическим гепатитом (3).

Примечание:

-  - удельная активность глутатионпероксидазы;
-  - активность глутатионпероксидазы, представленная в виде ФЕ на грамм сырой массы;
-  - активность глутатионпероксидазы, выраженная в виде ФЕ на мл.

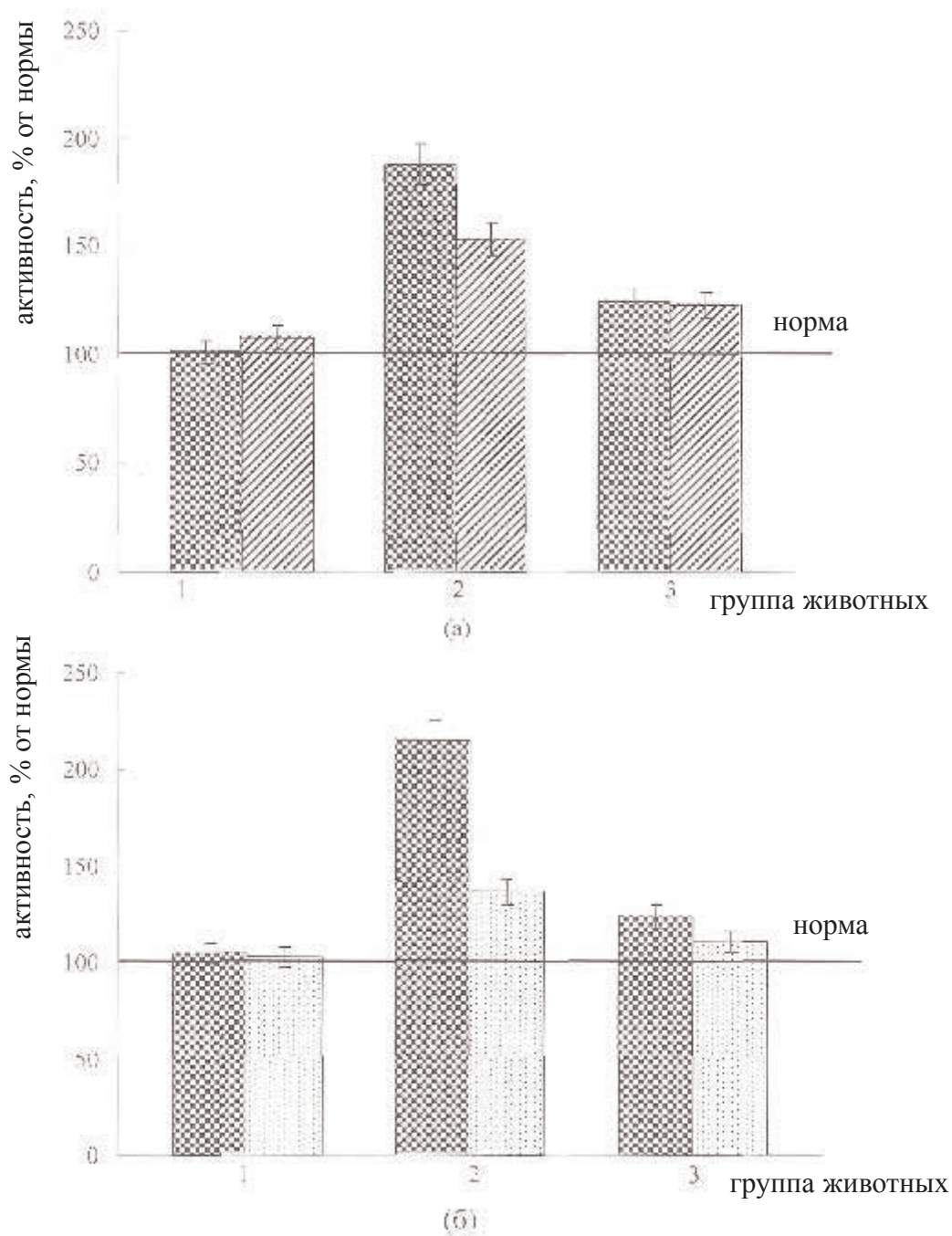





Рисунок 2.

Изменение активности глутатионредуктазы в печени крыс (а) и в сыворотке крови (б) после введения тиоктовой кислоты intactным животным (1), у крыс с экспериментальным токсическим гепатитом (2) и после введения тиоктовой кислоты животным с токсическим гепатитом (3).

Примечание:

-  - удельная активность глутатионредуктазы;
-  - активность глутатионредуктазы, представленная в виде ФЕ на грамм сырой массы;
-  - активность глутатионредуктазы, выраженная в виде ФЕ на мл.

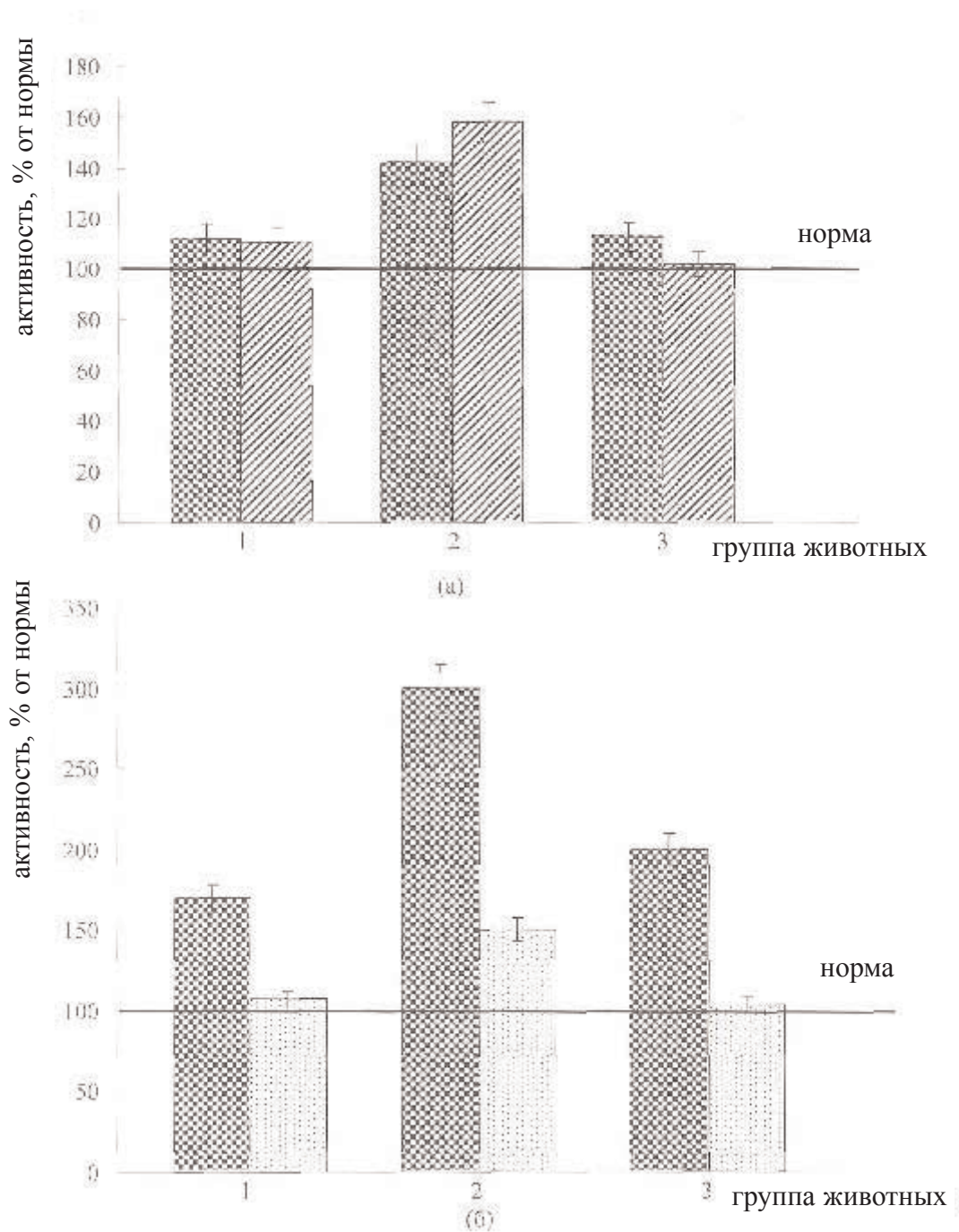


Рисунок 3.

Изменение активности NADP-зависимой изоцитратдегидрогеназы в печени крыс (а) и в сыворотке крови (б) после введения тиоктовой кислоты intactным животным (1), у крыс с экспериментальным токсическим гепатитом (2) и после введения тиоктовой кислоты животным с токсическим гепатитом (3).

Примечание:

- - удельная активность NADP-изоцитратдегидрогеназы;
- ▨ - активность NADP-изоцитратдегидрогеназы, представленная в виде ФЕ на грамм сырой массы;
- ▤ - активность NADP-изоцитратдегидрогеназы, выраженная в виде ФЕ на мл.

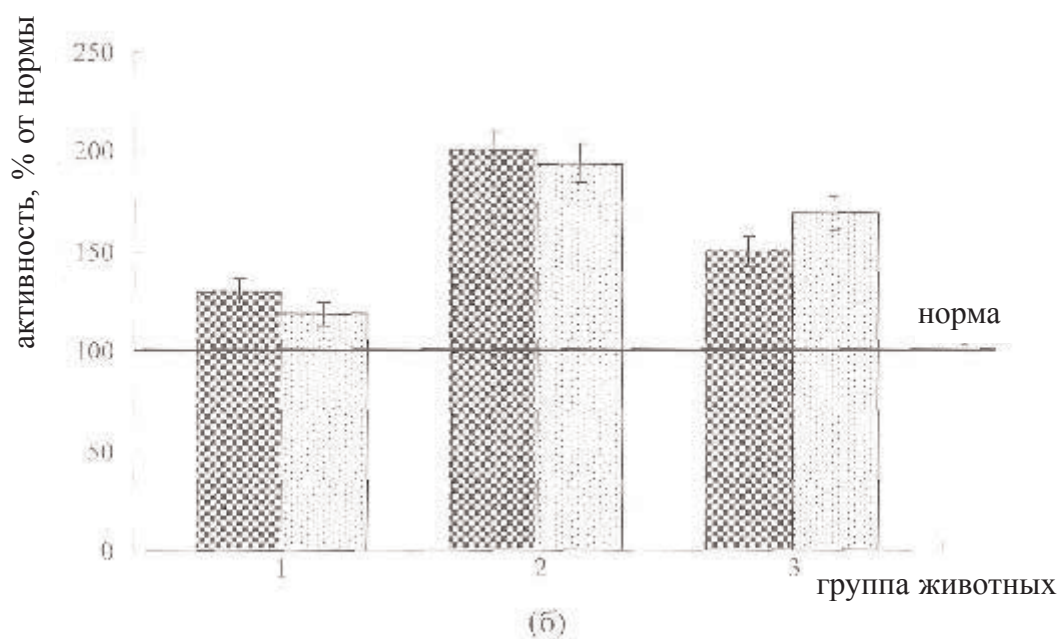
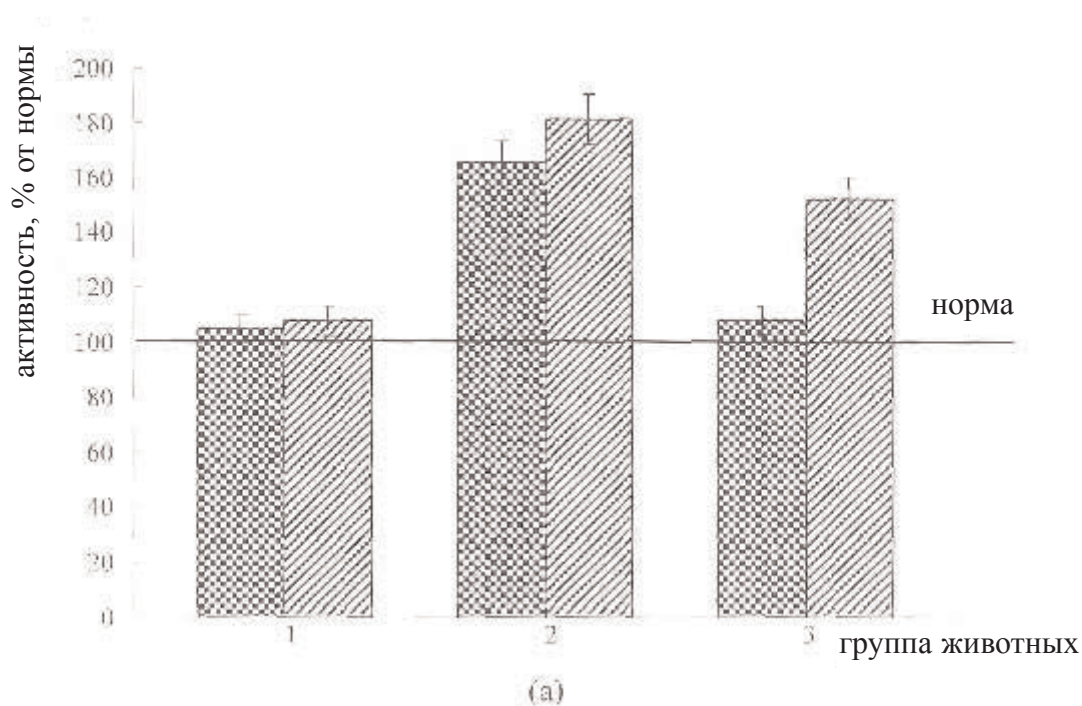


Рисунок 4.

Изменение активности глюкозо-6-фосфатдегидрогеназы в печени крыс (а) и в сыворотке крови (б) после введения тиоктовой кислоты intactным животным (1), у крыс с экспериментальным токсическим гепатитом (2) и после введения тиоктовой кислоты животным с токсическим гепатитом (3).

Примечание:

- - удельная активность глюкозо-6-фосфатдегидрогеназы;
- ▨ - активность глюкозо-6-фосфатдегидрогеназы, представленная в виде ФЕ на грамм сырой массы;
- ▤ - активность глюкозо-6-фосфатдегидрогеназы, выраженная в виде ФЕ на мл.

Показано, что на четвертый день развития ЭТГ активность NADP-ИДГ и Г6ФДГ возрастала как в сыворотке крови, так и в гомогенате печени крыс по сравнению с нормой [8, 14]. Очевидно, увеличение активности данных ферментов связано с их участием в поддержании определенного уровня NADPH, необходимого для более интенсивного функционирования глутатионредуктазной/глутатионпероксидазной антиоксидантной системы в условиях окислительного стресса. Однако, при введении ТК животным, подвергнутым ЭТГ, происходило снижение активности данных ферментов в сторону нормы. Было показано, что под влиянием ТК на фоне развития ЭТГ удельная активность NADP-ИДГ и Г6ФДГ в печени уменьшалась в 1,3 (рис. 3а) и 1,5 (рис. 4а) раза, а в сыворотке крови в 1,5 (рис. 3б) и 1,3 (рис. 4б) раза, соответственно, по сравнению с таковыми у животных с ЭТГ. Таким образом, проведенные исследования показали, что при токсическом поражении печени у крыс ТК способна замедлять процесс свободнорадикального окисления, что приводит к снижению степени активации глутатионредуктазной/глутатионпероксидазной антиоксидантной системы. В связи с этим, по-видимому, снижается необходимость поставки NADPH для работы данной антиоксидантной системы, а, следовательно, уменьшается активность NADP-ИДГ и Г6ФДГ.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ И ВЫВОДЫ. Полученные результаты свидетельствуют о гепатопротекторных свойствах ТК, которая является антиоксидантом и уменьшает нагрузку на другие звенья антиоксидантной системы. Показано, что ТК может оказывать позитивное действие на функционирование глутатионовой системы, нормализуя ее работу при ЭТГ, сопровождающемся оксидативным стрессом. Кроме того, наблюдается снижение активности NADP-ИДГ и Г6ФДГ под действием ТК на фоне развития ЭТГ, что, очевидно, связано со снижением необходимости в поставке NADPH для глутатионредуктазной/глутатионпероксидажной антиоксидантной системы.

Работа поддержана грантом Министерства образования и науки РФ по программе “Развития научного потенциала высшей школы” РНП. 2.1.1.4429

ЛИТЕРАТУРА

1. *Ribero J., Nordlinger B., Ballet F.* (1992) *Hepatology* **15**, 12-18.
2. *Liang J.F., Akaike T.* (2000) *Chem. Biol. Interact.* **124**(1), 53-60.
3. *Бустаманте Дж., Ладж Дж., Маркоччи Л.* (2001) *Международный медицинский журнал*, **2**, 133-141.
4. *Trent W. Nichols, Jr. M.D.* (1997) *Alternative Medicine Review*, **2**(3), 177-183.
5. *Kishi Y., Schmelzer T.P., Yao T.K.* (1999) *Diabetes*, **48**(10), 2045-2051.
6. *Медведева Л.В., Попова Т.Н., Артюхов В.Г., Матасова Л.В., Пинеиру де Карвалью М.А.А.* (2002) *Биохимия*, **67**(6), 838-849.
7. *Федорова Н.Ю.* (1999) Состояние системы глутатионпероксидазы-глутатионредуктазы в стимулированном к регенерации органе и ее роль в клеточной пролиферации. Дисс. Канд. Биол. Наук, Воронеж.
8. *Пашков А.Н., Попов С.С., Семенихина А.В., Рахманова Т.И.* (2005) *Бюлл. экспер. биол. мед.*, **139**(5), 520-524.
9. *Сидорова В.Ф., Рябина З.А., Лейкина Е.М.* (1966) *Регенерация печени у млекопитающих*, Медицина, М.
10. *Lowry O.H., Rosebrough N.J., Farr A.L., Randal R.J.* (1951) *J. Biol. Chem.*, **193**, 265-275.
11. *Бузлама В.С.* (1997) *Методическое пособие по изучению процессов перекисного окисления липидов и систем антиоксидантной защиты организма у животных*, Воронеж.

12. Попов С.С., Шульгин К.К. (2005) Материалы I (65) Всероссийской Бурденковской научной конференции, Воронеж, с. 398-400.
13. Ивашкина Н.Ю., Шульпекова Ю.О., Ивашкин В.Т. (2000) Русский медицинский журнал, **8**(4), 15-19.
14. Пашков А.Н., Попов С.С., Семенихина А.В. (2004) Материалы 3й междисциплинарной конференции с международным участием (НБИТТ-21), Петрозаводск, с. 36.

Поступила: 26. 12. 2005.

THIOCTIC ACID ACTION ON GLUTATHIONE-DEPENDENT ANTIOXIDANT SYSTEM FUNCTIONING AT TOXIC HEPATITIS OF RATS

A.V. Makeeva, T.N. Popova, L.V. Matasova

Biology and Soil Science Faculty, Voronezh State University, Universitetskaya pl., 1, Voronezh,
394693 Russia; tel.: (0732) 20-82-78; fax: (0732) 20-87-55; e-mail: voloskova@bio.vsu.ru

The effect of thioctic acid on the glutathione dependent antioxidant system and activities of enzymes, generating NADPH of rats has been investigated in rats under conditions of toxic hepatitis. Injections of thioctic acid to animals with toxic hepatitis caused the decrease of glutathione reductase and peroxidase activities to the normal level. Reduced glutathione content also tended to the control level. Administration of thioctic acid to rats with toxic hepatitis also caused the decrease of NADP-dependent isocitrate dehydrogenase and glucose-6-phosphate dehydrogenase which might be associated with decreasing need of NADPH supply for glutathione dependent antioxidant system. Thus, obtained results have shown that thioctic acid may regulate manifestations of oxidative stress and the state of the glutathione antioxidant system.

Key words: thioctic acid, toxic hepatitis, antioxidants.