

УДК 577.15:577.334:616.36-002

©Коллектив авторов

## ВЛИЯНИЕ ЦИТРАТА НА ОКСИДАТИВНЫЙ СТАТУС ТКАНЕЙ КРЫС ПРИ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОМ ТОКСИЧЕСКОМ ГЕПАТИТЕ

*О.А. Сафонова\*, Т.Н. Попова, Л. Сауди*

Воронежский государственный университет, биолого-почвенный факультет,  
кафедра медицинской биохимии и микробиологии, Университетская пл., 1,  
394006 Воронеж; тел.: (4732) 20-82-78; факс: (4732) 20-87-55;  
эл. почта: solga@bio.vsu.ru

Показано, что при введении цитрата крысам с экспериментальным токсическим гепатитом происходит снижение параметров биофлюоресценции и содержания диеновых конъюгатов, возрастающих в условиях  $\text{CCl}_4$ -индуцированного поражения печени. При этом активность аконитазы, снижающаяся при данной патологии, увеличивается. Активность супероксиддисмутазы и каталазы, увеличивающихся при экспериментальном токсическом гепатите, при введении цитрата также изменяются в сторону контрольных значений.

**Ключевые слова:** крысы, токсический гепатит, цитрат, свободнорадикальные процессы, супероксиддисмутаза, каталаза.

**ВВЕДЕНИЕ.** Согласно имеющимся в настоящее время данным, свободнорадикальное окисление (СРО), являющееся необходимым этапом различных процессов жизнедеятельности, при чрезмерной интенсификации служит одним из ведущих механизмов клеточной патологии, включая аутоиммунные болезни, хронические воспаления, сердечно-сосудистые, нейродегенеративные заболевания, болезни печени и другие [1-4]. Основную роль в интенсификации СРО играют усиление генерации активных форм кислорода (АФК) и повышение содержания прооксидантов - ионов  $\text{Fe}^{2+}$ , высвобождающихся из вне- и внутриклеточных депо [5]. В связи с распространённостью и тяжестью свободнорадикальных патологий значительный интерес представляет исследование эндогенных факторов, обладающих антиоксидантным потенциалом и способных оказывать протекторный эффект при развитии заболеваний подобного рода. Цитрат – один из важнейших метаболитов в организме млекопитающих, интермедиат цикла трикарбоновых кислот, регулятор ключевых ферментов гликолиза, биосинтеза жирных кислот, - способен проявлять антиоксидантные свойства благодаря наличию диссоциирующих карбоксильных групп, что позволяет ему хелатировать ионы  $\text{Fe}^{2+}$  и  $\text{Ca}^{2+}$ . Показано, что при взаимодействии комплекса “цитрат- $\text{Fe}^{2+}$ ” с  $\text{O}_2$  происходит автоокисление  $\text{Fe}^{2+}$  в  $\text{Fe}^{3+}$ . По-видимому, эффект связывания  $\text{Fe}^{2+}$  цитратом мог бы способствовать снижению в клетке уровня наиболее реакционноспособного  $\text{OH}^\bullet$ -радикала, для образования которого в реакции Фентона необходимо  $\text{Fe}^{2+}$ . Кроме того, сами ионы  $\text{Fe}^{2+}$  участвуют в разветвлении цепей пероксидного окисления липидов (ПОЛ), и, следовательно, способствуют распространению данных процессов и вовлечению в окисление все новых молекул липидов биомембран [6]. Ионы  $\text{Ca}^{2+}$  также играют немаловажную роль в активации свободнорадикальных процессов [7]. Следует отметить, что в некоторых работах было выявлено нарушение метаболизма цитрата при патологических состояниях [8, 9]. Показано, что это соединение защищает клетки почечного эпителия от повреждения, вызванного оксалатом и кристаллами оксалата кальция, путем снижения

\* - адресат для переписки

образования АФК [10]. Одним из основных ферментов метаболизма цитрата, отвечающих за его накопление, является аконитатгидратаза (АГ; КФ 4.2.1.3). В некоторых работах отмечается, что АГ, при разрушении Fe-S-кластера которой супероксидным анион-радикалом наблюдается подавление активности данного фермента, можно рассматривать в качестве чувствительной и критической мишени действия АФК в условиях окислительного стресса [11, 12].

В связи с вышесказанным целью настоящей работы было исследование влияния цитрата на интенсивность СРО и активность аконитатгидратазы, супероксиддисмутазы (СОД) и каталазы в тканях крыс при экспериментальном токсическом гепатите.

**МЕТОДИКА.** В качестве объекта исследования использовали самцов белых лабораторных крыс массой 150-200 г. Для моделирования ЭТГ использовали четыреххлористый углерод, являющийся органоспецифичным токсином, обладающим гепатотропным действием.  $CCl_4$  вводили животным однократно, перорально, после суточной пищевой депривации в дозе 0,064 мл на 100 г веса животного в виде раствора в вазелиновом масле [13]. Забой животных производили на 4-е сутки, когда наблюдался максимальный цитолиз гепатоцитов. Цитрат натрия вводили внутривентрально в дозе 50 мг/кг в 0,9% растворе NaCl, ежедневно в течение 3-х дней после индуцирования ЭТГ.

Для исследований использовали гомогенат печени и сыворотку крови крыс. Для получения сыворотки использовали венозную кровь. Гомогенат печени 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 5000 г в течение 10 мин.

Оценку степени развития токсического повреждения печени и цитолиза гепатоцитов проводили путем определения активности аланинаминотрансферазы (АлАТ) в сыворотке крови. Активность АлАТ определяли методом Райтмана-Френкеля.

Оценку интенсивности процессов СРО осуществляли методом  $Fe^{2+}$ -индуцированной биохемилюминесценции (БХЛ) [14]. Регистрировали следующие показатели: светосумму медленной вспышки (S), интенсивность максимальной вспышки ( $I_{max}$ ), тангенс угла падения кинетической кривой ( $tg\alpha_2$ ).

Определение содержания диеновых конъюгатов (ДК) осуществляли спектрофотометрически в экстрагированной гептановой фазе липидов при длине волны 233 нм [15].

Активность ферментов определяли на СФ-56 и выражали в ферментативных единицах (Е). Активность супероксиддисмутазы (СОД; КФ 1.15.1.1.) определяли по ингибированию скорости восстановления нитросинего тетразолия (НСТ) в неэнзиматической системе феназинметасульфата и NADH при 540 нм [16]. За единицу активности СОД принимали количество фермента, необходимого для 50%-ого ингибирования восстановления НСТ. Активность АГ определяли при 235 нм в среде, содержащей 50 мМ трис-HCl-буфер (pH 7,8), 4 мМ цитрат. Активность каталазы (КФ 1.11.1.6.) определяли при 410 нм по реакции  $H_2O_2$  с молибдатом аммония [17]. За единицу активности (Ед) АГ и каталазы принимали количество фермента, необходимого для превращения 1 мкмоль субстрата в 1 мин при 25°C.

Для определения общего белка использовали метод Лоури [18]. Опыты проводили как минимум в 6-кратной биологической и 2-кратной аналитической повторностях. Полученные данные обрабатывали с использованием статистических критериев [19]. Обсуждаются статистически достоверные различия при  $p < 0,05$ .

**РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ.** Согласно полученным результатам, введение животным цитрата на фоне развивающейся патологии, сопровождающейся повышением активности АлАТ в сыворотке крови в 7,7 раз, способствовало снижению активности данного фермента в 1,6 раза по сравнению с данным показателем в сыворотке крови животных с ЭТГ. Полученные данные свидетельствуют о меньшей степени поражения паренхимы печени при введении

в организм животных с индуцированным токсическим гепатитом цитрата, т.е. о наличии у данного вещества гепатопротекторных свойств.

Согласно проведенным ранее исследованиям, параметры БХЛ и содержание ДК в печени и сыворотке крови крыс возрастают при экспериментальном токсическом гепатите по сравнению со значениями в норме [20-22].

При введении цитрата животным с патологией происходит снижение параметров БХЛ, отражающих интенсивность свободнорадикальных процессов, в печени и сыворотке крови ( $S$  - в 1,9 и 2 раза,  $I_{\max}$  - в 2 и 2,5 раза соответственно по сравнению с данными, полученными при исследовании животных с ЭТГ), что свидетельствует о выраженном антиоксидантном действии цитрата (рис. 1). Следует отметить, что значения данных параметров, полученные при исследовании сыворотки крови животных, которым вводили цитрат на фоне ЭТГ, достоверно не отличались от нормы.

При определении  $\text{tg}\alpha_2$  кривой хемилюминесценции, отражающего общую активность антиоксидантной системы, в тканях крыс с патологией также было выявлено повышение по сравнению с контрольными значениями, что свидетельствует об активации защитных механизмов, направленных на торможение свободнорадикальных процессов [20-22]. При введении цитрата животным с ЭТГ наблюдается изменение значений данного параметра в ткани печени и сыворотке крови в сторону нормы: выявлено его снижение в 1,6 и 2,3 раза соответственно по сравнению с уровнем при патологии (рис. 1). Это может быть объяснено тем, что цитрат тормозит процессы СРО и, как следствие, снижается степень мобилизации систем, отвечающих за регуляцию уровня свободнорадикальных реакций.

Для оценки интенсивности свободнорадикальных процессов применяли также метод определения содержания первичных продуктов ПОЛ - диеновых конъюгатов. Согласно полученным результатам, уровень ДК в ткани печени и сыворотке крови, возрастающий при введении четыреххлористого углерода животным, снижается при введении цитрата в 1,3 раза по сравнению с животными с ЭТГ (рис. 1).

Таким образом, из результатов исследования параметров БХЛ и содержания диеновых конъюгатов в печени и сыворотки крови крыс экспериментальных групп следует, что при введении животным цитрата на фоне развития индуцированного введением  $\text{CCl}_4$  гепатита происходит снижение интенсивности СРО по сравнению с данными показателями при патологии. Антиоксидантный эффект цитрата может быть обусловлен хелатированием ионов  $\text{Fe}^{2+}$  и  $\text{Ca}^{2+}$ . Проявление цитратом гепатопротекторного действия при развитии токсического гепатита, сопряженного с развитием окислительного стресса, может быть обусловлено также активированием биосинтеза жирных кислот, поскольку в условиях пероксидного повреждения мембран для их восстановления возникает необходимость в поставке этих соединений, служащих строительными блоками липидов.

Согласно полученным ранее результатам, активность АГ в гепатоцитах и сыворотке крови крыс в условиях ЭТГ снижается [21], что может являться следствием разрушения железо-серных кластеров молекулы фермента под действием свободнорадикальных форм кислорода, концентрация которых при этом возрастает. Введение цитрата животным с патологией приводит к повышению активности аконитазы по сравнению с крысами с ЭТГ, не получавшими цитрат. Так, активность АГ, выраженная в Ед/г сырой массы печени, повышается в 1,7 раза, а рассчитанная в виде Ед/мл сыворотки – в 1,3 раза. При этом удельная активность в гомогенате печени возрастает в 2,9 раза, в сыворотке крови - в 2,1 раза, то есть было выявлено изменение активности фермента в сторону нормы (рис. 2). Полученные данные могут быть объяснены как с точки зрения проявления цитратом антиоксидантных свойств, так и тем, что цитрат, являющийся субстратом аконитазной реакции, способен активировать фермент.

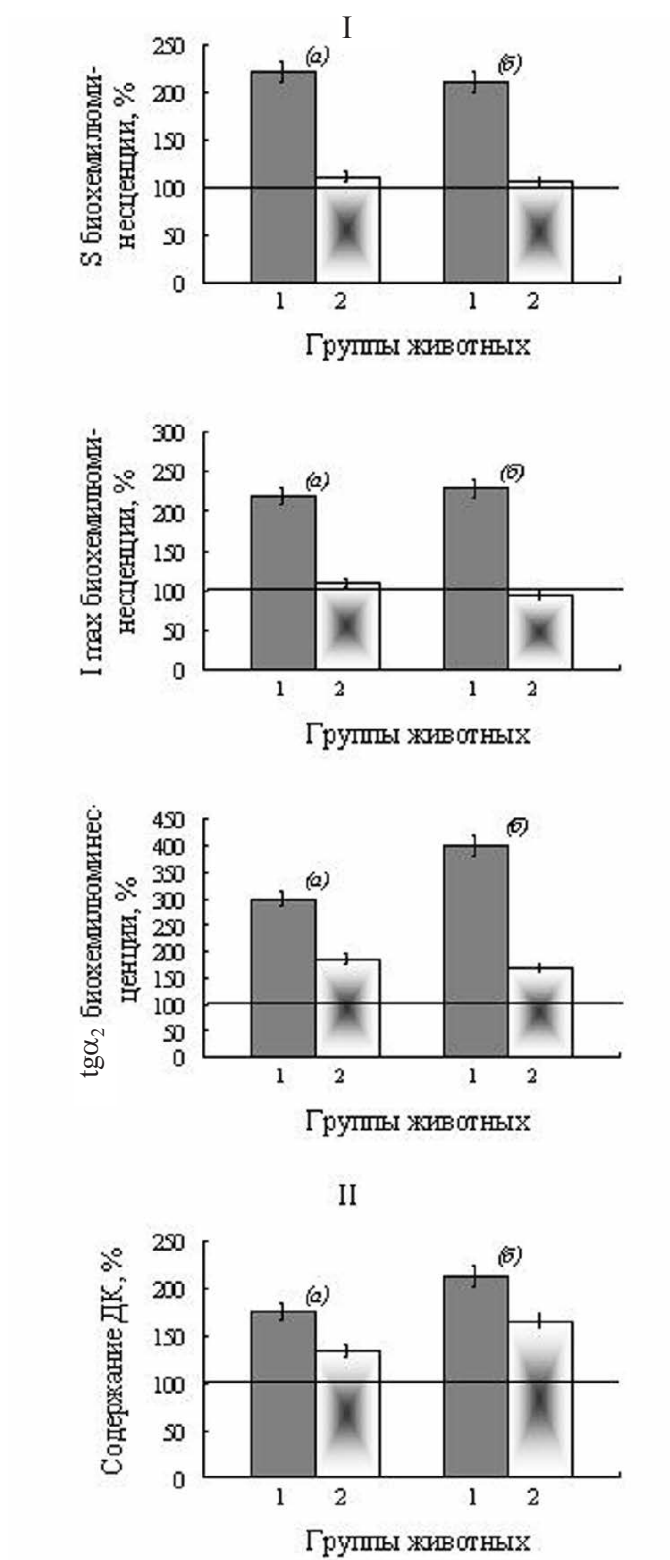


Рисунок 1.

Параметры биохемилюминесценции (I) и содержание диеновых конъюгатов (II) в печени (a) и сыворотке крови (б) крыс при экспериментальном токсическом гепатите (1) и действии цитрата на фоне развития патологии (2); за 100% принимали значение параметра в норме (для печени:

$S=23,71 \pm 1,11 \text{ mV} \cdot \text{с}$ ,  $I_{\text{max}}=4,30 \pm 0,10 \text{ mV}$ ,  $\text{tg}\alpha_2=1,51 \pm 0,07$ ,  $[\text{ДК}]=8,97 \pm 0,41 \text{ мкмоль/г ткани}$ ;  
 для сыворотки крови:  $S=31,71 \pm 1,51 \text{ mV} \cdot \text{с}$ ,  $I_{\text{max}}=5,99 \pm 0,23 \text{ mV}$ ,  $\text{tg}\alpha_2=0,99 \pm 0,04$ ,  
 $[\text{ДК}]=7,50 \pm 0,34 \text{ мкмоль/мл}$ ).

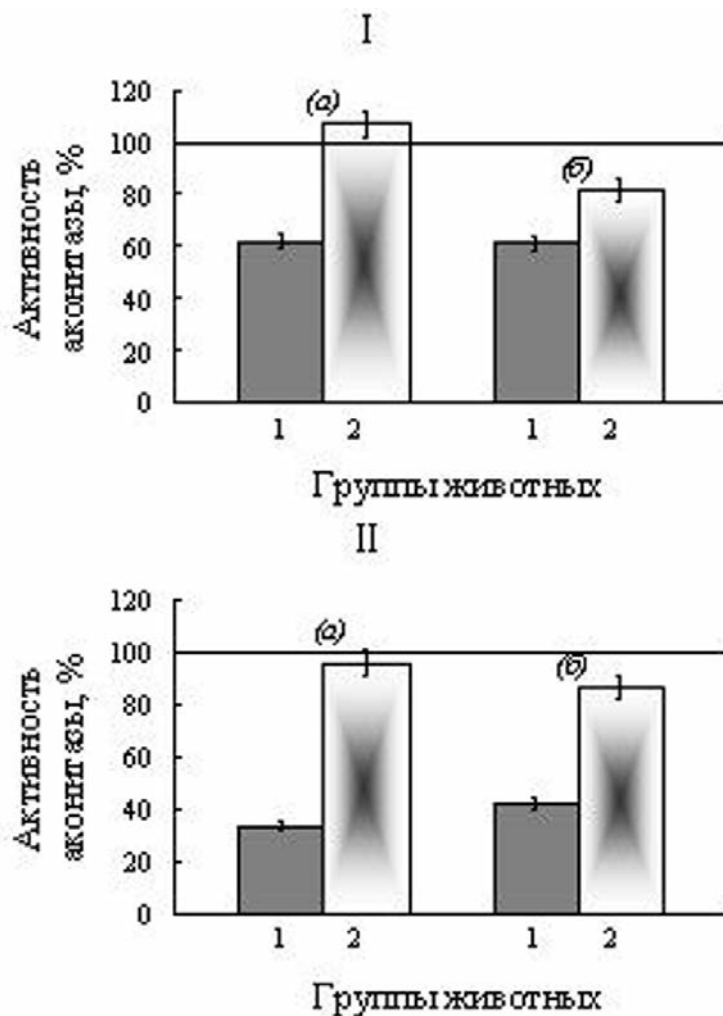


Рисунок 2.

Активность аконитазы в печени (а) и сыворотке крови (б) крыс при экспериментальном токсическом гепатите (1) и действии цитрата на фоне развития патологии (2): I – активность фермента, выраженная в процентах от Ед на грамм сырой массы печени и Ед на мл сыворотки крови; II – активность фермента, выраженная в процентах от Ед на мг белка. За 100% принимали значение параметра в норме (для печени: I –  $1,89 \pm 0,09$  Ед/г сырой массы, II –  $0,249 \pm 0,011$  Ед/мг белка; для сыворотки крови: I –  $1,12 \pm 0,05$  Ед/мл, II –  $0,060 \pm 0,003$  Ед/мг белка).

При введении животным гепатотоксина  $\text{CCl}_4$  активность СОД и каталазы, обеспечивающих детоксикацию первичных АФК, повышается как в печени, так и в сыворотке крови. Очевидно, что обнаруженное увеличение активности данных антиоксидантных ферментов на фоне развития патологии печени носит адаптивно–компенсаторный характер в ответ на чрезмерное образование АФК.

В условиях ЭТГ происходит увеличение удельной активности СОД в 1,8 и 2 раза в печени и сыворотке крови экспериментальных животных по сравнению с контрольными значениями. При действии цитрата наблюдается снижение удельной активности СОД в ткани печени и сыворотке крови в 1,5 раза относительно значений при патологии (рис. 3).

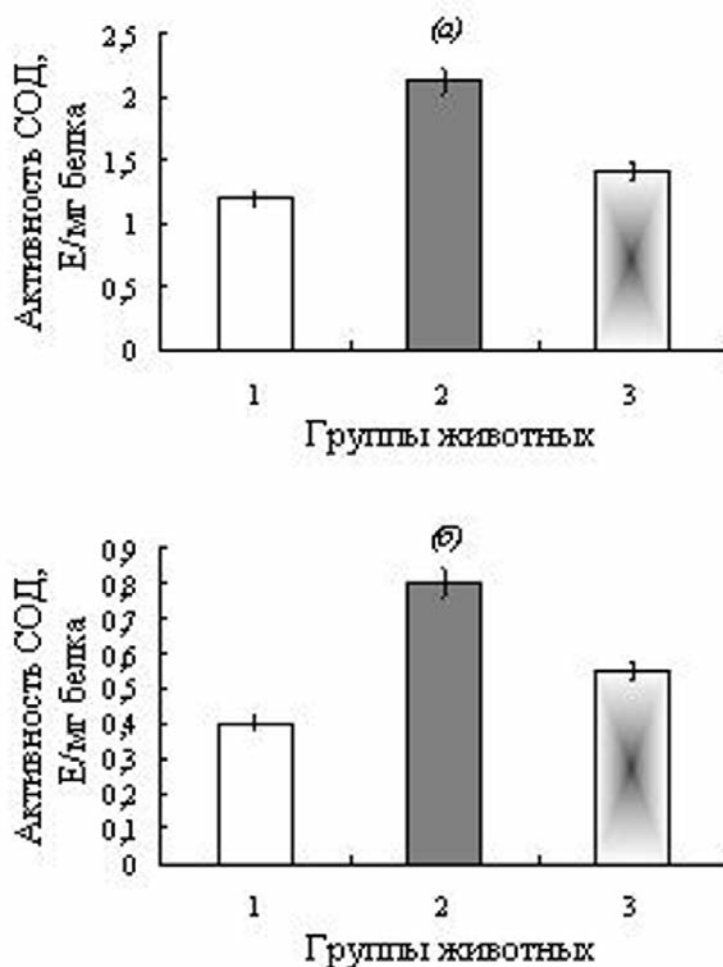


Рисунок 3.

Активность супероксиддисмутазы в печени (а) и сыворотке крови (б) крыс в норме (1), при экспериментальном токсическом гепатите (2) и действии цитрата на фоне развития патологии (3).

Ранее было выявлено возрастание активности каталазы в тканях крыс при экспериментальном токсическом гепатите по сравнению с нормой [20]. Введение цитрата животным на фоне развивающегося повреждения печени, вызванного  $\text{CCl}_4$ , приводит к снижению активности каталазы в гепатоцитах, выраженной как в Ед/г сырой массы, так и в виде удельной активности, в 1,3 раза по сравнению с активностью фермента у животных с ЭТГ, не получавших цитрат. Активность каталазы в сыворотке крови также изменяется при введении цитрата в условиях развития токсического гепатита. Активность данного фермента, рассчитанная в Ед на мл сыворотки, снижается в 1,7 раза, удельная активность - в 1,5 раза по сравнению с активностью фермента у животных с патологией печени (рис. 4).



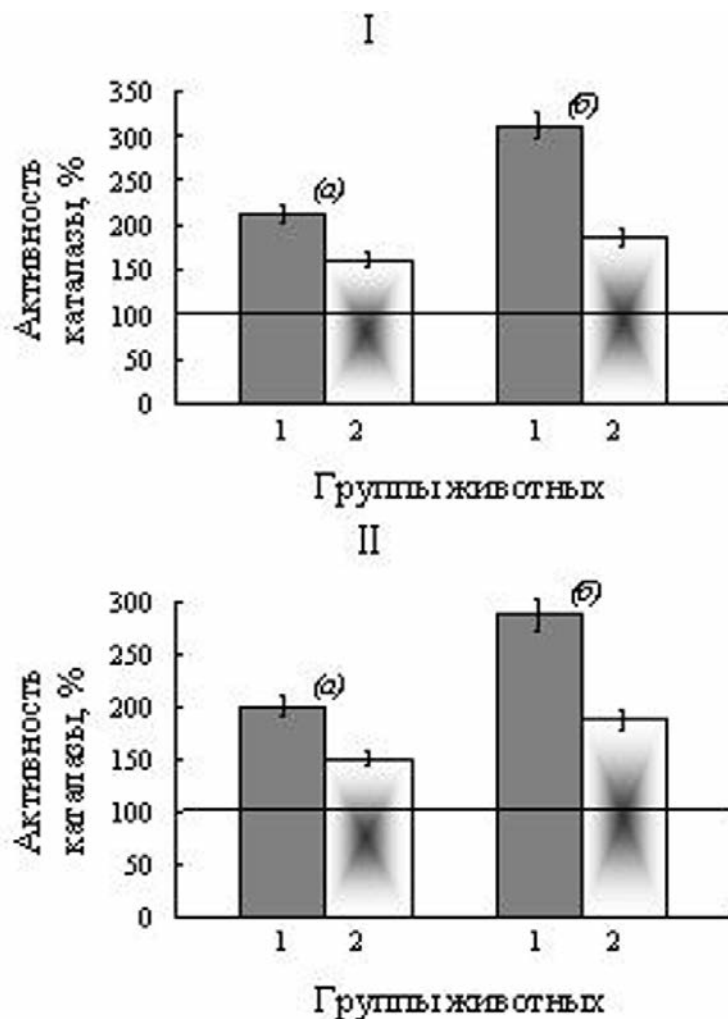


Рисунок 4.

Активность каталазы в печени (а) и сыворотке крови (б) крыс при экспериментальном токсическом гепатите (1) и действии цитрата на фоне развития патологии (2): I – активность фермента, выраженная в процентах от Ед на грамм сырой массы печени и Ед на мл сыворотки крови; II – активность фермента, выраженная в процентах от Ед на мг белка. За 100% принимали значение параметра в норме (для печени: I –  $0,64 \pm 0,029$  Ед/г сырой массы, II –  $0,040 \pm 0,0018$  Ед/мг белка; для сыворотки крови: I –  $0,09 \pm 0,004$  Ед/мл, II –  $0,008 \pm 0,0004$  Ед/мг белка).

**ЗАКЛЮЧЕНИЕ.** Таким образом, полученные результаты позволяют сделать вывод о том, что цитрат, проявляя свои антиоксидантные свойства, способствует торможению развития СРО при ЭТГ и снижает тем самым нагрузку на антиоксидантные звенья организма. По-видимому, в основе антиоксидантного действия цитрата лежит связывание участвующих в развитии свободнорадикальных процессов ионов  $Fe^{2+}$  и  $Ca^{2+}$  карбоксильными группами данного соединения.

Работа поддержана проектом по программе Министерства образования и науки РФ “Развитие научного потенциала высшей школы” РНП 2.1.1.4429 и грантом РФФИ р\_офи 08-04-99018.

ЛИТЕРАТУРА

1. *Осипов А.Н., Азизова О.А., Владимиров Ю.А.* (1990) Успехи биол. химии, **31**, 180-208.
2. *Владимиров Ю.А.* (1972) Изв. АН СССР, **4**, 489-501.
3. *Петрович Ю.А., Гуткин Д.В.* (1986) Пат. физиол., №5, 85-92.
4. *Ланкин В.З., Тихазе А.К., Беленков Ю.Н.* (2000) Кардиология, **7**, 48-57.
5. *Скулачев В.П.* (1999) Биохимия, **64**, 1679-1688.
6. *Кухтина Е.Н., Глущенко Н.Н.* (1996) Биохимия, **61**, 993-997.
7. *Гордеева А.В., Звягильская Р.А., Лабас Ю.А.* (2003) Биохимия, **68**, 1318-1322.
8. *Freminet A.* (1981) Comp. Biochem. Physiol., **70**, 427-430.
9. *Rafalowska U., Erecinska M., Chance B.* (1975) J. Neurochem., **25**, 497-501.
10. *Byer K., Khan S.R.* (2005) J. Urol., **173**, 640-646.
11. *Gardner P.R., Nguyen D.M., White C.W.* (1994) Proc. Nat. Acad. Sci. USA, **91**, 12248-12252.
12. *Murakami K., Yoshino M.* (1997) Biochem. Mol. Biol. Int., **41**, 481-486.
13. *Сидорова В.Ф., Рябинина З.А., Лейкина Е.М.* (1966) Регенерация печени у млекопитающих, Медицина, М.
14. *Кузьменко А.И., Морозова Р.П., Николенко И.А., Корниец Г.В., Холодова Ю.А.* (1997) Биохимия, **62**, 712-715.
15. *Стальная И.Д.* (1977) в: Современные методы в биохимии (под ред. В.Н. Ореховича) Медицина, М., с. 63-64.
16. *Матюшин Б.Н., Логинов А.С., Ткачев В.Д.* (1991) Лаб. дело, №7, 16-19.
17. *Королук М.А., Иванова Л.И., Майорова И.Г., Токарев В.Е.* (1988) Лаб. дело, №1, 16-19.
18. *Lowry O.H., Rosebrough N.J., Farr A.L., Randall R.J.* (1951) J. Biol. Chem. **193**, 265-275.
19. *Ллойд Э., Ледерман У.* (1990) Справочник по прикладной статистике, Финансы и статистика, М.
20. *Попов С.С., Пашков А.Н., Попова Т.Н., Семенихина А.В., Рахманова Т.И.* (2007) Экспер. клин. фармакол., **70**(1), 48-51.
21. *Пашков А.Н., Попов С.С., Семенихина А.В., Матасова Л.В., Попова Т.Н.* (2005) Пробл. эндокринол., **51**(6), 41-43.
22. *Пашков А.Н., Попов С.С., Семенихина А.В., Рахманова Т.И.* (2006) Ж. теор. практич. мед., **4**(1), 93-96.

Поступила: 06. 03. 2009.



**CITRATE INFLUENCE ON OXIDATIVE STATUS OF RATS TISSUES UNDER  
EXPERIMENTAL TOXIC HEPATITIS**

*O.A. Safonova, T.N. Popova, L. Saidi*

Voronezh State University, Biology and Soil Science Faculty, Department of Medical Biochemistry and Microbiology, Universitetskaya sq.,1, Voronezh, 394006 Russia; tel.: 8(4732) 20-82-78; fax: 8(4732) 20-87-55; e-mail: solga@bio.vsu.ru

The effect of citrate free-radical oxidation intensity and aconitate hydratase, superoxide dismutase and catalase activities in liver and blood serum of rats with experimental toxic hepatitis has been investigated. Citrate administration to rats with hepatitis decreased biochemiluminescence parameters and conjugated diene content in rats tissues, increased under conditions of CCl<sub>4</sub>-induced liver damage. At the same time aconitase activity, decreased at the pathology, increases. The superoxide dismutase and catalase activities increased in at experimental toxic hepatitis, tended towards control values after citrate administration.

**Key words:** rats, toxic hepatitis, citrate, free-radical processes, superoxide dismutase, catalase.