

... БІОХІМІЯ ...

УДК: 577.7: 577.152

**ВПЛИВ ГЕМОЛІЗУ НА ГЛУТАТІОН-S-ТРАНСФЕРАЗНУ
АКТИВНІСТЬ В ПЕЧІНЦІ ТА НИРКАХ ЩУРІВ
Т.В.Бараннік***Харківський національний університет імені В.Н.Каразіна (Харків, Україна)*

Встановлені тканинспецифічні зміни глутатіон-S-трансферазної активності в печінці та нирках щурів при дії агентів, що спричиняють гемоліз та накопичення гем-вмісних сполук в крові. Фенілгідразин при введенні *in vivo* спричиняв зниження глутатіон-S-трансферазної активності, більш виражене в печінці, ніж в нирках. При гліцерольній моделі рабдоміолізу, навпроти, спостерігалось більш виражене та тривале зниження глутатіон-S-трансферазної активності в нирках, ніж в печінці. Хлорид ртуті спричиняв підвищення активності ферменту в обох органах, більш виражене в нирках. Обговорюється вплив вмісту загального гему в органі на динаміку активності глутатіон-S-трансферази. Робиться висновок, що активність глутатіон-S-трансферази змінюється більш виражено та тривало в органі, де метаболізуються та/або накопичуються продукти гемолізу та ксенобіотики, що вводяться.

Ключові слова: *глутатіон-S-трансфераза, печінка, нирки, хлорид ртуті, фенілгідразин, рабдоміоліз, гемоліз.*

Останнім часом встановлено, що потрапляння до організму ссавців ксенобіотиків різної природи, що спричиняють оксидативний стрес, супроводжується гемолізом еритроцитів та накопиченням гем-вмісних сполук в плазмі крові. Відомо, що значна роль в детоксикації та виведенні з організму ксенобіотиків та продуктів вільнорадикального окислення належить сімейству глутатіон-S-трансфераз, що каталізують реакції кон'югації глутатіону з електрофілами різної хімічної будови: лактонів, епоксидів, хінонів, естерів, ароматичних та ненасичених сполук (Wang and Ballatori, 1998). Раніше було показано, що глутатіон-S-трансфераза (КФ 2.5.1.18) взаємодіє з білірубіном та порфіринами, що може приводити до інгібування ферменту (Simons and Jagt, 1980), але вплив продуктів гемолізу на активність глутатіон-S-трансферазної активності в літературі не обговорюється. Останнім часом стало відомо, що багаточисельні ізоформи глутатіон-S-трансферази (Г-S-T) є тканинспецифічними з перевагою α -класу в печінці та нирках та π -класу в позапечінкових тканинах (Hoensch et al., 2002). Також показано, що механізми розвитку оксидативного стресу мають тканинні особливості і, в значній мірі, опосередковані впливом продуктів гемолізу, що накопичуються в плазмі крові (Каліман та ін., 2003; Стрельченко и др., 2002), між тим активність Г-S-T в різних органах в умовах накопичення гему в крові залишається невивченою.

У зв'язку з вищенаведеним, метою цієї роботи було порівняльне дослідження глутатіон-S-трансферазної активності печінки та нирок щурів в перші години після введення *in vivo* фенілгідразину (модель гемолітичної анемії), при гліцерольній моделі рабдоміолізу, що використовується в дослідженнях ниркових порушень, а також при введенні хлориду ртуті, в тому числі за умов попереднього введення ліпофільного антиоксиданту α -токоферолу.

Методика

Досліди проведено на щурах-самцях лінії Wistar вагою 160-180 г. Контрольній групі тварин вводили відповідний об'єм фізіологічного розчину. Фенілгідразин вводили внутрішньочеревинно у дозі 7 мг на 100 г маси тіла. Гліцерол (50% водний розчин) вводили в дозі 0,75 мл на 100 г по 0,5 дози в кожний стежний м'яз. HgCl_2 , розчинений у 0,9% NaCl , вводили внутрішньочеревинно у дозі 0,7 мг на 100 г маси тіла. Ацетат α -токоферолу вводили внутрішньом'язово в дозі 5 мг на 100 г маси тіла за 2 год до введення солі ртуті. Декапітацію тварин проводили під ефірним наркозом через 2, 6 або 24 год після введення фенілгідразину чи гліцеролу, та через 1 год або 18 год після введення HgCl_2 .

Об'єктом досліджень були печінка та нирки, з яких отримували гомогенат після перфузії 0,9% розчином NaCl *in situ*. Гомогенати печінки та нирок готували на середовищі виділення: 0,1M KH_2PO_4 /0,2M $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$, pH 7,45.

Глутатіон-S-трансферазну активність визначали спектрофотометрично на двупроменевому спектрофотометрі "Spekord UV-VIS" в термостатованих кюветах (37 °C) при 340 нм за поглинанням комплексу глутатіону з 1-хлор-2,4-дінитробензолом відносно реакційної суміші. Реакційна суміш містила 0,1M K-фосфатний буфер, pH 7,4, 1mM ЕДТА, 1mM 1-хлор-2,4-дінитробензол, 5mM GSH і постійно перемішувалась за допомогою магнітної мішалки. Активність ферменту розраховували з використанням коефіцієнту екстинції $0,0096 \text{ nM}^{-1}\text{cm}^{-1}$ і виражали в нмоль 1-хлор-2,4-дінитробензолу /мг білку за 1хв (Мартинчик и Бондарев, 1986).

Вміст білку визначали за методом Лоурі в модифікації Міллера (Miller, 1959). Достовірність розбіжностей між групами оцінювали за допомогою критерію Стьюдента.

Результати та обговорення

Встановлено, що базальна глутатіон-S-трансферазна активність печінки вище, ніж нирок, що може бути пов'язане з ключовою роллю печінки в метаболізмі ксенобіотиків та особливостями ізоформного складу ферменту в печінці (Hoensch et al., 2002).

Таблиця 1.

Глутатіон-S-трансферазна активність печінки та нирок щурів при введенні фенілгідазину ($M \pm m$, $n=6$, * – $p < 0,05$ відносно контролю)

Орган	Контроль	Час після дії		
		2 год.	6 год.	24 год.
Печінка	615±30	499±25*	571±33	527±47
Нирки	432±34	394±28	422±35	321±30*

Як видно з табл. 1, фенілгідазин в обраній дозі викликав зниження активності Г-S-T в печінці через 2 год. (80% від контролю), а в нирках – тільки через 24 год (74% від контролю), що збігається з даними літератури про переважне надходження фенілгідазину до печінки в перші години після введення, де він метаболізується мікросомальними цитохромами (Ferrali et al., 1997). Як встановлено в паралельних експериментах, накопичення гем у крові не супроводжувалося підвищенням його вмісту в печінці та нирках в перші години після дії фенілгідазину (Каліман та ін., 2003). Зниження активності ферменту може бути пов'язане з появою модифікованих гемопротейнів та накопиченням продуктів вільнорадикального окислення внаслідок інгібування супероксиддисмутази, каталази та глюкозо-6-фосфатдегідрогенази, що встановлено через 6 та 24 год. після дії фенілгідазину в паралельних експериментах (Каліман та ін., 2003).

Виразене накопичення гем-вміщуючих сполук в крові вже в перші години після введення гліцеролу у 10 разів і більше у порівнянні з контролем (Каліман и др., 2003) також супроводжувалося зниженням Г-S-T в обох досліджених органах (табл. 2).

Таблиця 2.

Глутатіон-S-трансферазна активність печінки та нирок щурів при гліцерольній моделі рабдоміолізу ($M \pm m$, $n=6$, * – $p < 0,05$ відносно контролю)

Орган	Контроль	Час після дії		
		2 год.	6 год.	24 год.
Печінка	615±30	429±39*	577±35	554±57
Нирки	432±34	209±25*	283±31*	465±43

В печінці активність Г-S-T знижувалася через 2 год. до 70% від контролю. В нирках зниження активності ферменту було більш виражене та тривале: до 48% від контролю через 2 год. і до 65% від контролю через 6 год. Інгібування ферменту при гліцерольній моделі рабдоміолізу може явитися

наслідком зв'язування Г-S-T, що має ліпофільні ділянки, з молекулою гему та інших порфіринів (Ferrali et al., 1997) або білірубіном (Simons, Jagt, 1980), вміст яких різко підвищується в крові та тканинах (Стрельченко и др., 2002). Зниження активності Г-S-T при дії фенілгідразину та гліцеролу може приводити до значного накопичення ліпофільних продуктів вільнорадикального окислення та порушення клітинних структур, що можна розглядати як один з механізмів тканинспецифічної пошкоджуючої дії цих агентів.

Хлорид ртуті, навпроти, викликав підвищення активності Г-S-T через 2 год. після введення, більш виражене в нирках (160% від контролю), ніж в печінці (121% від контролю). Через добу активність ферменту в нирках залишалася підвищеною (125% від контролю), а в печінці поверталася до контрольного рівню (табл. 3).

Таблиця 3.

Глутатіон-S-трансферазна активність печінки та нирок щурів при введенні хлориду ртуті та сумісному введенню хлориду ртуті та токоферолу ($M \pm m$, $n=6$, * – $p < 0,05$ відносно контролю)

Орган	Контроль	Час після дії			
		1 год.		18 год.	
		HgCl ₂	HgCl ₂ +E	HgCl ₂	HgCl ₂ +E
Печінка	782±41	953±63*	961±58*	694±59	872±62
Нирки	411±25	662±84*	563±54*	518±24*	560±35*

Відомо, що іони ртуті *in vitro* неконкурентно інгібують Г-S-T (Dieckx, 1985), тому підвищення активності ферменту *in vivo* може бути опосередковано сигнальними механізмами (Ainbinder et al., 1997). Попереднє введення токоферолу, що за даними паралельних експериментів не попереджує розвиток гемолізу в перші години дії (Калиман и др., 2001), не впливає на динаміку активності Г-S-T (табл.3). За даними паралельних експериментів хлорид ртуті викликає накопичення гему в печінці вже в перші години дії, що не попереджується введенням токоферолу (Калиман и др., 2001). Беручи до уваги, що фенілгідразин та гліцерол спричинюють зниження активності Г-S-T, тим часом як хлорид ртуті, навпроти, спричинює підвищення активності ферменту в обох досліджених органах, можна припустити, що накопичення продуктів гемолізу в крові та зростання вмісту гему в тканинах не є основним механізмом дії іонів ртуті на глутатіон-S-трансферазну активність.

Таким чином, рівень продуктів гемолізу не є основним фактором, що визначає характер змін активності Г-S-T в печінці та нирках при дії хлориду ртуті та при моделюванні гемолітичної анемії. Але тривалість та амплітуда змін глутатіон-S-трансферазної активності в проведених дослідженнях були більш виражені в органі, куди переважно надходять продукти гемолізу та ксенобіотичні сполуки, що може частково обумовлювати тканинні особливості розвитку оксидативного стресу та органоспецифічні пошкодження при їх дії.

Список літератури

- Калиман П.А., Никитченко И.В., Сокол О.А., Стрельченко Е.В. Регуляция гемоксигеназной активности в печени крыс при оксидативном стрессе, вызванном хлоридом кобальта и хлоридом ртути // Биохимия. – 2001. – Т.66, вып.1. – С.98-104.
- Калиман П.А., Стрельченко К.В., Бараннік Т.В. та ін. Метаболізм гему та гемопротейнів і деякі показники антиоксидантної системи в еритроцитах і тканинах щурів при фенілгідразиновій анемії // Фізіол.журн. – 2003. – Т.49, №2. – С. 66-72.
- Калиман П.А., Стрельченко Е.В., Никитченко И.В., Филимоненко В.П. Гемоксигеназная активность и некоторые показатели антиоксидантной защиты в печени и почках крыс при глицерольной модели рабдомиолиза // Бюлл.эксп.биол.мед. – 2003. - Т.135, №1. – С. 45-48.
- 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.
- 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. 108-112.
- Ainbinder E., Bergelson S., Pinkus R., Daniel V. Regulatory mechanisms involved in activator-protein-1-mediated activation of glutathione-S-transferase gene expression by chemical agents // Eur. J. Biochem. – 1997. – Vol.243, №1. – P. 49-57.

- Dierickx P.J. In vitro interaction of organic mercury compounds with soluble glutathione-S-transferases from rat liver // Pharmacol Res. Commun. – 1985. - Vol.17, №5. – P. 489-500
- Ferrali M., Signorini C., Sugherini L. et al. Release of free, redox-active iron in the liver and DNA oxidative damage following phenylhydrazine intoxication // Biochem. Pharmacol. – 1997. – Vol.53, №11. – P. 1743-51.
- Hoensch H., Morgenstern I., Petereit G. et al. Influence of clinical factors, diet, and drugs on the human upper gastrointestinal glutathione system // Gut. – 2002. – Vol.50. – P. 235-240.
- Miller G.L. Protein determination for large numbers of samples // Anal. Chem. – 1959. - Vol.31, №5. – P. 964-966.
- Simons P.C., Jagt D.L. Bilirubin binding to human liver ligandin (glutathione S-transferase) // J. Biol. Chem. – 1980. – Vol.255, №10. – P. 4740-4744.
- Wang W., Ballatori N. Endogenous glutathione conjugates: occurrence and biological functions // Pharmacol. Reviews. – 1998. – Vol.50, №3. – P. 335-355.

ВЛИЯНИЕ ГЕМОЛИЗА НА ГЛУТАТИОН-S-ТРАНСФЕРАЗНУЮ АКТИВНОСТЬ В ПЕЧЕНИ И ПОЧКАХ КРЫС

Т.В. Баранник

Установлены тканеспецифичные изменения глутатион-S-трансферазной активности в печени и почках крыс при действии агентов, вызывающих гемолиз и накопление гем-содержащих соединений в крови. Фенилгидразин при введении *in vivo* вызывал снижение глутатион-S-трансферазной активности, более выраженное в печени, чем в почках. В глицерольной модели рабдомиолиза, напротив, наблюдалось более выраженное и длительное снижение глутатион-S-трансферазной активности в почках, чем в печени. Хлорид ртути вызывал повышение активности фермента в обоих органах, более выраженное в почках. Обсуждается влияние содержания общего гема в органе на динамику активности глутатион-S-трансферазы. Делается вывод, что активность глутатион-S-трансферазы изменяется более выражено и продолжительно в органе, в котором метаболизируются и/или накапливаются продукты гемолиза и вводимые ксенобиотики.

Ключевые слова: *глутатион-S-трансфераза, печень, почки, хлорид ртути, фенилгидразин, рабдомиолиз, гемолиз.*

THE INFLUENCE OF HEMOLYSIS ON GLUTATHIONE S-TRANSFERASE ACTIVITY IN RAT LIVER AND KIDNEY

T.V. Barannik

Tissue-specific changes of glutathione-S-transferase activity in rat liver and kidney were revealed under action of agents causing hemolysis and accumulation of heme-containing compounds in blood. Phenylhydrazine caused *in vivo* the decrease of glutathione-S-transferase activity that was more expressed in liver than in kidney. Glycerol model of rhabdomyolysis in the contrary caused the decrease of glutathione-S-transferase activity more expressed in kidney than in liver. Mercury chloride caused the increase of enzyme activity in both organs more expressed in kidney. The influence of total heme level in organ on the dynamics of glutathione-S-transferase activity is discussed. The conclusion is made that changes of glutathione-S-transferase activity are more expressed and prolonged in organ where hemolysis products and injected xenobiotics are metabolized and/or accumulated.

Key words: *glutathione-S-transferase, liver, kidney, mercury chloride, phenylhydrazine, rhabdomyolysis, hemolysis.*

Представлено Ю.В.Нікітченко
Рекомендовано до друку Є.Е.Перським