

© В.А.Кашуро, А.И.Карпищенко, С.И.Глушков, Т.М.Новикова, Л.В.Минаева, Т.И.Глушкова, В.В.Аксенов, 2005
УДК 577.152.1+612.015.32]:615.099-092.4

В.А.Кашуро, А.И.Карпищенко, С.И.Глушков, Т.М.Новикова, Л.В.Минаева, Т.И.Глушкова, В.В.Аксенов

СОСТОЯНИЕ СИСТЕМЫ ГЛУТАТИОНА И ПЕРЕКИСНОГО ОКИСЛЕНИЯ ЛИПИДОВ В ТКАНЯХ ПЕЧЕНИ И ПОЧЕК КРЫС ПРИ ОСТРЫХ ОТРАВЛЕНИЯХ ЦИКЛОФОСФАНОМ

V.A.Kashuro, A.I.Karpishchenko, S.I.Glushkov, T.M.Novikova, L.V.Minaeva, T.I.Glushkova, V.V.Aksenov

STATE OF THE SYSTEM OF GLUTATHIONE AND LIPID PEROXIDATION IN TISSUES OF THE LIVER AND KIDNEYS OF RATS WITH ACUTE CYCLOPHOSPHAMIDE POISONING

Кафедра клинической биохимии и лабораторной диагностики Военно-медицинской академии, Институт токсикологии, 442-й Окружной военный клинический госпиталь им. З.П.Соловьева, Санкт-Петербург, Россия

РЕФЕРАТ

ЦЕЛЬ ИССЛЕДОВАНИЯ. Комплексное изучение состояния системы глутатиона и интенсивности процессов перекисного окисления липидов при отравлениях циклофосфаном в дозе 200 мг/кг массы. **МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ.** Спектрофотометрическое определение концентрации восстановленного глутатиона, сульфгидрильных групп белков, малонового диальдегида, диеновых конъюгатов и активности глюкозо-6-фосфатдегидрогеназы, глутатионредуктазы, глутатионпероксидазы, глутатион-S-трансферазы, каталазы в тканях печени и почек 50 белых беспородных крыс. **РЕЗУЛЬТАТЫ.** Показано, что данная форма интоксикации сопровождается выраженными изменениями состояния системы глутатиона в тканях печени и почек отравленных животных (снижение содержания восстановленного глутатиона, нарушения активности глутатионредуктазы, глюкозо-6-фосфатдегидрогеназы, глутатионпероксидазы и глутатион-S-трансферазы). Обсуждены причины возникновения данных биохимических сдвигов, их межтканевые отличия и их роль в реализации цитотоксического действия циклофосфана. **ЗАКЛЮЧЕНИЕ.** Таким образом, установлена патогенетическая роль истощения функциональных возможностей системы глутатиона и активации свободнорадикальных процессов в реализации цитотоксического действия алкилирующих препаратов.

Ключевые слова: циклофосфан, глутатион, глутатионпероксидаза, глутатионредуктаза, глутатионтрансфераза.

ABSTRACT

THE AIM of the investigation was to carry out a complex study of the state of glutathione and intensity of lipid peroxidation processes in poisoning with cyclophosphamide in dose of 200 mg/kg of body mass. **MATERIAL AND METHODS.** Concentrations of reduced glutathione, sulfhydryl groups of proteins, malonaldehyde, diene conjugates and activity of glucose-6-phosphatedehydrogenase, glutathione reductase, glutathione peroxidase, glutathione-S- transferase, catalase were determined spectrophotometrically in the kidney and liver tissues of 50 white outbred rats. **RESULTS.** It was shown that this form of intoxication was followed by pronounced changes in the glutathione system in the liver and kidney tissues of poisoned animals (reduced content of reduced glutathione, impaired activity of glutathione reductase, glucose-6- phosphatedehydrogenase, glutathione reductase, glutathione-S-transferase). Causes of the appearance of the data of bio-chemical shifts, their interstitial distinctions and their role in realization of the cytotoxic action of cyclophosphamide were discussed. **CONCLUSION.** So, the pathogenetical role of exhaustion of the functional resources of the glutathione system was established as well as of activation of free radical processes in realization of the cytotoxic effects of alkylating preparations.

Key words: cyclophosphamide, glutathione, glutathione peroxidase, glutathione reductase, glutathione transferase.

ВВЕДЕНИЕ

Циклофосфан (ЦФ) является эффективным противоопухолевым препаратом, который также в последние десятилетия нашел широкое применение в качестве иммуносупрессора при аутоиммунных заболеваниях, таких как гломерулонефриты и волчаночные нефриты [1]. Использование ЦФ в различных схемах лечения позволяет предотвратить или замедлить развитие хронической почечной недостаточности, что имеет большое медицинское,

социальное и экономическое значение. Однако почти в 25% случаев терапию цитостатиками приходится прекращать из-за развития выраженных побочных эффектов, связанных с цитотоксическим поражением, в первую очередь, тканей печени и почек [2].

В основе реализации цитотоксических эффектов действия этого токсиканта лежит повреждение молекулярных структур клетки (нуклеиновых кислот, ферментов, липидов биомембран) реакци-

онно-способными метаболитами ЦФ и активными формами кислорода, образующимися в результате микросомального окисления ксенобиотика в гепатоцитах.

Система глутатиона принимает непосредственное участие в детоксикации ЦФ путем конъюгации его метаболитов [3, 4], в защите клетки от повреждающего действия свободных радикалов [5], а также участвует в процессах репарации поврежденных макромолекул. Таким образом, изучение состояния данной цитопротекторной системы в условиях токсического воздействия ЦФ представляет несомненный интерес.

Целью работы явилось изучение динамики изменений состояния системы глутатиона в тканях печени и почек крыс при острых отравлениях ЦФ в дозе 200 мг/кг.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ

Исследование проведено на 50 белых беспородных крысах-самцах массой 180-220 г, полученных из питомника РАН «Рапполово». ЦФ вводили внутривенно в дозе 200 мг/кг массы животного (0,5 мл 2% водного раствора/100 г массы). Контрольную группу составили животные, получавшие внутривенную инъекцию физиологического раствора (0,5 мл/100 г массы).

Спустя 3, 6, 12 и 24 часа после введения токсиканта животные были декапитированы. Извлеченные печень и почки отмывали холодным физиологическим раствором от крови в течение 35–50 сек. после декапитации и замораживали в жидком азоте, в котором они хранились до момента исследования.

В гомогенатах тканей печени и почек, приготовленных на 0,1 М калий-фосфатном буфере с pH 7,4, проводили определение концентрации восстановленного глутатиона (ВГ), сульфгидрильных групп белков (СГ) и малонового диальдегида (МДА). Общую активность глутатионредуктазы (ГР), глюкозо-6-фосфатдегидрогеназы (Г-6-Ф-ДГ), глутатионпероксидазы (ГП) и глутатион-S-трансферазы (ГТ) определяли в цитозольной фракции, полученной методом дифференциального центрифугирования.

Концентрацию ВГ определяли методом G.L.Ellman [6] в модификации, заключающейся в осаждении белка 20% раствором сульфосалициловой кислоты; содержание СГ – по методике G.Bellomo [7]; концентрацию МДА – по методу M.Uchiyama [8]. Активность ГР определяли по методу I.Carlborg, B.Mannervik [9], Г-6-Ф-ДГ – по A.Kornberg [10], ГП – по методу А.Н.Гавриловой, Н.Ф.Хмары [11] с использованием в качестве суб-

страта гидроперекиси трет-бутила, ГТ – по W.H.Nabig, W.B.Jakoby [12]. Расчет активности ферментов производили на 1 грамм белка. Концентрацию белка определяли методом Лоури в модификации G.L.Peterson [13]. Статистическую обработку результатов проводили с помощью программы «Microsoft Excel» с использованием t критерия Стьюдента для двух несвязанных величин.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Проведенное исследование позволило выявить ряд особенностей изменений содержания ВГ в исследуемых тканях экспериментальных животных при острых отравлениях ЦФ (табл.1).

Отмечались существенные межтканевые отличия динамики изменений данного показателя – наиболее раннее и выраженное падение уровня ВГ происходило в тканях печени. Введение ЦФ в дозе LD₅₀ вызывало значительное падение уровня ВГ в тканях этого органа – в 3,38 (p<0,05) через 3 ч. В более поздние сроки отмечалась тенденция к частичному повышению содержания восстановленной формы трипептида, которое через 24 ч составляло 51,5% от уровня контроля (p<0,05). В тканях почек максимальное падение уровня ВГ в 2,16 раза (p<0,05) отмечалось через 12 ч, а к исходу исследования происходило повышение концентрации восстановленной формы трипептида до 68,3% (p<0,05) от уровня контроля.

Выраженное снижение содержания восстановленного глутатиона, важнейшего компонента всей системы глутатиона, приводит к нарушению одной из функций изучаемой биохимической системы, связанной с поддержанием тиол-дисульфидного равновесия – ведущего регулирующего фактора активности ряда ферментативных систем. Особенности динамики концентрации СГ в исследуемых тканях имели несколько иной характер. Максимальное падение уровня СГ в тканях печени отмечалось лишь через 24 ч – на 28,1 % (p<0,05) ниже

Таблица 1
Динамика изменений концентрации ($\bar{X} \pm SD$) восстановленного глутатиона в тканях печени и почек белых беспородных крыс при остром отравлении циклофосфаном в дозе LD₅₀ (ммоль/г ткани)

Сроки исследования	Исследуемый орган	
	Печень	Почки
Контроль	10,77 ± 0,72	7,28 ± 0,31
3 ч	3,19 ± 0,44*	3,97 ± 0,45*
6 ч	4,43 ± 0,32*	4,61 ± 0,32*
12 ч	4,51 ± 0,47*	3,90 ± 0,45*
24 ч	5,55 ± 0,86*	4,97 ± 0,56*

* – достоверность отличия p<0,05 по сравнению с группой контроля.

значений контроля, а в тканях почек происходило умеренное снижение ($p<0,05$) концентрации белковых тиолов на протяжении всего срока исследования – на 35,7%, 28,4%, 34,1% и 32,3% через 3, 6, 12 и 24 часа, соответственно.

Исследование динамики активности Г-6-Ф-ДГ и ГР позволило установить, что в тканях печени и почек характер изменений активности данных ферментов был одинаков. Так, активность Г-6-Ф-ДГ в тканях печени через 6 и 24 ч была, соответственно, в 1,51 и 1,47 раза ($p<0,05$) ниже контрольной, а максимальное снижение ($p<0,05$) активности фермента в тканях почек отмечалось через 12 ч в 1,45 раза. В отличие от Г-6-Ф-ДГ активность ГР росла: в тканях печени максимальное повышение активности ГР на 38,3% ($p<0,05$) отмечалось через 12 ч, а в тканях почек на 39,3% ($p<0,05$) через 24 ч.

Отравления ЦФ сопровождались также выраженными сдвигами со стороны активности ферментов антиоксидантной защиты – глутатионпероксидазы и глутатион-S-трансферазы. Ярко выраженных межтканевых отличий при этом не отмечалось. В тканях печени падение активности ГП достигало максимума к концу исследования – на 24,4% ($p<0,05$) ниже значений контроля, а в тканях почек – 31,9% ($p<0,05$). Первоначальное повышение активности ГТ в тканях печени через 6 ч на 30,2 % ($p<0,05$) сменялось ее угнетением на 24,8 % ($p<0,05$) ниже значений контроля через 12 ч. Такая же, но менее выраженная, зависимость направленности изменений активности ГТ отмечалась в тканях почек.

Проведенное экспериментальное исследование позволило установить, что острые отравления ЦФ в больших дозах действительно сопровождаются активацией процессов перекисного окисления липидов, о чем свидетельствует накопление как конечных продуктов ПОЛ – МДА (табл. 2). При этом накопление МДА имело отчетливые межтканевые отличия. Если в тканях печени содержание МДА прогрессивно увеличивалось в течение всего пе-

риода наблюдения и через 24 ч в 2,16 раза ($p<0,05$) превышало уровень контроля, то в тканях почек максимальное повышение концентрации МДА на 40,3 % ($p<0,05$) отмечалось через 6 ч, а уже через 12 ч этот показатель возвращался к исходному уровню.

ОБСУЖДЕНИЕ

Цитотоксические эффекты действия ЦФ отчетливо проявлялись в виде существенных нарушений состояния системы глутатиона и активации ПОЛ в тканях печени и почек отравленных животных:

- 1) снижения содержания восстановленного глутатиона;
- 2) падения концентрации сульфгидрильных групп тканевых белков;
- 3) угнетения активности ферментов, принимающих участие в восстановлении глутатиона из окисленной формы (глутатионредуктазы и глюкозо-6-фосфатдегидрогеназы);
- 4) падения активности антиоксидантных энзимов (глутатионпероксидазы, глутатион-S-трансферазы);
- 5) срыва конъюгирующей функции системы глутатиона в результате падения содержания ВГ и активности глутатион-S-трансферазы;
- 6) увеличения концентрации МДА.

Несмотря на то, что истощение ВГ в клетках при применении ЦФ в настоящее время отмечается многими исследователями [14, 15], механизм снижения его концентрации в современной литературе не нашел четкого объяснения.

Основными причинами снижения уровня ВГ в тканях печени и почек являются его необратимое расходование на конъюгацию с метаболитами ЦФ, а также переход в окисленную форму при осуществлении реакций антирадикальной защиты. Вместе с тем, при большой дозе введенного ксенобиотика система конъюгации перестает справляться с детоксикацией метаболитов ЦФ. Прямым подтверждением предельного напряжения процессов детоксикации при введении ксенобиотика является большая степень его снижения и отсутствие последующего роста концентрации восстановленного трипептида (последнее также указывает и на срыв всей системы регуляции уровня ВГ в клетке – систем синтеза и распада глутатиона, системы его восстановления из окисленной формы). Наибольшее снижение концентрации ВГ было отмечено именно в печени, где, с одной стороны, его уровень в норме значительно превосходит содержание в других органах [16], а с другой стороны, метаболизм глутатиона наиболее интенсивен.

Существуют по крайней мере три вероятные

Таблица 2
Динамика изменений концентрации ($\bar{X} \pm SD$) малонового диальдегида в тканях печени и почек белых беспородных крыс при остром отравлении циклофосфаном в дозе LD_{50} (ммоль/г ткани)

Сроки исследования	Исследуемый орган	
	печень	почки
Контроль	175,5 $\pm$ 8,8	147,5 $\pm$ 5,3
3 ч	236,9 $\pm$ 14,9*	169,6 $\pm$ 4,7*
6 ч	234,8 $\pm$ 15,3*	207,0 $\pm$ 13,1*
12 ч	241,2 $\pm$ 12,6*	161,9 $\pm$ 11,1
24 ч	380,6 $\pm$ 15,9*	158,0 $\pm$ 4,6

* – достоверность отличия $p<0,05$ по сравнению с группой контроля.

причины, вызывающие наиболее выраженное снижение уровня ВГ в тканях печени по сравнению с тканями почек. Первая причина связана с неравномерным распределением ЦФ в организме и преимущественным накоплением его в печени [17]. Вторая причина межтканевых различий концентрации ВГ объясняется разной интенсивностью микросомального окисления в исследуемых органах. В работах А.И.Арчакова [18, 19] отмечается, что по интенсивности система цитохром Р-450-зависимых микросомальных монооксигеназ в печени намного превосходит остальные органы. Гидроксилирование ЦФ системой микросомальных монооксигеназ приводит к образованию более токсичных продуктов, т.е. имеет место процесс метаболической активации ксенобиотика [20, 21]. В дальнейшем активные продукты под воздействием ГТ подвергаются конъюгации с восстановленным глутатионом. Значение интенсивности микросомального окисления подтверждается в исследованиях влияния ингибиторов и индукторов цитохрома Р-450. Так, введение ЦФ после предварительной индукции цитохрома Р-450 феноталом приводило к уменьшению экскреции почками неметаболизированного токсиканта и к более высокому мутагенному эффекту [22]. Специфические ингибиторы, напротив, приводят к уменьшению образования активных метаболитов ЦФ [21] и, как следствие, к снижению количества хромосомных aberrаций и мутагенной активности [23]. По-видимому, максимальное увеличение активности микросомальных ферментов именно в тканях печени служит причиной и максимальной активации свободнорадикальных процессов в тканях этого органа, связанных с утечкой активных форм кислорода с цитохрома Р-450 и вызывающих повреждение органических молекул. Соответственно, в этом органе максимальным будет и расходование ВГ на обезвреживание АФК, органических гидроперекисей и на репарацию ряда молекул.

Третья причина межтканевых различий уровня ВГ связана с особенностями конъюгирующей системы и с активностью глутатион-S-трансферазы. По уровню активности ГТ органы выстраиваются в ряд: печень > почки > головной мозг > эритроциты [24]. Несмотря на то, что высокая активность этого фермента является основой детоксикации ксенобиотиков [12], наличие субстратов для ГТ приводит к резкому снижению концентрации ВГ в тканях, где высока активность фермента [24]. В проведенном нами исследовании активность глутатион-S-трансферазы в печени превышала активность фермента в тканях почек в 1.27 раза.

Снижение активности ферментативного звена

АОЗ и переход окислительных повреждений тканей в некомпенсируемую фазу при применении высоких доз ЦФ может быть связано со следующими причинами:

1. Истощение уровня ВГ, как основного низкомолекулярного антиоксиданта клетки и субстрата глутатион-пероксидазной реакции [16,25].

2. Алкилирование сульфгидрильных групп в активном центре ГП, ГТ продуктами метаболизма ЦФ [26].

3. Истощение тканевых резервов ресинтеза НАДФ•Н и угнетение активности Г-6-Ф-ДГ [5, 27].

4. Угнетение активности ГП супероксидным радикалом и конечными продуктами глутатионовой конъюгации – меркаптуровыми кислотами, которые в процессе метаболизма ЦФ активно выделяются с желчью, а затем реабсорбируются и поступают в кровь [28].

5. Оксидативное повреждение молекул ферментов и их активных центров свободными радикалами и АФК [16,25,28].

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Полученные результаты указывают на существенную значимость нарушений функционирования системы глутатиона в реализации цитотоксических эффектов действия ЦФ. Представляется логичным приведение следующей схемы последовательности событий, приводящих к повреждению и гибели клеток в условиях острых отравлений данным токсикантом. В результате метаболических превращений ЦФ образуются реакционно-способные метаболиты и активные формы кислорода, в обезвреживании которых активное участие принимает система глутатиона. В ответ на снижение уровня ВГ и интенсификацию свободнорадикальных процессов происходит адаптивная активация системы глутатиона, связанная с повышением активности ферментов, принимающих участие в конъюгации метаболитов ксенобиотика (ГТ), обезвреживании свободных радикалов (ГП), восстановлении глутатиона из окисленной формы (ГР). Большая интенсивность токсической нагрузки приводит к изначально функциональной недостаточности систем конъюгации и антирадикальной защиты, в дальнейшем присоединяется органическое повреждение ряда ферментов системы глутатиона метаболитами ЦФ и свободными радикалами. Данные процессы приводят к абсолютной недостаточности функций системы глутатиона, направленных на поддержание тиол-дисульфидного равновесия в тканях, защиту от повреждающего действия свободных радикалов и реакционноспособных метаболитов. Таким образом, создаются условия для реализации общих механиз-

мов цитотоксичности, связанных с повреждением клеточных мембран, нарушением внутриклеточного гомеостаза Ca^{2+} , процессов энергетического обмена, синтеза белка и деления клетки.

БИБЛИОГРАФИЧЕСКИЙ СПИСОК

1. Шулуто БИ. *Нефрология 2002. Современное состояние проблемы*. Ренкор, СПб., 2002; 779
2. Шилов ЕМ. *Иммунодепрессивная терапия активных форм нефритов (клинико-экспериментальное исследование)*. Дис.... д-ра мед. наук. М., 1984; 70
3. Gurtoo HL, Hipkens JH, Sharma SD. Role of glutathione in the metabolism-dependent toxicity and chemotherapy of cyclophosphamide. *Cancer Res* 1981; 41(9):3584-3591
4. Yuan ZM, Smith PB, Brundrett RB et al. Glutathione conjugation with phosphoramidate mustard and cyclophosphamide. A mechanistic study using tandem mass spectrometry. *Drug Metab Dispos* 1991; 19 (3): 625-629
5. Тиунов ЛА. Механизмы естественной детоксикации и антиоксидантной защиты. *Вестник РАМН* 1995; (3): 9-13
6. Ellman GL. Tissue sulfhydryl groups. *Arch Biochem Biophys* 1959; 82 (1): 70-77
7. Bellomo G, Thor H, Orrenius S. Modulation of cellular glutathione and protein thiol status during quinone metabolism. *Meth. Enzymol* 1990; (186):627-635
8. Uchiyama M, Michara M. Determination of malonaldehyde precursor in tissues by thiobarbituric acid test. *Anal Biochem* 1978; 86 (1): 271-278
9. Carlberg I, Mannervik B. Glutathione reductase. *Meth Enzymol* 1985; (113): 484-490
10. Kornberg A, Horecker BL, Smyrniot PZ. Glucose-6-phosphate dehydrogenase-6-phosphogluconic dehydrogenase. *Meth Enzymol* 1955; (1): 323-327
11. Гаврилова АН, Хмара НФ. Определение активности глутатионпероксидазы эритроцитов при насыщающих концентрациях субстратов. *Лаб дело* 1986;(12):21- 24.
12. Habig WH, Jakoby WB. Assay for differentiation of glutathione S-transferases. *Meth Enzymol* 1981;(77): 398-405
13. Peterson GL. Simplification of protein assay method of Lowry et al – which is more generally applicable. *Anal Biochem* 1977; 83 (2): 346-356
14. De Leve LD. Cellular target of cyclophosphamide toxicity in the murine liver: role of glutathione and site of metabolic activation. *Hepatology* 1996; 24(4): 830-837
15. Del Olmo M, Alonso-Varona A, Castro B et al. Effects of L-2-oxothiazolidine-4-carboxylate on the cytotoxic activity and toxicity of cyclophosphamide in mice bearing B16F10 melanoma liver metastases. *Melanoma Res* 2000; (2):103-112
16. Кулинский ВИ, Колесниченко ЛС. Биологическая роль глутатиона. *Успехи соврем биологии* 1990; 110 (4):20-37
17. Кивман ГЯ, Рудзит ЭА, Яковлев ВП. *Фармакокинетика химиотерапевтических препаратов*. Медицина, М., 1982; 255
18. Арчаков АИ. *Микросомальное окисление*. Наука, М., 1975; 327
19. Арчаков АИ, Карузина ИИ. Окисление чужеродных соединений и проблемы токсикологии. *Вестн АМН СССР* 1988; (1):14-23
20. Boyd N. Biochemical mechanisms in chemical-induced injury: role of metabolic activation. *CRC Crit. Rev Toxicol* 1980; 7 (2): 103-176
21. Bull S, Langezaal I, Clothier R, Coecke SA. Genetically engineered cell-based system for detecting metabolism-mediated toxicity. *Altern Lab Anim* 2001; (6) :703-716
22. Sessink PJ, Vaes WH, van den Broek PH et al. Influence of Aroclor 1254, phenobarbital, beta-naphthoflavone, and ethanol pretreatment on the biotransformation of cyclophosphamide in male and female rats. *Toxicology* 1996; (2): 141-150
23. Sharma N, Trikha P, Athar M, Raisuddin S. Protective effect of Cassia occidentalis extract on chemical-induced chromosomal aberrations in mice. *Drug Chem Toxicol* 1999; (4): 643-653
24. Колесниченко ЛС, Кулинский ВИ. Глутатионтрансферазы. *Успехи соврем биологии* 1989; 107(2) :179-194
25. Кулинский ВИ, Колесниченко ЛС. Обмен глутатиона. *Успехи биол химии* 1990; 31:157-179.
26. Росс У. *Биологические алкилирующие вещества*. Медицина, М., 1964; 260
27. Голиков СН, Саноцкий ИВ, Тиунов ЛА. *Общие механизмы токсического действия*. Медицина, Л., 1986; 279
28. Кулинский ВИ, Колесниченко ЛС. Структура, свойства, биологическая роль и регуляция глутатионпероксидазы. *Успехи совр биол* 1993; 113, (1):107-122

Поступила в редакцию 10.04.2006 г.