

## Влияние цитрата на активность антиоксидантных ферментов в тканях крыс при хронической алкогольной интоксикации\*

**САФОНОВА О.А.** к.б.н., ассистент, кафедра медицинской биохимии и микробиологии, Воронежский государственный университет  
**РАХМАНОВА Т.И.** к.б.н., доцент, кафедра медицинской биохимии и микробиологии, Воронежский государственный университет  
**ПОПОВА Т.Н.** д.б.н., зав. кафедрой медицинской биохимии и микробиологии, Воронежский государственный университет  
**ПАНЧЕНКО Л.Ф.** д.м.н., руководитель лаборатории биохимии, Национальный научный центр наркологии Росздрава, Москва

*Проведено исследование влияния цитрата на активность антиоксидантных ферментов в печени, сердце и сыворотке крови крыс при хронической алкогольной интоксикации. Показано, что активности глутатионпероксидазы и глутатионредуктазы, снижающиеся при алкогольной интоксикации, под действием цитрата повышаются относительно значений при патологии. В то же время введение цитрата приводит к уменьшению активности каталазы в тканях крыс по сравнению с уровнем при патологии. Выявлены тканеспецифические изменения активности супероксиддисмутазы (СОД) в условиях алкогольного поражения и при действии цитрата. Отмеченные изменения активностей антиоксидантных ферментов могут быть следствием торможения цитратом свободнорадикальных процессов, усиливающихся при алкогольной интоксикации.*

**Ключевые слова:** алкогольная интоксикация, супероксиддисмутаза, каталаза, глутатионовая антиоксидантная система, цитрат.

### Введение

**Х**ронический алкоголизм и связанные с ним соматические заболевания являются важнейшей медико-социальной проблемой современности. Несмотря на многочисленные теории о патогенетических механизмах, связанных с хронической алкогольной интоксикацией, многие аспекты нарушений метаболизма остаются невыясненными. Имеются данные, указывающие на большую роль окислительного стресса в патогенезе алкогольного повреждения печени и сердца. Существует мнение, что токсическое действие этанола опосредовано усилением свободнорадикального окисления (СРО), являющимся следствием химической агрессивности ацетальдегида [7, 8, 10]. В то же время с нарушением СРО связывают повреждение многих белков, в том числе ферментов [4, 5]. Вместе с тем, методы оценки и коррекции оксидативного статуса при алкогольном поражении печени и сердца остаются недостаточно разработанными, в связи с чем актуальным является исследование регуляции активности антиоксидантной системы (АОС) организма в условиях патологии и действия веществ, обладающих протекторными и антиоксидантными свойствами. К числу таких соединений может быть отнесен цитрат, способный проявлять антиоксидантные свойства благодаря наличию диссоциирующих карбоксильных групп, что позволяет ему хелатировать ионы  $Fe^{2+}$ . По-видимому, эффект связывания

$Fe^{2+}$  цитратом мог бы способствовать снижению уровня в клетке наиболее реакционноспособного  $OH\cdot$ -радикала, для образования которого в реакции Фентона необходим  $Fe^{2+}$ . На данный момент практически не известна АОС, специфически утилизирующая  $OH\cdot$  радикал, что существенно затрудняет контроль за протеканием процессов СРО при различных патологических состояниях. Следует отметить, что в некоторых работах было показано нарушение метаболизма цитрата при патологических состояниях [6, 11].

В связи с вышесказанным в данной работе было проведено исследование влияния цитрата на активность ферментативного компонента АОС при развитии алкогольного поражения тканей крыс.

### Материалы и методы

В качестве объекта исследования использовали белых лабораторных крыс-самцов массой 150—200 г. В ходе эксперимента животные были разделены на 3 экспериментальные группы: в 1-й группе ( $n=19$ ) животных содержали в стандартном режиме вивария; 2-ю группу ( $n=12$ ) составляли животные с хронической алкогольной интоксикацией, которую создавали путем добавления к стандартному рациону 15%-ного этанола регулярно в течение месяца [1]; в 3-й группе ( $n=9$ ) животным с 14-го дня развития хронической алкогольной интоксикации внутрибрюшинно вводили цитрат в

\* Работа поддержана финансированием по Программе «Развитие научного потенциала высшей школы» РНП.2.1.1.4429 и грантом РФГФ 07-06-56605-а/Ц

дозе 50 мг на 1 кг каждые 48 ч в течение последующих 14 дней. Материал для исследования забирали через 28 дней после начала алкоголизации.

Для получения сыворотки использовали венозную кровь. При получении гомогенатов навески печени и сердца крысы гомогенизировали в 4-кратном объеме охлажденной среды выделения (50 мМ трис-НСI-буфер (рН 7,8), содержащий 1 мМ ЭДТА, 1% б-меркаптоэтанол) и центрифугировали при 7000 g в течение 10 мин. Полученный материал использовали для определения активности ферментов.

Активность ферментов определяли на СФ-56 и выражали в ферментативных единицах (Е).

За единицу активности глутатионпероксидазы (ГП), глутатионредуктазы (ГР) и каталазы принимали количество фермента, необходимого для превращения 1 мкМ субстрата в 1 мин при 25°C. Активность ГР определяли при 340 нм в среде, содержащей 50 мМ калий-фосфатный буфер (рН 7,4), 1 мМ ЭДТА, 0,16 мМ НАДФН и 0,8 мМ окисленного глутатиона. Активность ГП измеряли при 340 нм в 50 мМ калий-фосфатном буфере (рН 7,4), содержащем 1 мМ ЭДТА, 0,12 мМ НАДФН, 0,85 мМ восстановленного глутатиона, 0,37 мМ H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, 1 ед/мл ГР. Активность каталазы определяли при 410 нм по качественной реакции H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> с молибдатом аммония [2]. Реакцию начинали добавлением ферментного препарата.

Активность СОД определяли по ингибированию скорости восстановления нитросинего тетразолия (НСТ) в неэнзиматической системе феназинметасульфата (ФМС) и НАДН при 540 нм. Среда спектрофотометрирования включала в себя следующие компоненты: 0,1 М фосфатный буфер (рН 7,8), 0,33 мМ ЭДТА, 0,41 мМ НСТ, 0,01 мМ ФМС, 0,8 мМ НАДН. Реакцию запускали добавлением НАДН. За единицу активности СОД принимали количество фермента, необходимого для 50%-ного ингибирования восстановления НСТ.

Содержание общего белка определяли по методу Лоури [9]. Данные обрабатывали с использованием t-критерия Стьюдента, различия считали достоверными при  $p \leq 0,05$ .

### Результаты и их обсуждение

В данной работе было проведено исследование активности таких ферментов АОС, как ГП (КФ 1.11.1.9.), ГР (КФ 1.6.4.2.), каталаза (КФ 1.11.1.6.) и СОД (КФ 1.15.1.1) в печени, сердце и сыворотке крови животных в норме, при хронической алкогольной интоксикации и действии цитрата.

В контроле СРО важнейшее место занимает ГР/ГП ферментативная система, обеспечивающая детоксикацию пероксидов. В ходе проведенных нами исследований установлено, что при алкогольной ин-

токсикации происходит снижение активности селеновой ГП и ГР в тканях крыс [3]. При введении цитрата на фоне хронической алкогольной интоксикации наблюдается увеличение активности ГП/ГР-системы по сравнению с данными, полученными для ферментов из тканей крыс с патологией (рис. 1). Так, действие цитрата приводило к возрастанию активности ГП, рассчитанной в Е/г сырой массы, в печени и сердце крыс в 1,3 и 1,2 раза, ГР — в 1,6 и 1,1 раза соответственно. При этом активность ГП и ГР, выраженная в Е/мл сыворотки, возрастала в 1,9 и 1,4 раза соответственно.

Ранее нами было показано, что в тканях крыс с алкогольной интоксикацией наблюдается повышение активности каталазы по сравнению с контрольным уровнем [3]. Это может иметь важное адаптивное значение как для ускорения процессов окисления алкоголя при его высоких концентрациях, так и для обезвреживания пероксидов, концентрация которых может при этом резко возрастать. При введении цитрата было выявлено снижение активности каталазы, рассчитанной в Е/г сырой массы, в печени и сердце в 1,9 и 2,3 раза соответственно, в сыворотке крови, выраженной в Е/мл, — в 1,7 раза по сравнению с данными при патологии (рис. 2). Полученные результа-

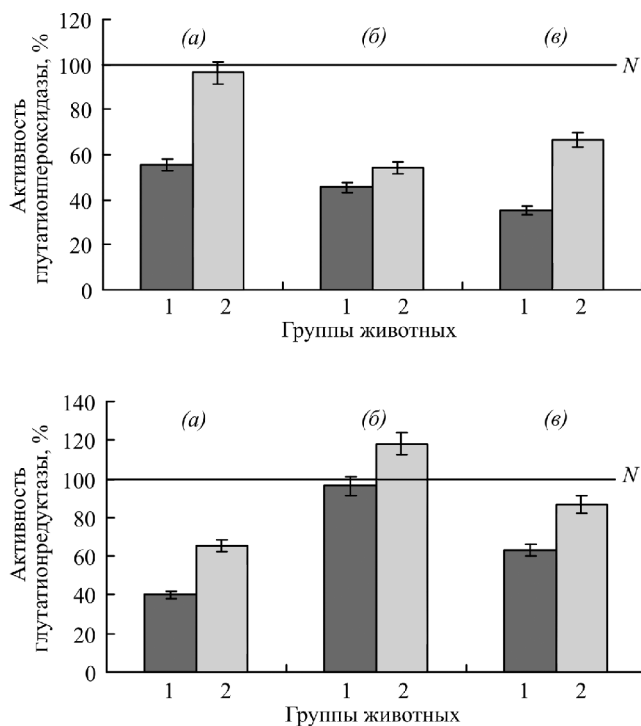


Рис. 1. Активность глутатионпероксидазы и глутатионредуктазы, выраженная в процентах от Е на грамм сырой массы: а — печени; б — сердца; в — Е на 1 мл сыворотки крови при: 1 — хронической алкогольной интоксикации крыс; 2 — действии цитрата на фоне развития патологии; N — активность ферментов в норме (100%)

ты могут быть связаны с проявлением антиоксидантных свойств цитрата, вследствие чего снижается нагрузка на ферментативную АОС.

При выражении активности ГП, ГР и каталазы в виде Е/мг белка было также отмечено изменение данных показателей, отклоняющихся в условиях хронической алкогольной интоксикации от нормы [3], под действием цитрата в сторону контрольных значений.

Согласно результатам проведенных исследований, в гепатоцитах и сыворотке крови крыс с хронической алкогольной интоксикацией происходит повышение активности СОД, выраженной в виде Е/мг белка, в 1,7 и 1,5 раза соответственно по сравнению с контролем (рис. 3). Полученные данные могут быть объяснены с той точки зрения, что при усилении свободно-радикальных процессов в печени происходит мобилизация АОС, направленная на снижение их уровня. Известно, что при окислении этанола в клетках печени под действием ряда ферментативных систем образуется ацетальдегид, дальнейшие превращения которого могут протекать с участием ксантинооксидазы и альдегидоксидазы [12]. Эти ферменты в качестве продуктов реакции образуют активные формы кислорода, такие, как  $O_2^{\cdot-}$  и  $H_2O_2$ . Для предотвращения токсического действия активированных кислородных метаболитов на клеточные компоненты должна происходить их инактивация. В связи с этим возрастание активности СОД имеет важное адаптивное значение. В то же время при исследовании гомогената сердечной мышцы животных с алкогольной интоксикацией было выявлено снижение супероксиддисмутазной активности по сравнению с нормой в 1,3 раза (рис. 3), что может быть следствием развития декомпенсационных процессов в клетках миокарда.

При введении цитрата животным с хронической алкогольной интоксикацией было отмечено изменение активности СОД в тканях по сравнению со значениями при патологии. При действии данного соединения происходило снижение активности исследуемого фермента в печени крыс в 1,3 раза, а также была отмечена тенденция к снижению активности СОД в сыворотке крови. При этом активность фермента в сердечной мышце повышалась в 1,2 раза по сравнению со значениями при патологии, т.е. исследуемые параметры изменялись в сторону нормы (рис. 3).

### Заключение

Таким образом, установлено, что под действием цитрата при алкогольном поражении тканей наблюдается изменение параметров, характеризующих активность АОС организма, в сторону нормы. Активности ГП и ГР в тканях печени, сердца и сыворотке крови крыс, подавленные в условиях хронической алкогольной интоксикации, возросли при введении протек-

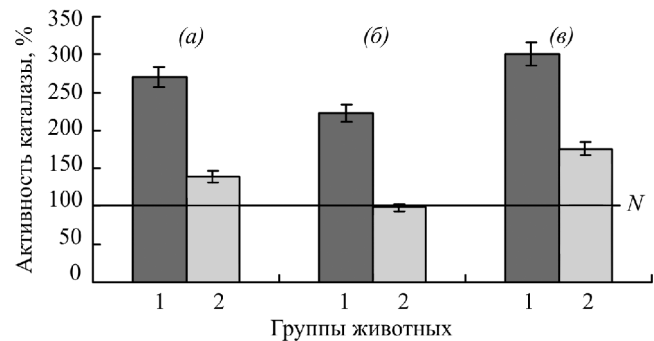


Рис. 2. Активность каталазы, выраженная в процентах от Е на грамм сырой массы: а — печени; б — сердца; в — Е на 1 мл сыворотки крови при: 1 — хронической алкогольной интоксикации крыс; 2 — действии цитрата на фоне развития патологии; N — активность ферментов в норме (100%)

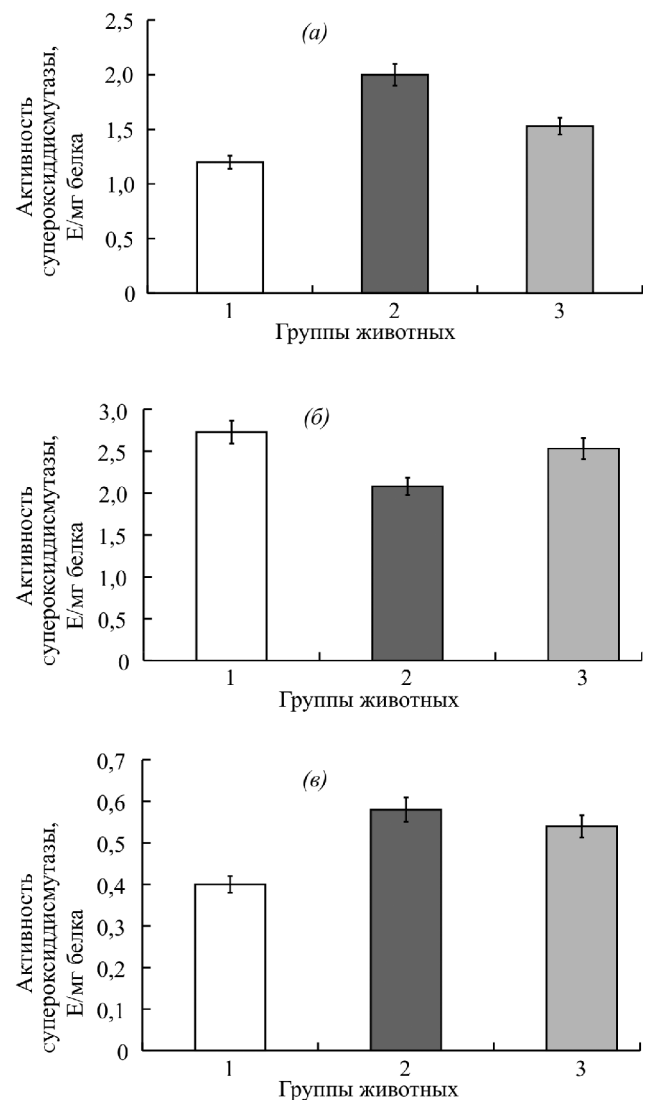


Рис. 3. Активность СОД: а — в печени; б — сердце; в — сыворотке крови: 1 — в норме; 2 — при хронической алкогольной интоксикации крыс; 3 — действии цитрата на фоне развития патологии

тора. Под действием цитрата активность каталазы снижалась, приближаясь к показателям в контрольной группе животных. Изменения активности СОД при алкогольной интоксикации носили тканеспецифичный характер, однако при введении цитрата показатели ферментативной активности также изменялись в сторону контрольных значений. Результаты проведенных исследований свидетельствуют о возможности коррекции функционирования ферментативного звена АОС при хронической алкогольной интоксикации с помощью цитрата.

### Список литературы

1. Бардина Л.Р., Сатановская В.И. Метаболическая адаптация к алкоголю у крыс, различающихся по предпочтению этанола воде // . — 1999. — №2. (<http://medi.ru/pbmc/8890203.htm>).
2. Бузлама В.С. Методическое пособие по изучению процессов перекисного окисления липидов и системы антиоксидантной защиты организма у животных. — Воронеж, 1997. — 35 с.
3. Попова Т.Н., Рахманова Т.И., Сафонова О.А. Активность систем детоксикации пероксидов в тканях крыс при алкогольной интоксикации // Наркология. — 2008. — №2. — С. 32—35.
4. Armant D.R., Saunders D.E. Exposure of embryonic cells to alcohol: contrasting effect during preimplantation and postimplantati-

on development // Seminars of Perinatology. — 1996. — №20. — P. 127—139.

5. Ding W., Fried U., Larsson C. et al. Acute ethanol exposure attenuates the expression of *jun D* in human neuroblastoma cells // Neurochemistry International. — 1998. — №32. — P. 525—530.

6. Feldman A.M., Grollman S. The effect of 3,3',5-triiodo-L-thyronine on the renal handling of citrate // Proc. Soc. Exp. Biol. Med. — 1975. — Vol. 149, №2. — P. 494—499.

7. Koch O.R., Galeotti T., Bartoli G.M. et al. Alcohol-induced oxidative stress // J. Xenobiotica. — 1991. — №8. — P. 1077—1084.

8. Lieber C.S. Role of oxidative stress and antioxidant therapy in alcoholic and non alcoholic liver diseases // Advances in Pharmacology. — 1997. — №38. — P. 601—628.

9. Lowry O.H., Rosebrought N., Farr A. et al. Protein measurement with the Folin-phenol reagent // J. Biol. Chem. — 1951. — Vol. 194. — P. 265—271.

10. Nordmann R., Ribiere C., Rouach H. Implication of free radical mechanisms in ethanol-induced cellular injury // Free Radic. Biol. Med. — 1992. — №12. — P. 219—240.

11. Rafalowska U., Erecinska M., Chance B. The effect of aspartate on citrate metabolism in the cytosolic fraction of brain under conditions of normoxia, hypoxia and anesthesia // J. Neurochem. — 1975. — Vol. 25, №4. — P. 497—501.

12. Younes A.L., Strubelt O. Enhancement of hypoxic liver damage by ethanol. Involvement of xanthine oxidase and the role of glycolysis // Biochem. Pharmacol. — 1987. — Vol. 36. — P. 2973—2977.

## CITRATE INFLUENCE ON ANTIOXIDANT ENZYMES ACTIVITIES IN RATS TISSUES AT CHRONIC ALCOHOL INTOXICATION

SAFONOVA O.A.<sup>1</sup>, RAKHMANOVA T.I.<sup>1</sup>, POPOVA T.N.<sup>1</sup>, PANCHENKO L.F.<sup>2</sup>

<sup>1</sup> — Voronezh State University, Department of Medical Biochemistry and Microbiology

<sup>2</sup> — National Narcology Science Centre of Roszdraz, Department of Biochemistry

*The investigation of citrate influence on activity of antioxidant enzymes in liver, heart and blood serum of rats under chronic alcohol intoxication has been carried out. It has been found, that glutathione peroxidase and glutathione reductase activities, reducing under alcohol intoxication, increase concerning to meanings at pathology under citrate action. At the same time citrate introduction leads to decrease of catalase activity in rats tissues in comparison with level under pathology. Tissue-specific changes of superoxide dismutase activity in alcohol damage conditions and under citrate action took place. Revealed changes in antioxidant enzymes activities may be a consequence of citrate inhibition free-radical processes, intensifying at alcohol intoxication.*