

ВЛИЯНИЕ БЕМИТИЛА НА ГЛУТАТИОНОВУЮ СИСТЕМУ В ПЕЧЕНИ КРЫС ПРИ ОСТРОЙ ГИПОКСИИ

И. В. Зарубина, О. П. Миронова¹

В опытах на крысах изучено влияние бемитила на состояние глутатионовой системы печени при острой гипоксической гипоксии. Гипоксию моделировали “подъемом” животных в барокамере на “высоту” 8000 м, длительность экспозиции — 30 мин. Бемитил в дозе 25 мг/кг внутривнутрибрюшинно за 30 мин до гипоксического эпизода препятствует снижению содержания восстановленного глутатиона, SH- групп, активности глутатионредуктазы, глутатионпероксидазы. Методом ингибиторного анализа с помощью актиномицина D установлено, что защитные эффекты бемитила обусловлены его способностью усиливать синтез антиоксидантных ферментов глутатионовой системы.

Ключевые слова: печень, гипоксия, бемитил, глутатионовая система

ВВЕДЕНИЕ

Глутатионовая система представлена пулом восстановленной и окисленной форм глутатиона, глутатионредуктазы, обеспечивающей ресинтез восстановленного глутатиона, и утилизирующих перекись водорода и липоперекиси глутатионпероксидазы и глутатионтрансферазы. Биологическая роль глутатионовой системы многогранна [3, 4]. Известно, что тиолдисульфидные соединения участвуют в механизмах неспецифической реакции и адаптации организма к экстремальным факторам внешней среды [9]. Высокая реакционная способность глутатионовой системы обеспечивает ее участие в метаболических реакциях, направленных на поддержание клеточного гомеостаза и защиту от окислительного стресса [10, 14.]. Глутатион синтезируется и метаболизируется преимущественно в печени, которая при нарушениях глутатионовой защитной системы страдает в первую очередь. Снижение содержания восстановленного глутатиона и активности ферментов глутатионовой системы при дисфункции печени вызывает усиление свободнорадикального окисления с последующим структурным повреждением гепатоцитов и прогрессированием печеночной недостаточности [12, 16]. Изменения активности глутатионовой системы наблюдаются при ишемических и реперфузионных повреждениях печени [1], при острой гипоксии, сопровождающейся усилением в печени процессов липопероксидации и угнетением антиоксидантных систем [8]. В связи с этим защита печени и организма в целом от гипоксических повреждений остается актуальной задачей. Стабилизация глутатионовой системы печени и повышение неспецифической устойчивости организма при действии острой гипоксии может быть достигнута при использовании фармакологических средств с энергостабилизирующими и

антиоксидантными свойствами, например, бемитила (2- этилтиобензимидазола гидробромида).

Целью настоящего исследования явилось изучение влияния бемитила на состояние антиоксидантной глутатионовой системы в печени крыс при острой гипоксической гипоксии.

МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Опыты проведены на беспородных белых крысах-самцах массой 180 – 200 г, разделенных на 3 группы: 1 — интактные крысы, 2 — животные с острой гипоксической гипоксией, 3 — крысы, перенесшие гипоксию на фоне действия бемитила, 4 — крысы, перенесшие гипоксию на фоне действия бемитила и избирательного ингибитора синтеза белка актиномицина D. Бемитил вводили внутривнутрибрюшинно в дозе 25 мг/кг за 30 мин до “подъема” крыс в барокамере. Актиномицин D вводили внутривнутрибрюшинно в дозе 250 мкг/кг за 1 ч до введения бемитила. Контрольным животным вводили в равном объеме 0,9% раствор натрия хлорида. Крыс “поднимали” на высоту 8000 м “со скоростью 50 м/с”. Длительность экспозиции “на высоте” составляла 30 мин. О состоянии глутатионовой системы судили по содержанию в замороженных в жидком азоте тканях печени свободных SH-групп белков [2], восстановленного глутатиона [5], активности глутатионпероксидазы [15], глутатионтрансферазы [11], глутатионредуктазы [5]. Активность ферментов относили к содержанию белка в пробах [13].

Результаты исследований обрабатывали статистически по общепринятым методам с использованием *t*-критерия Стьюдента.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Острая гипоксия сопровождалась снижением в печени содержания восстановленного глутатиона на 18% (таблица). Одной из функций глутатиона является восстановление SH-групп ферментов и других белков при их окислении или связывании, т.н. тиоловый редокс — контроль активности ферментов. Возникающий в

¹ Кафедра фармакологии (зав. — проф. П. Д. Шабанов) Военно-медицинской академии МО РФ, Санкт-Петербург, 194044, ул. Акад. Лебедева, 6.

условиях кислородной недостаточности дефицит глутатиона приводит к снижению в печени в два раза содержания свободных SH-групп белков ($p < 0,05$). Уровень восстановленного глутатиона в печени, определяющий эффективность защиты клетки от продуктов окислительного стресса при гипоксии, зависит от скорости его синтеза и распада, а также от активности ферментов, регулирующих соотношение его окисленной и восстановленной форм. Острая гипоксия привела к снижению на 12% активности глутатионредуктазы, восполняющей пул восстановленного глутатиона. Наряду с этим в печени угнеталась на 34% ($p < 0,05$) активность глутатионпероксидазы, сопряженно работающей с глутатионредуктазой в глутатионовом редокс-цикле. Активность глутатионтрансферазы, локализованной преимущественно в ядерных структурах гепатоцитов, при острой гипоксии достоверно не изменялась. Подобный характер изменения активности ферментов глутатионовой системы согласуется с данными, свидетельствующими о первоначальном угнетении активности глутатионпероксидазы при ишемическом повреждении органов и отстающем во времени от снижения активности глутатионтрансферазы [1].

Таким образом, острая гипоксическая гипоксии сопровождается снижением содержания в печени свободных SH-групп белков, восстановленного глутатиона, активности глутатионредуктазы, глутатионпероксидазы и отсутствием достоверных изменений активности глутатионтрансферазы.

Введенный крысам перед “подъемом” в барокамере бемитил стабилизировал активность глутатионовой системы печени. По сравнению с действием острой гипоксии на фоне применения бемитила в печени возрастало содержание восстановленного глутатиона на 26% и свободных SH-групп белков на 37% ($p < 0,05$). Бемитил предупреждал угнетение в печени активности глутатионредуктазы и глутатионпероксидазы. Активность глутатионпероксидазы возрастала на 12% и глутатионредуктазы на 18% ($p < 0,05$), активность глутатионтрансферазы достоверно не изменялась. При этом содержание глутатиона, активность глутатионредуктазы и глутатионтрансферазы не отличались достоверно от значений в печени интактных животных. Очевидно, на фоне действия бемитила глутатион не только активно включался в пероксидазные и трансферазные реакции по обезвреживанию перекиси водорода и липидных пероксидов, но и активно восстанавливался глутатионредуктазой.

Бемитил усиливает синтез преимущественно короткоживущих белков печени вследствие структурного сходства с пуриновыми основаниями нуклеиновых кислот [7]. Быстро обновляющиеся короткоживущие белки имеют решающее значение в адаптационных процессах [5]. Эффект бемитила, стабилизирующего при острой гипоксии глутатионовую систему, может быть обусловлен способностью препарата влиять на

Влияние острой гипоксии на показатели глутатионовой системы в печени крыс ($M \pm m$, $n = 8$)

Показатель	Группы животных	Печень
SH-группы, мкмоль/г	Интактные животные	5,39 ± 0,46
	Гипоксия	2,71 ± 0,07 ^a
	Бемитил + гипоксия	3,70 ± 0,23 ^{ab}
Восстановленный глутатион, мкмоль/г	Интактные животные	73,15 ± 2,56
	Гипоксия	60,06 ± 0,51 ^a
	Бемитил + гипоксия	75,46 ± 1,74 ^b
Глутатионредуктаза, нмоль НАДФН/мин · мг белка	Интактные животные	71,48 ± 1,45
	Гипоксия	63,06 ± 2,35 ^a
	Бемитил + гипоксия	70,40 ± 1,95 ^b
Глутатионтрансфераза, нмоль ХДНБ/мин · мг белка	Интактные животные	475,3 ± 18,4
	Гипоксия	464,2 ± 17,5
	Бемитил + гипоксия	481,6 ± 21,1
Глутатионпероксидаза, нмоль НАДФН/мин · мг белка	Интактные животные	12,33 ± 0,45
	Гипоксия	8,11 ± 0,33 ^a
	Бемитил + гипоксия	9,54 ± 0,36 ^{ab}

Примечание. Различия достоверные ($p < 0,05$): *a* — между группами интактных животных и перенесших острую гипоксию; *b* — перенесших острую гипоксию и защищенных бемитилом.

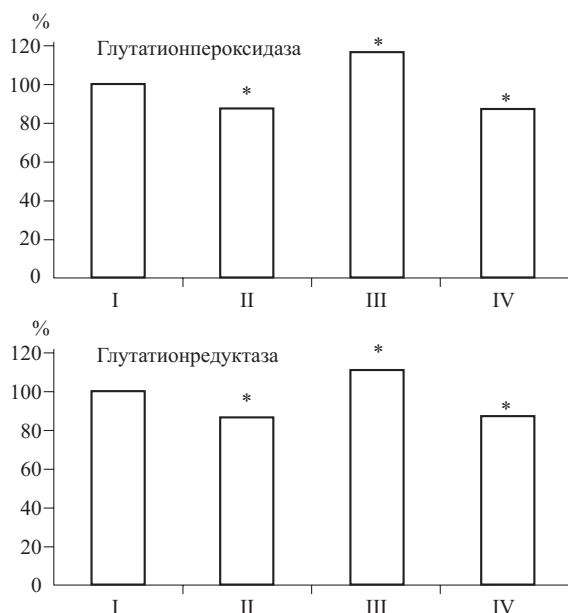
синтез антиоксидантных ферментов глутатионовой системы. Это предположение было проверено при изучении влияния бемитила на активность глутатионпероксидазы и глутатионредуктазы на фоне блокады синтеза белка актиномицином D.

Введение крысам актиномицина D при острой гипоксии сопровождалось снижением активности глутатионпероксидазы и глутатионредуктазы в печени (рисунок). Бемитил на фоне актиномицина D не оказывал защитного действия на глутатионовые ферменты. Активность глутатионпероксидазы и глутатионредуктазы в печени при сочетанном действии бемитила и актиномицина была ниже, чем в печени крыс, защищенных бемитилом при острой гипоксии и не отличалась достоверно от значений в группе животных, получавших актиномицин D. Следовательно, актиномицин D снимает позитивный модулирующий эффект бемитила на активность антиоксидантных ферментов глутатионовой системы. Этот факт позволяет утверждать, что защитный эффект бемитила при острой гипоксии может быть обусловлен его способностью усиливать синтез антиоксидантных ферментов глутатионовой системы.

Таким образом, предупреждение бемитилом угнетения антиоксидантной глутатионовой системы, участвующей в формировании неспецифической резистентности организма, может ускорять адаптацию организма к острой гипоксии.

ВЫВОДЫ

1. Острая гипоксическая гипоксия сопровождается снижением в печени содержания свободных SH-групп



Влияние бемитила на активность глутатионпероксидазы и глутатионредуктазы в печени крыс при острой гипоксии на фоне действия актиномицина D.

* — достоверные различия ($p < 0,05$) по сравнению с действием острой гипоксии. I — гипоксия, II — актиномицин D + гипоксия, III — бемитил + гипоксия, IV — актиномицин D + бемитил + гипоксия.

белков, восстановленного глутатиона, активности глутатионредуктазы, глутатионпероксидазы и не изменяет активность глутатионтрансферазы.

2. Введение бемитила до гипоксического эпизода стабилизирует глутатионовую систему: препарат препятствует снижению в печени содержания свободных SH-групп белков, восстановленного глутатиона, активности глутатионпероксидазы и глутатионредуктазы.

3. Антиоксидантное действие бемитила в печени при острой гипоксии обусловлено его способностью усиливать синтез ферментов глутатионовой системы,

т.к. ингибитор синтеза белка актиномицин D снимает позитивное модулирующее действие бемитила на активность этой системы.

ЛИТЕРАТУРА

1. М. В. Биленко, *Ишемические и реперфузионные повреждения органов*, Медицина, Москва (1989).
2. И. В. Веревкина, А. И. Точилкин, Н. А. Попова, *Современные методы в биохимии В. Н. Орехович. (ред.)*, Медицина, Москва (1977), сс. 223 – 228.
3. В. И. Кулинский, Л. С. Колесниченко, *Усп. современной биологии*, **110**, вып. 1(4), 20 – 33 (1990).
4. В. И. Кулинский, Л. С. Колесниченко, *Усп. современной биологии*, **113**, вып. 1, 107 – 122 (1990).
5. Ф. З. Меерсон, *Адаптация, стресс и профилактика*, Наука, Москва (1981).
6. Ф. Е. Путилина, *Методы биохимических исследований*, Ленинград (1982).
7. А. В. Смирнов, *Физиологически активные вещества*, Наукова Думка, Киев (1993), вып. 25, сс. 5 – 8.
8. А. В. Смирнов, И. В. Зарубина, Б. И. Криворучко, О. П. Миронова, *Экспер. и клин. фармакол.*, **62**(5), 59 – 62 (1999).
9. В. В. Соколовский, *Тиолдисульфидное соотношение крови как показатель состояния неспецифической резистентности организма*, Б. и., Санкт-Петербург (1996).
10. N. Alptekin, G. Mehmetcik, and M. Uysal, *Pharmacol. Res.*, **36**(3), 243 – 247 (1997).
11. W. H. Habig, M. J. Pabst, and N. B. Jackoby, *J. Biol. Chem.*, **249**(22), 7130 – 7139 (1974).
12. R. Hernandez-Munoz, M. Diaz-Munoz, V. Lopez, et. al., *Hepatology*, **26**(5), 1100 – 1110 (1997).
13. O. H. Lowry, N. Y. Rosebrough, A. L. Farr, and R. J. Randall, *J. Biol. Chem.*, **193**(1), 265 – 275 (1951).
14. H. Sies, A. L. Dafre, Y. Ji et. al., *Chem., Biol. Interact.*, **112**, 177 – 185 (1998).
15. C. A. Tyson, K. D. Zunan, and R. I. Stephens, *Arch. Env. Health.*, **37**(3), 167 – 176 (1982).
16. L. Zimniak, S. Awasthi, S. K. Srivastava, et. al., *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, **143**(1), 221 – 229 (1997).

Поступила 26.03.2001

THE EFFECT OF BEMITHYL ON THE GLUTATHIONE SYSTEM IN RAT LIVER UNDER ACUTE HYPOXIA CONDITIONS

I. V. Zarubina and O. P. Mironova

St. Petersburg State Military Medical Academy, ul. Lebedeva 6, St. Petersburg, 194044 Russia

The effect of bemithyl on the state of liver glutathione system was studied in rats under acute hypoxic hypoxia conditions modeled by “elevating” animals in a pressure chamber up to an altitude of 8000 – 11000 m for 30 min. Bemithyl (25 mg/kg, i.p.) administered 30 min before the hypoxia onset, prevents a decrease in the content of reduced glutathione and SH groups and impedes a drop in the activity of glutathione reductase and glutathione peroxidase. By means of the inhibition analysis using actinomycin D (a protein synthesis inhibitor), it was established that the protective action of bemithyl is related to the ability of enhancing the synthesis of antioxidant enzymes in the liver glutathione system.