

АЦИОНАЛЬНАЯ АКАДЕМИЯ НАУК БЕЛАРУСИ
ИНСТИТУТ БИОХИМИИ

УДК 577.121:612.04+612.015

Петушок Наталья Эдуардовна

ГЛУТАТИОНОВАЯ СИСТЕМА ПРИ ВОЗДЕЙСТВИИ ФЕНОЛА,
ФОРМАЛЬДЕГИДА и γ -ИЗЛУЧЕНИЯ. ВОЗМОЖНОСТИ КОРРЕКЦИИ
ВИТАМИНАМИ А, Е и ПАНТЕНОЛОМ

03. 00. 04 - биохимия

Автореферат диссертации
на соискание ученой степени кандидата биологических наук

ГРОДНО — 2000

Работа **выполнена в лаборатории экологической биохимии**
Института биохимии НАН Беларуси

Научный **руководитель** — доктор биологических наук,
старший научный сотрудник Требухина Р.В.

Официальные оппоненты:

доктор биологических наук, профессор Морозкина Т.С.

доктор биологических наук, старший научный сотрудник Буко В.У.

Оппонирующая организация - Институт радиобиологии Национальной
Академии наук Беларуси

Защита состоится 2000 г. в на заседании
совета по защите диссертаций [Д 01.30.01] в Институте биохимии НАНБ
[230017 г.Гродно, бульвар Ленинского комсомола, 50, тел. 33-32-11].

С диссертацией **можно ознакомиться** в библиотеке Института биохимии
НАН Беларуси.

Автореферат **разослан**

22 августа 2000 г.

Ученый секретарь
совета по защите диссертаций
кандидат биологических наук
старший научный сотрудник

4

Пронько П.С.

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы диссертации. Выживание человека и других видов животных в экологически неблагоприятных условиях зависит от ряда составляющих, но в первую очередь - от способности организма противостоять повреждающему действию экзогенных химических веществ и физических факторов внешней среды. На молекулярном уровне способность эта обусловлена высокоэффективными биохимическими системами: антиоксидантной и детоксикационной. Антиоксидантная система включает в себя ферментативные и неферментативные компоненты: супероксиддисмутазу, каталазу, глутатионпероксидазу, глутатионтрансферазу, глутатион, глутатионредуктазу, аскорбат, токоферолы, убихиноны и др. Эта система препятствует активации процессов свободнорадикального окисления, которые, как показали исследования [Blokhina O.B., 1998, Мелконян М.М. и соавт., 1986], представляют собой начальную неспецифическую реакцию на ряд воздействий. При неадекватной эффективности антиоксидантных систем возможно возникновение окислительного стресса, вызывающего нарушения структуры и функций липидов, белков, углеводов и ДНК [Halliwell B., 1991, 1994]. Детоксикационная система обеспечивает защиту живых организмов от действия специфических химических веществ. В нее входят оксигеназы, флавопротеиноксидоредуктазы, другие оксидазы и конъюгазы, включая глутатионтрансферазы. Глутатион и связанные с ним ферменты выполняют важную роль в защите организма как от активных форм кислорода, так и от чужеродных веществ. Поэтому изучение состояния метаболизма "тиолового щита" клетки при неблагоприятных воздействиях на организм является актуальной задачей современной биологии. Литературные данные о функционировании глутатионовой системы при неблагоприятных воздействиях окружающей среды разрозненны и фрагментарны [Naas-Jobelius M., 1992, Imazu K., 1992]. Доминирует информация, в которой способность химических веществ влиять на уровень восстановленного глутатиона в клетках используют как критерий в оценке их токсичности [Teil M.-J., 1993, McNutt T.L., 1993, Dalvi R., 1992]. Исследование изменений в состоянии глутатионовой системы при воздействии таких распространенных химических веществ, как формальдегид и фенол, а также ионизирующей радиации дает возможность получить сведения относительно закономерно-

Сокращения, принятые в тексте автореферата: GSH - восстановленный глутатион; ГР - глутатионредуктаза; ГПО - глутатионпероксидаза; ГТ - глутатионтрансфераза; TBARS - субстраты, реагирующие с тиобарбитуровой кислотой; ТБК - тиобарбитуровая кислота; АФК - активные формы кислорода; ПФП - пентозо-фосфатный путь; в/ж - внутривенно.

стей их влияния на организм. Это, в свою очередь, создает реальные предпосылки для метаболической коррекции, позволяющей минимизировать негативное влияние этих воздействий.

Связь работы с крупными научными программами, темами. Диссертация выполнена в рамках научно-исследовательской работы Института биохимии НАН Беларуси по теме: "Биохимическая оценка резистентности организма при совместном воздействии малых доз радиации и техногенных факторов. Разработка способов коррекции выявленных нарушений биологическими регуляторами" (№ гос. регистрации 19961024. Дата регистрации 19.06.1996 г.).

Цель и задачи исследования. Цель исследования - изучить состояние глутатионовой системы в крови и печени крыс при воздействии на организм γ -облучения, формальдегида, фенола и сочетания этих веществ, испытывать протекторные свойства индивидуального и комплексного применения витаминов Е, А и пантенола при указанных воздействиях.

Достижение поставленной цели предусматривало решение следующих задач:

1. Изучить изменения активности глутатионредуктазы, глутатионпероксидазы, глутатионтрансферазы, каталазы, содержания восстановленного глутатиона и тиобарбитурат-реактивных субстратов в крови и печени крыс после ингаляционного воздействия формальдегида.

2. Оценить влияние интоксикации фенолом на содержание восстановленного глутатиона и активность связанных с ним ферментов в крови и печени крыс.

3. Выявить особенности комбинированного действия фенола и формальдегида на состояние глутатионовой системы в крови и печени крыс.

4. Выяснить характер изменений активности глутатионзависимых ферментов, каталазы, содержания восстановленного глутатиона и тиобарбитурат-реактивных субстратов в крови и печени крыс в различные сроки после фракционированного γ -облучения.

5. Исследовать корригирующие возможности витаминов А, Е и предшественника пантотеновой кислоты пантенола при вышеназванных воздействиях.

Объекты предмет исследования. Объектами исследования являлись печень, кровь, эритроциты, плазма крови крыс. В качестве предмета исследования были выбраны активность ГР, ГПО, каталазы, ГТ, концентрация GSH и TBARS.

Рабочая гипотеза. Предполагается, что ингаляционное воздействие формальдегида, энтеральное введение фенола, комбинированное воздействие этих факторов, а также γ -облучение нарушают функционирование антиоксидантной и детоксицирующей систем организма, а профилактическое

применение витаминов А, Е и пантенола будет способствовать предотвращению нарушений.

Методология и методы проведенного исследования. Методологический подход заключался в моделировании ситуаций, имитирующих воздействие неблагоприятных факторов окружающей среды (химические вещества, ионизирующее излучение) на организм животных. При проведении исследований использовались спектрофотометрические, колориметрические статистические методы, измерения проводились на спектрофотометрах "Spekol 221" (Германия) и СФ-46 (СССР).

Научная новизна полученных результатов. Впервые проведена сравнительная оценка изменений функционирования глутатионовой системы в крови и печени крыс при индивидуальном воздействии формальдегида, фенола или ионизирующего излучения. Установлены основные закономерности воздействия этих факторов на ферментативное и неферментативное звенья антипероксидной системы. На основании полученных результатов сделан вывод о разных механизмах реализации токсического действия фенола и формальдегида. При интоксикации формальдегидом ведущими факторами поражения на молекулярном уровне являются прооксидантное и мембранотропное действие токсиканта. Отравление фенолом блокирует работу молекулярных систем, содержащих SH-группы.

Впервые выявлены временные особенности ответной реакции различных клеточных систем организма на фракционированное γ -облучение. Активация глутатионовой системы в эритроцитах отмечается в первые часы после лучевого воздействия, а в гепатоцитах аналогичные изменения наступают через 24 часа.

Принципиально новыми являются данные о состоянии глутатионовой системы при сочетанном воздействии фенола и формальдегида. Установлено явление усиления отрицательного действия агентов на глутатион-зависимые ферменты при одновременном нивелировании прооксидантных эффектов. Сделано предположение о молекулярных механизмах усиления канцерогенных эффектов формальдегида фенолом.

Впервые показана возможность метаболической коррекции нарушений функционирования системы глутатиона и связанных с ним ферментов предшественником пантотеновой кислоты пантенолом, а также сочетанным применением этого зубиотика с природными антиоксидантами (витаминами Е и А).

Практическая значимость полученных результатов. Полученные экспериментальные данные имеют приоритетное научно-практическое значение и могут быть использованы в научно-исследовательской практике. Они позволяют с новых позиций оценить роль и функциональное распределение клеточного фонда восстановленного глутатиона и являются основой для

направленной и обоснованной метаболической коррекции и профилактики возникающих нарушений. Результаты данного исследования служат научно-практическим обоснованием для оценки потенциального риска от воздействия комплекса факторов малой интенсивности, что необходимо учитывать при санитарно-гигиеническом нормировании.

Проведенные нами исследования протекторных свойств витаминов А, Е и предшественника пантотеновой кислоты пантенола при интоксикациях фенолом, формальдегидом (раздельно и в сочетании) и при фракционированном γ -облучении дают основание для расширения области применения этих зубиотиков. Испытанное сочетание витаминов Е, А и пантенола оказывает стимулирующее действие на глутатионовую систему. Результаты проведенной работы позволяют рекомендовать пантенол (индивидуально и в сочетании с витаминами Е и А) для дальнейшего экспериментального изучения и клинической апробации в качестве средства повышения неспецифической резистентности организма.

Основные положения диссертации, выносимые на защиту.

1. Глутатионовая система реагирует неоднотипно на воздействие фенола или формальдегида, что подразумевает наличие различных механизмов реализации токсического действия этих веществ.
2. Фракционированное γ -облучение вызывает фазные изменения состояния глутатионовой системы в исследуемых тканях. В крови активация глутатионовой системы наблюдается в ранние сроки после воздействия, в печени такие изменения происходят позднее.
3. Витамины Е, А и предшественник пантотеновой кислоты пантенол индивидуально и в сочетании обладают способностью корректировать изменения, возникающие в функционировании глутатионовой системы при воздействии фенола, формальдегида или ионизирующей радиации.

Личный вклад соискателя. В исследованиях по всем разделам диссертации автор принимал решающее участие. Оно заключалось в разработке методических подходов, организации и проведении экспериментальных исследований, статистической обработке полученных данных, обобщении и анализе результатов. Аналитический обзор литературы проведен автором самостоятельно. Весь фактический материал получен автором лично. Постановка задач, определение целей исследования и интерпретация полученных результатов проводилась совместно с научным руководителем д.б.н. Требухиной Р.В.

Апробация результатов диссертации. Материалы диссертации были представлены и обсуждены на: международном симпозиуме "Витамины и здоровье населения Беларуси и смежных регионов" (Гродно, 1995); втором симпозиуме гепатологов Беларуси "Актуальные вопросы гепатологии" (Гродно, 1996); XXXIII Международном конгрессе физиологов (Санкт-

Петербург, 1997); XXXIII съезде Польского биохимического общества (Краков, 1997); Республиканской конференции “Достижения и актуальные проблемы клинико-лабораторной диагностики” (Минск, 1997); Международной конференции “Малые дозы ионизирующей радиации: биологические эффекты и регуляторный контроль” (Севилья, Испания, 1997); Республиканской конференции “Фундаментальные и прикладные аспекты радиобиологии: биологические эффекты малых доз радиации” (Минск, 1998); 3-ем Международном Конгрессе по витаминам и биофакторам (Гослар, Германия, 1998); Международной конференции “Диагноз и лечение радиационного поражения” (Роттердам, Голландия, 1998); третьем симпозиуме гепатологов Беларуси “Актуальные вопросы гепатологии” (Гродно, 1998); Конференции общества по исследованию свободных радикалов (Гранада, Испания, 1998); Конференции “Актуальные вопросы обмена веществ” (Вильнюс, Литва, 1999).

Опубликованность результатов. По теме диссертации опубликовано 18 работ: из них 4 статьи в научных журналах, 4 статьи в сборниках, 7 тезисов докладов на международных конференциях и симпозиумах и 3 - на республиканских. Общее количество страниц опубликованных материалов – 47.

Структура и объем диссертации. Работа изложена на 107 страницах компьютерного набора, содержит 8 таблиц и 8 рисунков. Диссертация состоит из введения, обзора литературы, 4 глав собственных исследований, заключения и списка цитируемой литературы, включающего 146 русских и 130 иностранных источников.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Исследования выполнены на 216 белых беспородных крысах-самках массой 140-160 г. Каждая опытная группа состояла из 36 животных.

Ингаляционные затравки проводили в специальных камерах, куда вместе с воздухом поступал формальдегид в концентрации 10 мг/м^3 , ежедневно по 7 часов дневного времени в течение 5 дней (суммарная экспозиция 35 ч). Раствор фенола вводили внутривентрикулярно в объеме 0.5 мл в дозе 10 мг/кг массы тела в течение 5 дней. Комплексное воздействие фенола и формальдегида моделировали следующим образом: в течение 5 дней крысам внутривентрикулярно вводили фенол в дозе 10 мг/кг массы тела, затем животные помещались в камеру и подвергались ингаляционной затравке формальдегидом в течение 7 часов в концентрации 10 мг/м^3 .

Облучение животных проводили трехкратно в дозе по 0.25 Гр с интервалом в одну неделю на установке “АГАТ-С”, мощность дозы 0.0106296 Гр/сек . Суммарная поглощенная доза составила 0.75 Гр.

Состояние антиоксидантной системы оценивали определением активности ГПО [Кругликова А.Л., Штутман Ц.М., 1976], ГР [Хотимченко С.А. и соавт., 1987], концентрации GSH [Sedlak J., Lindsay R.H., 1968]. В плазме крови исследовали активность ГТ [Habig W. et al., 1974 в модификации Liu Y.H. et al., 1994] и каталазы [Королюк М.А. и соавт., 1988]. Для оценки интенсивности процессов ПОЛ измеряли содержание ТБК-реагирующих субстратов в эритроцитах [Stoks S., Dormandy T., 1971] и гомогенатах печени [Placer Z.A. et al., 1966]. Концентрацию белка в гомогенатах печени определяли по методу Lowry [Lowry O. et al., 1951], в плазме - спектрофотометрически [Кочегов Г.А., 1980].

В экспериментах по метаболической коррекции подопытным животным внутрижелудочно вводили следующие препараты: витамин Е (α -токоферола ацетат) в виде масляного раствора в дозе 0,1 мг/г массы тела в объеме 0,2 мл; витамин А (ретинола ацетат) в виде масляного раствора в дозе 0,002 мг/г массы тела в объеме 0,2 мл; D-пантенол (Hoffmann, La-Roshe, Швейцария), водный раствор в дозе 0,026 мг/г массы тела в объеме 0,5 мл.

Результаты исследований проанализированы методом вариационной статистики с использованием t-критерия Стьюдента и методом достоверности сравниваемых величин [Рокицкий П.Ф., 1973].

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Влияние паров формальдегида на функционирование глутатионовой системы в крови и печени крыс

Наши исследования показали, что 35-часовая ингаляционная заправка формальдегидом в концентрации 10 мг/м³ не вызывает изменений в функционировании глутатионовой системы в крови. В печени наблюдалось увеличение концентрации GSH и активности ГР на 26 и 32% соответственно (табл. 1). Однако при этом происходит интенсификация процессов ПОЛ, о чем свидетельствует возрастание содержания ТБК-реактивных продуктов на 31% в эритроцитах и на 39% в печени. Активность каталазы достоверно повышается в плазме крови и в печени экспериментальных животных. Такое изменение в печени, на наш взгляд, можно трактовать как благоприятное, так как каталаза не только обезвреживает H₂O₂, но и может катализировать реакцию превращения образующегося при окислении формальдегида формиата в угольную кислоту [Гиунов Л.А., 1981]. Повышение же активности этого внутриклеточного фермента в плазме крови позволяет с большой степенью уверенности утверждать, что под действием формальдегида идет нарушение целостности клеточных мембран.

Таблица 1

Влияние паров формальдегида (10 мг/м³, 35 часов) на активность ГР, ГПО, ГТ, каталазы и концентрацию GSH и ТБК-реактивных продуктов в крови и печени крыс. (M ± T; n=6; * - p<0.05)

Показатели	Контроль	Формальдегид
Кровь		
GSH, мкмоль/мл эритроцитов	1.97±0.11	2.22±0.05
ГР, нмоль/мин/г Пб	4.64±0.42	4.74±0.88
ГПО, нмоль/мин/г Нб	297.5±31.3	354.9±38.6
ГТ, мкмоль/мин/г белка	35.74±2.33	35.21±4.51
Каталаза, мкмоль/мин/г белка	2.19±0.19	3.02±0.21*
TBARS нмоль/мл эритроцитов	16.42±1.47	21.51±1.11*
Печень		
GSH, мкмоль/г ткани	6.81 ±0.43	8.59±0.33*
ГР, нмоль/мин/г белка	66.08±2.38	87.38±2.93*
ГПО, нмоль/мин/г белка	347.3±20.0	342.0±54.7
Каталаза, мкмоль/мин/г белка	471.7±20.7	972.7±74.1*
TBARS, нмоль/г ткани	36.48±1.79	50.80±3.51*

Еще одним фактом, косвенно подтверждающим наше предположение являются данные о снижении числа эритроцитов, полученные в этом же эксперименте [Требухина Р.В. и соавт., 1999]. Отсутствие изменений активности ГР и ГПО указывает на то, что интенсивность работы антиперекисного компонента глутатионовой системы не увеличивается. Следовательно, в данном случае идет преимущественное расходование GSH в детоксикационных процессах. И следствием этого могло стать усиление процессов ПОЛ в крови. В печени интенсифицировалась регенерация GSH глутатионредуктазой. Активность ГПО не изменялась, а значит, вклад глутатионпероксидазной реакции в образование окисленного глутатиона не увеличивался. GSSG мог образовываться неферментативно в результате взаимодействия GSH непосредственно со свободными радикалами или в ходе дисульфидредуктазного восстановления SH-групп белков. Известно, что на воздействия, первично снижающие уровень GSH, клетка отвечает его сверхпродукцией [Кулинский В.И., Колесниченко Л.С., 1990].

Характер и степень наблюдаемых изменений позволяет предположить, что в данном случае наблюдается фаза первичных биохимических ре-

акций, протекающих в период метаболической адаптации организма к воздействию ксенобиотика. Она осуществляется посредством активации систем поддержания гомеостаза (прежде всего систем антиоксидантной защиты) и направлена на обезвреживание генерируемых АФК, а также на поддержание необходимого уровня GSH, усиленно расходуемого при осуществлении защитных реакций.

Состояние глутатионовой системы в крови и печени крыс после интоксикации фенолом

Энтеральное введение фенола в дозе 10 мг/кг в течение 5 дней практически не повлияло на изучаемые нами показатели в крови, но самым существенным образом отразилось на функционировании глутатионовой системы в печени (табл. 2). В этой ткани отмечено снижение активности ГПО на 55%, концентрации GSH на 44%, активность ГР возросла на 41%. Интоксикация фенолом не вызывает активации ПОЛ ни в печени, ни в эритроцитах. Возможно, причиной этого феномена являются свойства самого фено-

Таблица 2

Влияние фенола (в/ж, 10 мг/кг, 5 дней) на активность ГР, ГПО, ГТ, каталазы и концентрацию GSH и ТБК-реактивных продуктов в крови и печени крыс. ($M \pm T$; $n=6$; * - $p<0.05$)

Показатели	Контроль	Фенол
Кровь		
GSH, мкмоль/мл эритроцитов	1.96 ± 0.07	1.98 ± 0.10
ГР, нмоль/мин/г Нб	4.44 ± 0.55	4.74 ± 0.57
гпо, нмоль/мин/г нб	600.2 ± 47.2	557.8 ± 53.1
ГТ, мколь/мин/г белка	58.44 ± 7.48	$35.09 \pm 2.31^*$
Каталаза, мколь/мин/г белка	2.60 ± 0.31	2.58 ± 0.14
ТВАРС нмоль/мл эритроцитов	18.48 ± 1.19	15.34 ± 0.95
Печень		
GSH, мкмоль/г ткани	7.32 ± 0.42	$4.09 \pm 0.58^*$
ГР, нмоль/мин/г белка	62.15 ± 3.33	$87.45 \pm 5.12^*$
ГПО, нмоль/мин/г белка	285.5 ± 19.0	$129.4 \pm 13.9^*$
Каталаза, мкмоль/мин/г белка	410.7 ± 23.3	$800.0 \pm 32.4^*$
ТВАРС, нмоль/г ткани	35.97 ± 1.56	32.02 ± 1.67

ла, поскольку известно, что соединения фенольной природы оказывают антиоксидантное действие [Duthie G.G., 1998]. Интоксикация фенолом ведет к снижению активности ГПО в клетках печени. И в данной ткани можно наблюдать, как функциональная недостаточность одного из компонентов антаперексной системы компенсируется активацией другого: на фоне снижения активности ГПО, утилизирующей H_2O_2 , происходит возрастание активности каталазы, также способной выполнять эту функцию.

Общепризнано, что уменьшение концентрации GSH является одним из важнейших последствий токсических воздействий. В наших исследованиях мы установили, что отравление фенолом ведет к значительному снижению содержания GSH в печени. Специфичность деструктивного эффекта фенола на сульфгидрильные соединения подтверждается и фактом снижения активности алкоголь- и альдегиддегидрогеназы в легочной ткани этих животных [Баньковский А.А. и соавт., 1999], так как в активных центрах этих ферментов тоже содержатся SH-группы [Торчинский Ю.М., 1977]. Уменьшение концентрации GSH, в свою очередь, по принципу обратной связи, вероятно, стимулирует активность ГР.

Таким образом, результаты наших исследований и данные других авторов [Мажуга И.М., 1992; Smart R.C., Zannoni V.G., 1985] позволяют предположить, что основным механизмом поражения при интоксикации фенолом является блокирование сульфгидрильных групп.

Совместное действие фенола и формальдегида на глутатионовую систему в крови и печени крыс

Эксперименты по изучению совместного действия фенола (10 мг/кг, 5 дней), поступающего в организм через желудочно-кишечный тракт, и вдыхаемых паров формальдегида (10 мг/м³, 7 часов в день, 5 дней) показали следующее. При комбинированном воздействии не наблюдается ни увеличения активности каталазы в плазме крови, ни повышения уровня ТБК-реагирующих субстратов в эритроцитах, как это происходило при ингаляции формальдегида. То есть, согласно нашим данным, фенол нейтрализует мембранотропное и прооксидантное действие формальдегида на эритроцитарные мембраны. Однако при этом активность ГР в крови снижена на 25% (Рис. 1). Такое изменение зафиксировано лишь при совместном действии токсикантов. Таким образом, в данном случае налицо эффект усиления токсического действия. В результате эпидемиологических исследований установлено, что фенол усиливает канцерогенное действие формальдегида [Blair A. et al., 1990, Marsh G.M. et al. 1992]. Наши результаты позволяют нам сделать некоторые предположения о механизмах такого действия. Недавно установлено, что GSH защищает топоизомеразу - фермент, участву-

• ГТ ■ GSH • ГР ■ ГПО ■ Каталаза ■ TBARS

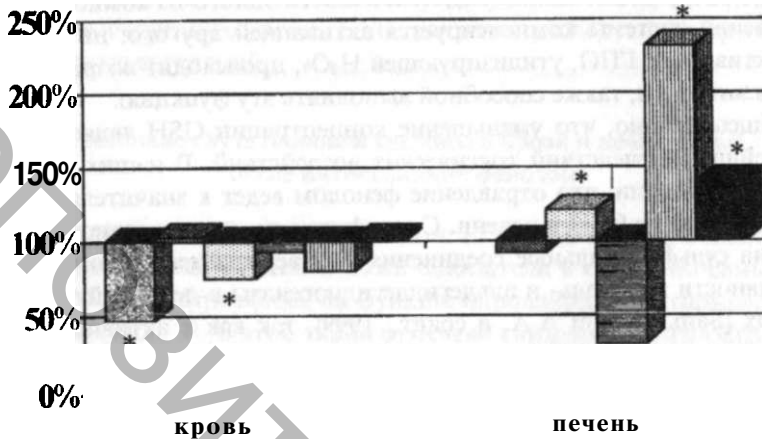


Рис. 1. Некоторые показатели глутатионовой системы, активность каталазы и содержание ТБК-реактивных субстратов в крови и печени крыс после комбинированного действия фенола и формальдегида. * – статистически достоверные изменения при $p < 0.05$.

ющий в процессе репликации ДНК [Chen H., Eastmond D.A., 1995]. А при совместном действии фенола и формальдегида снижается активность ГР, что в конечном итоге может вести к снижению уровня GSH. Кроме этого, фенол при индивидуальном воздействии способствует истощению пула восстановленного глутатиона в печени, а в сочетании с формальдегидом – оказывает сдерживающее влияние на концентрацию GSH. Это, возможно, в определенной степени нарушает протекание процессов репликации и репарации ДНК, что в результате вызывает кластогенные и канцерогенные эффекты [Emerit I., 1994, 1999]. Эти факты заслуживают особого внимания и дальнейшего детального изучения.

В печени экспериментальных животных при комбинированной интоксикации фенолом и формальдегидом активность ГПО угнетена на 68%, активность каталазы и ГР при этом увеличена на 132 и 21% соответственно. Концентрация ТБК-реагирующих субстратов на 40% превышает контрольные значения. Функциональная недостаточность антиоксидантных механизмов, вероятно, является причиной активации процессов ПОЛ, которую мы наблюдаем в данной ткани. Направленность изменений не отличается

от таковой при воздействии монофакторов. В угнетение активности ГПО в гепатоцитах основной вклад, по нашему мнению, вносит воздействие фенола, а вот интенсификацию ПОЛ, очевидно, вызывает формальдегид. Комплекс выявленных изменений свидетельствует об особенностях протекания комбинированной интоксикации фенолом и формальдегидом, характеризующейся снижением адаптационных способностей клеток и организма в целом, что может привести к срыву биохимических процессов адаптации и привыкания.

Глутатионовая система в крови и печени крыс после фракционированного γ -облучения

В ранние сроки после фракционированного γ -облучения (3 сеанса по 0.25 Гр) в крови животных активируется глутатионовый редокс-цикл. При этом концентрация GSH уже через час повышается на 21%, а активность ГР - на 32%, к исходу первых суток активность ГПО возрастает на 55%. В более поздние сроки данные показатели, за исключением ГР, от контроля достоверно не отличаются. Активность ГР к последнему сроку наблюдения снижается на 67%. Такого рода изменения, вероятно, могут быть одним из механизмов, обеспечивающих отсутствие активации ПОЛ на начальном этапе нашего исследования. Важно отметить, что интенсификация свободно-радикальных процессов в крови (концентрация ТБК-реагирующих субстратов повышена на 46%) наблюдалась через неделю после заключительного сеанса облучения, когда потенциал антиокислительного компонента глутатионовой системы снижался до уровня контрольных значений.

Метаболический "ответ" защитных систем в печени носил несколько иной характер. В ближайшие сроки (1 час) после облучения концентрация GSH и активность каталазы в гепатоцитах практически не изменялись, активность ГР и ГПО была существенно угнетена (на 37 и 70% соответственно). Возрастание этих показателей отмечено лишь через сутки, далее активность ГПО остается стабильно повышенной, активность ГР снижается, а затем вновь возрастает. Достоверный рост активности каталазы зафиксирован лишь к концу четвертой недели после прекращения лучевых нагрузок. Первоначальное угнетение либо отсутствие роста активности антиоксидантной системы, вероятно, стало одной из причин активации ПОЛ в печени. Уровень ТБК-реагирующих субстратов был повышен в течение первых суток после облучения, спустя неделю он снижался, а через 4 недели вновь возрастал.

Таким образом, при изучении действия фракционированного γ -облучения на глутатионовую систему в крови и печени выявлено, что изменения носят фазный характер, то есть периоды возрастания активности че-

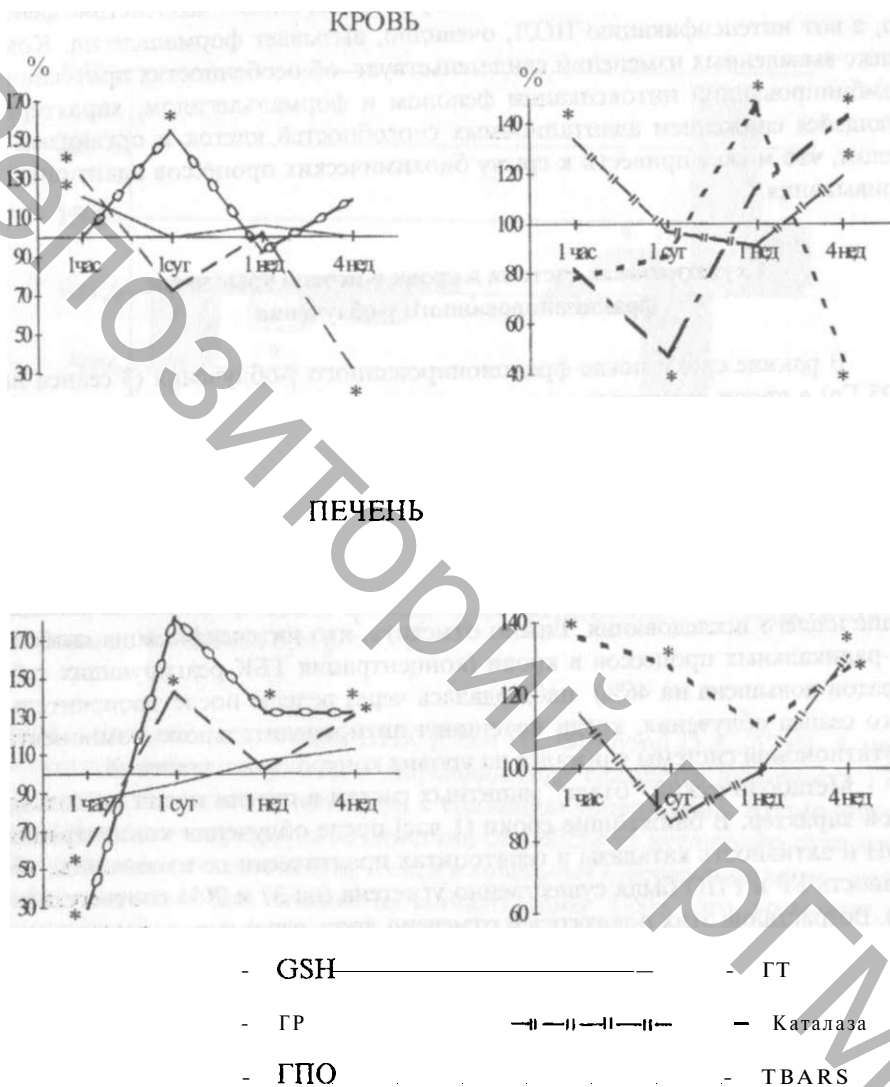


Рис. 2. Некоторые показатели состояния глутатионовой системы в крови и печени крыс после фракционированного облучения в суммарной дозе 0.75 Гр. По оси ординат - изменение показателя в % к контролю, по оси абсцисс - время после облучения; * - достоверные изменения при $p < 0.05$

редуются с периодами угнетения. Следует отметить, что в изучаемый период времени наблюдаются отличия ответной реакции различных клеточных систем организма на фракционированное γ -облучение: активация глутатионовой системы в эритроцитах отмечается в первые часы после лучевого воздействия, а в гепатоцитах аналогичные изменения наступают лишь через 24 часа.

Наблюдаемые нами эффекты чрезвычайно схожи с изменениями в активности антиоксидантной системы, имеющимися после острого и хронического облучения в малых дозах [Волыхина В.Е., 1997]. Рядом авторов такие колебания рассматриваются с позиций фаз развития стресс-синдрома [Айрапетянц М.Т., Гуляева Н.В., 1988]. Радиационно обусловленные изменения, происходящие в системах адаптации, с одной стороны, позволяют организму скорректировать ранние ответы на воздействие ионизирующих излучений, а с другой, прогрессируя в течение длительного времени, нарушают динамическое соотношение адаптационно-компенсаторных и деструктивных процессов и формируют основу для "регуляторной патологии" [Алесина М.Ю., 1999].

Возможности метаболической коррекции

Для изучения возможности коррекции возникающих нарушений животным перед каждой 7-часовой заправкой формальдегидом, перед каждым введением фенола, а также перед их совместным воздействием внутрижелудочно вводили витамин А (0.002 мг/г), витамин Е (0.1 мг/г), D-пантенол (0.026 мг/г) индивидуально или в сочетании. Для исследования протекторного действия данных веществ при фракционированной лучевой нагрузке их вводили за 2 и 1 сутки перед каждым сеансом облучения.

Результаты наших экспериментов показали, что витамины Е, А, предшественник пантотеновой кислоты пантенол, а также сочетание этих веществ обладают выраженными антиокислительными свойствами. Профилактическое введение вышеназванных веществ препятствовало интенсификации ПОЛ, которая имела место в печени животных при ингаляционной заправке формальдегидом, при совместном действии формальдегида с фенолом и при облучении экспериментальных животных. Эти свойства витаминов Е и А широко освещены в литературе [Спиричев В.Б., Конь И.Я., 1989, Галкина С.И., 1984, Goodman D., 1982]. Обращает на себя внимание одна особенность действия исследуемых препаратов. Она заключается в том, что замедление интенсивности процессов ПОЛ происходит лишь в той ткани, где первоначально липопероксидация была усилена. Такую закономерность мы наблюдали в печени. На липопероксидацию в эритроцитах витамины и пантенол влияют слабее. В печени введение витаминов и пан-

тенола препятствуют повышению активности каталазы. Этот факт также может свидетельствовать об антиоксидантных свойствах данных веществ. Индивидуальное введение витаминов Е, А или пантенола оказывает мембранопротекторное действие. Такое заключение мы сделали, основываясь на данных об уменьшении активности каталазы в плазме крови. И если в отношении действия витаминов А и Е наши результаты лишь служат подтверждением уже давно известных фактов [Деев А.И., 1978, Бурлакова Е.Б., 1985], то по пантенолу таких данных практически нет.

Во всех вариантах опытов отчетливо прослеживалась общая закономерность, заключающаяся в увеличении активности каталазы и ГТ в плазме крови после применения композиции, состоящей из витаминов А, Е и пантенола. Такие изменения могут быть признаком нарушения целостности мембран. Возможно, здесь сказывается избыток антиоксидантов, и это надо учитывать при подборе дозировок витаминов при их совместном введении.

Обращают на себя внимание данные о снижении активности ГР в крови после введения витаминов и пантенола. В печеночной ткани активность ГР, повышенная при воздействии неблагоприятного фактора, после проведения метаболической коррекции снижается до контрольных значений. Для объяснения полученных результатов можно предположить, что испытанные зубиотики влияют либо на концентрацию окисленного глутатаона, либо на работу ПФП. Причем наиболее вероятно, что каждое из веществ имеет собственный и весьма специфичный механизм действия. В частности, витамины Е и А, реализуя свои антирадикальные свойства, могут уменьшать расходование GSH в качестве неферментативного антиоксиданта, и, следовательно, снизить концентрацию GSSG.

Профилактическая эффективность пантенола, возможно, обусловлена его стимулирующим действием на биосинтез кофермента А и соответствующих КоА-зависимых реакций. В частности, к таковым относятся N-ацетилирование или глициновая конъюгация [Parke D.V., 1973, Ковлер М.А., 1998]. Кроме этого, увеличение внутриклеточного содержания КоА-соединения, имеющего в своем составе SH-группу, отражается на обмене других сульфгидрильных соединений в клетке. Результаты, полученные нами, показывают, что профилактическое назначение животным пантенола индивидуально или в сочетании с витаминами А и Е ведет к повышению концентрации GSH в эритроцитах и в печени. В частности, введение пантенола облучаемым животным вело к повышению концентрации GSH в эритроцитах до 3.18 ± 0.10 мкмоль/мл (контроль 2.77 ± 0.11 мкмоль/мл), комбинированное применение пантенола с витаминами А и Е способствовало повышению содержания GSH до 3.25 ± 0.10 мкмоль/мл (контроль 2.77 ± 0.11 мкмоль/мл) в эритроцитах и до 9.23 ± 0.22 мкмоль/г (контроль 6.71 ± 0.42 мкмоль/г) в клетках печени.

Таким образом, полученные нами результаты свидетельствуют о возможности и целесообразности использования витаминов А, Е и пантенола для метаболической коррекции нарушений, возникающих при интоксикациях формальдегидом и фенолом, а также при воздействии на организм у-излучения.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

1. Воздействие формальдегида в концентрации 10 мг/м^3 в течение 35 часов вызывает повышение концентрации восстановленного глутатиона и активности глутатионредуктазы в печени крыс на фоне усиления липопероксидации в печени и эритроцитах [5; 9; 14].
2. Интоксикация фенолом (в/ж) в дозе, равной $1/10$ от LD_{50} ведет к снижению концентрации восстановленного глутатиона и уменьшению активности глутатионпероксидазы в печени, при одновременном повышении активности глутатионредуктазы и каталазы в данной ткани [5; 12; 14].
3. Комбинированное действие фенола (10 мг/кг , пятикратно) и формальдегида (10 мг/м^3 , 35 часов) угнетает в крови процесс регенерации восстановленного глутатиона из его окисленной формы [11; 15].
4. Фракционированное γ -облучение в суммарной дозе $0,75 \text{ Гр}$ сопровождается активацией глутатионовой системы в крови в ранние сроки после воздействия, при этом активации перекисного окисления липидов не наблюдается. Понижение активности глутатионовой системы и усиление липонпероксидации в крови отмечены спустя неделю после воздействия [2; 7; 13; 16].
5. В печени крыс, подвергнутых фракционированному γ -облучению в суммарной дозе $0,75 \text{ Гр}$, первоначальное угнетение глутатионовой системы сменяется ее активацией. Эти изменения происходят на фоне интенсификации перекисного окисления липидов [7; 9; 17].
6. Индивидуальное введение витаминов Е ($0,1 \text{ мг/г}$), А ($0,002 \text{ мг/г}$), предшественника пантотеновой кислоты пантенола ($0,026 \text{ мг/г}$) перед воздействием формальдегида, фенола или ионизирующей радиации способствует уменьшению интенсивности процессов перекисного окисления липидов. Витамин А и пантенол предотвращают снижение уровня восстановленного глутатиона, происходящее в печени при интоксикации фенолом, и уменьшение активности глутатионпероксидазы при совместном действии фенола и формальдегида [3; 8; 10].
7. Сочетанное введение витаминов Е, А и пантенола перед воздействием ионизирующей радиации ведет к возрастанию концентрации восстанов-

ленного глутатиона в эритроцитах и печени, снижает интенсивность процессов перекисного окисления липидов в печени.

Профилактическое назначение этих веществ при интоксикации формальдегидом, фенолом или при их сочетанном воздействии предотвращает развитие нарушений в функционировании глутатионовой системы и ведет к ослаблению интенсивности липопероксидации в печени [6].

СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

Статьи

1. Галіцкі Э., Петушок Н., Заводнік І. Узровень малонавага дыальдэгіду і адноўленага глутатыну ў тканках пацукоў пасля ўвядзення ^{137}Cs і ^{131}I // Весці АН Беларусі, сер. біялагічных навук. - 1996, № 4. - С. 84 - 86.
2. Petushok N., Trebukhina R. State of the glutathione system at different periods after irradiation // Proceedings of Int. Conf. "Low doses of ionizing radiation: biological effects and regulatory control", Seville, Spain 1997. - ref. IAEA-CN-67/109.
3. Требухина Р.В., Петушок В.Г., Петушок Н.Э., Лашак Л.К., Леднева И.О., Баньковский А.А., Ельчанинова М.А. Пантенол как фактор снижения отрицательных последствий действия малых доз радиации // Пантенол и другие производные пантотеновой кислоты. Биохимия, фармакология и медицинское применение. - Гродно, 1998. - С. 202 - 207.
4. Galitsky E., Petushok N., Mandrik K., Zavodnik I., Gurinovich V. Oxidative processes in tissues of rats after internal irradiation by ^{137}Cs ^{131}I // Current topics in biophysics. - 1998. - Vol. 22, - P. 73 - 75.
5. Petushok N. Function of the glutathione-dependent system in rat tissues under the effects of chemical toxicants // Aktualus med/iagu apukaitos klausimai. Vilnius, 1999. - P. 455 - 457.
6. Петушок Н. Возможности применения витаминов А, Е и пантенола при интоксикации формальдегидом // Биологическая активность и транспорт лекарственных веществ. Гродно, 1999. - С. 122 - 128.
7. Петушок Н. Э., Лашак Л.К., Требухина Р.В. Состояние глутатионовой системы крови, мозга и печени белых крыс после хронического облучения // Весці НАН Беларусі, сер. біялагічных навук. - 1999. - № 3. - С. 93 - 95.
8. Slyshenkov V., Omelyanchik S., Moiseenok A., Petushok N., Wojtczak L. Protection by pantothenol and β -carotene against liver damage produced by low-dose γ -radiation // Acta Biochimica Polonica. - 1999. - Vol. 46, No. 2. - P.239 - 248.

Тезисы

1. Петушок Н. Э., Требухина Р.В. Содержание восстановленного глутатиона и активность глутатионредуктазы в печени крыс при воздействии низких доз радиации и ингаляционной интоксикации организма // Актуальные вопросы гепатологии. Тез. докл. - Гродно, 1994. - С. 33.
2. Петушок Н.Э., Овчинников В.Л. Восстановленный глутатион и активность глутатионредуктазы в тканях облученных животных и защитное действие витамина А // Витамины и здоровье населения Беларуси и смежных регионов: Тез. докл. симп. - Гродно, 1996. - С. 31.
3. Петушок Н.Э. Обмен глутатиона в гепатоцитах крыс при комбинированном воздействии неблагоприятных факторов // Актуальные вопросы гепатологии: Тез. докл. - Гродно, 1996. - С. 71.
4. Petushok N., Trebukhina R. Effect of some unfavorable factors on the content of reduced glutathione // XXXIII Intern. Congress of physiological sciences. St. Petersburg, 1997. Book of abstracts. - P. 041.03.
5. Петушок Н., Лашак Л., Омелянчик С., Требухина Р. Роль глюкозо-6-фосфат дегидрогеназы и восстановленного глутатиона в поддержании стабильности эритроцитарных мембран облученных животных // Достижения и актуальные проблемы клинко-лабораторной даагностки. Минск, 1997. - С. 78.
6. Петушок Н.Э. Влияние фенола, метанола и формальдегида на активность ферментов метаболизма глутатиона в печени крыс // Актуальные вопросы гепатологии: Тез. докладов 3-го симпозиума гепатологов Беларуси. - Гродно, 1998. - С. 43.
7. Петушок Н. Э., Лашак Л.К., Требухина Р.В. Влияние радиозкологической обстановки на обмен глутатиона в организме животных // Фундаментальные и прикладные аспекты радиобиологии: биологические эффекты малых доз радиации и радиоактивное загрязнение среды. Тез. докладов. Минск, 1998. - С. 194.
8. Petushok N., Trebukhina R., Petushok V., Lashak L., Gurinovich V. Thiol homeostasis and Immune function after low doses radiation // 3- rd Intern. Congress on Vitamins and Related Biofactors. Germany, 1998. - P. 59.
9. Petushok N., Lashak L., Petushok V., Galitsky E. Activity of pentosephosphate cycle and glutathione metabolism in rats' tissues after radioactive exposure // Diagnosis and Treatment of Radiation injury. De Doelen Rotterdam, 1998. Poster Session II, topic 9.
10. Trebukhina R., Petushok N., Petushok V., Lashak L., Gurinovich V. Influence on ionizing radiation and formaldehyde on the brain cells metabolism // Winter Meeting 1998 of the Society for Free Radical Reseach (European Region). Granada, Spain, 1998. - P. 315.

РЭЗІЮМ

Пегушок Наталля Эдуардаўна

Стан глутатыенавай сістэмы пры ўздзеянні фармальдэгіду, фенолу і у-выпраменьвання. Магчымасці карэкцыі вітамінамі А, Е і пантэнолам

Ключавыя словы: фармальдэгід, фенол. фракцыянаванае у-выпраменьванне, глутатыен, глутатыенрэдуктаза, глутатыенпераксідаза, вітамін Е, вітамін А, пантэнол.

Аб'ект даследавання: печань, кроў, эрытрацыты, плазма крыві пацукоў.

Прадмет даследавання: актыўнасць глутатыенрэдуктазы, глутатыенпераксідазы, глутатыентрансферазы, каталазы, канцэнтрацыя адноўленага глутатыену і тыябарбітурат-рэагуючых рэчываў.

Мэта працы: вывучэнне стану глутатыенавай сістэмы ў крыві і печані пацукоў пры ўздзеянні на арганізм у-выпраменьвання, фармальдэгіду, фенолу і спалучэння гэтых рэчываў, а таксама выпрабаванне пратэктарных уласцівасцяў індывідуальнага і комплекснага ўжывання вітамінаў Е, А і пантэнола пры названых уздзеяннях.

Метады даследавання: біяхімічныя, статыстычныя.

Атрыманыя вынікі і іх навізна: упершыню праведзена комплексная ацэнка функцыянавання глутатыенавай сістэмы пры дзеянні фармальдэгіду, фенолу альбо у-выпраменьвання. Устаноўлена, што пры інтаксікацыі фармальдэгідам асноўным фактарам пашкоджання на малекулярным ўзроўні з'яўляецца прааксідантнае і мембранатропнае дзеянне таксіканта. Атручэнне фенолам блакуе працу малекулярных сістэм, утрымліваючых SH-групы. Выяўлены часавыя асаблівасці рэагавання глутатыенавай сістэмы ў крыві і печані на фракцыянаванае у-апраменьванне. Упершыню вывучаны ўплыў сумеснага дзеяння фенолу і фармальдэгіду на глутатыенавую сістэму. Вызначана з'ява пасілення адмоўнага ўздзеяння агентаў пры адначасовым нівеліраванні прааксідантных эфектаў. Успешна паказана магчымасць метабалічнай карэкцыі парушэнняў функцыянавання сістэмы глутатыену і звязаных з ім ферментаў папярэднікам пентатэнавай кіслаты пантэнолам, а таксама спалучаным выкарыстаннем гэтага зубіетыка з прыроднымі антыаксідантамі (вітамінамі Е і А).

Рэкамендацыі па выкарыстанню: атрыманыя даныя могуць быць выкарыстаны для распрацоўкі метадаў прафілактыкі і лячэння таксічных і прамяневых пашкоджанняў арганізма.

Галіна выкарыстання: біяхімія. медыцына.

РЕЗЮМЕ

Петушок Наталья Эдуардовна.

Состояние глутатионовой системы при воздействии формальдегида, фенола и γ -излучения. Возможности коррекции витаминами А, Е и пантенолом

Ключевые слова: формальдегид, фенол, фракционированное γ -облучение, глутатион, глутатионредуктаза, глутатионпероксидаза, витамин Е, витамин А, пантенол.

Объект исследования: печень, кровь, эритроциты, плазма крови крыс.

Предмет исследования: активность глутатионредуктазы, глутатионпероксидазы, глутатионтрансферазы, каталазы, концентрация восстановленного глутатиона и тиобарбитурат-реагирующих веществ.

Цель работы: изучение состояния глутатионовой системы в крови и печени крыс при воздействии на организм γ -облучения, формальдегида, фенола и сочетания этих веществ, а также испытание протекторных свойств индивидуального и комплексного применения витаминов Е, А и пантенола при указанных воздействиях.

Методы исследования: биохимические, статистические.

Полученные результаты и их новизна. Проведена комплексная оценка функционирования глутатионовой системы в крови и печени крыс при действии формальдегида, фенола или γ -излучения. Установлено, что при интоксикации формальдегидом ведущими факторами поражения на молекулярном уровне являются прооксидантное и мембранотропное действие токсиканта. Отравление фенолом блокирует системы, содержащие SH-группы. Выявлены временные особенности реакции глутатионовой системы в крови и печени на фракционированное γ -облучение. Впервые изучено влияние совместного действия фенола и формальдегида на глутатионовую систему. Установлено явление усиления отрицательного действия агентов на глутатионзависимые ферменты при одновременном нивелировании прооксидантных эффектов. Впервые показана возможность метаболической коррекции нарушений функционирования системы глутатиона и связанных с ней ферментов предшественником пантотеновой кислоты пантенолом, а также сочетанным применением этого зубиотика с природными антиоксидантами (витаминами Е и А).

Рекомендации по использованию: полученные данные могут быть использованы для разработки методов профилактики и лечения токсических и лучевых поражений организма.

Область применения: биохимия, медицина.

SUMMARY
Natalia E. Petushok

State of the glutathione system under formaldehyde, phenol and γ -radiation exposure. Possibilities of its correction by vitamins E, A and pantothenol

Key words: formaldehyde, phenol, fractional γ -irradiation, glutathione, glutathionereductase, **glutathioneperoxidase**, vitamin E, vitamin A, pantothenol.

Object of studies: liver, blood, erythrocytes, blood plasma of rats.

Subject of studies: activity of glutathionereductase, glutathioneperoxidase, glutathionetransferase, catalase, concentration of reduced glutathione and thio-barbituric acid-reactive substances.

Study goal: the investigation of the glutathione system in blood and liver of rats under γ -radiation, formaldehyde and phenol exposure; the testing of protective properties of vitamins E, A and pantothenol under these experimental conditions.

Study methods: biochemical, statistical.

Received results and their novelties: for the first time was assessed the functioning of the glutathione system in blood and liver of rats under formaldehyde, phenol or γ -radiation exposure. The data obtained show that formaldehyde act as prooxydant and membrane-destructive agent, phenol block the molecular systems containing SH-groups. The time-course changes in the state of the glutathione system were shown to take place after fractional γ -irradiation. For the first time was **investigated** influence of combined action of **phenol** and formaldehyde on the glutathione system. The effect of enhancement of toxic action with parallel smoothing of prooxidant influence were shown. For the first time was demonstrated the possibility of metabolic correction of disturbances in the system of glutathione and **glutathione-related** enzymes by precursor of the pantothenic acid pantothenol and also by the combined use of these compound with vitamins E and A.

Usage recommendations: the obtained data can be used for the elaboration of the preventive methods and methods for treatment of toxic and radiation injury.

Area of application: biochemistry, medicine.