

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. Баева Е.В., Никонова М.Ф. Фенотипические и функциональные проявления дифференцировки тимоцитов под влиянием острого стресса в раннем постнатальном онтогенезе // Иммунология. — 1991. — № 6. — С. 21—25.
2. Корнева Е.А., Шхinek Э.К. Гипоталамо-гипофизарно-адреналовая система в регуляции иммунологических процессов // Физиол. журн. СССР. — 1984. — 70, № 9. — С. 1286—1293.
3. Назаров П.Г., Горманов И.А., Софронов Б.Н. Метод определения супрессорной активности лимфоцитов в культуре цельной крови // Иммунология. — 1982. — № 1. — С. 67—70.
4. Науменко Е.В., Дыгало Н.Н., Маслова Л.Н. Длительная модификация стрессорной реактивности воздействиями в пренатальном онтогенезе // Онтогенетические и генетико-эволюционные аспекты нейроэндокринной регуляции стресса. — Новосибирск: Наука, 1990. — С. 40—55.
5. Резников А.Г. Гормонально-медиаторный импринтинг нейроэндокринной патологии // Патол. физиология и эксперим. терапия. — 1989. — № 6. — С. 2—8.
6. Bessler H., Sziein M.B., Serrate S.A. β -Endorphin modulation of interleukin-1 induced interleukin-2 production // FASEB J. — 1989. — 3, № 3. — P. 479—485.
7. Gmuner F.K., Lorenzi G., Bechler B. et al. Effect of long-term Physical Exercise on lymphocyte Reactivity: Similarity to Spaceflight reactions // Anat. Space and Environ. Med. — 1988. — 2. — P. 146—151.
8. Kay N.E., Morley J.E., Allen J.I. Interaction between endogenous opioids and IL-2 on PHA-stimulated human lymphocytes // Immunology. — 1990. — 70. — P. 458—491.
9. Redondo J., Meduel F., Lopez-Rivas A. Inhibition of interleukin-2-induced proliferation of cloned neurone by glucocorticoids // Eur. J. Immunol. — 1988. — 18, № 10. — P. 1555—1559.
10. Sacerdote P., Paneral A.E. Analysis of the beta-endorphin structure-related activity on human monocyte chemotaxis: importance of the N and C-terminal // Peptides. — 1989. — 10, № 3. — P. 365—369.
11. Suganuma A. B lymphocyte differentiation and suppressor activity by T-lymphocytes derived from neonatal and sucking piglets // Res. Vet. Sci. — 1986. — 40, № 3. — P. 400—405.
12. Trout J.M., Mashay M.M. Corticosterone in vitro suppress lymphocyte proliferation // Poultry Sci. — 1989. — 68. — P. 148—153.

Черкас. пед. ін-т
М-ва освіти України

Матеріал надійшов
до редакції 16.02.93

УДК 612.453+612.351.11].015.1:615.252.453

П.А.Зорич, Н.Д.Трощко, А.С.Микоша

Изменение активности глутатионтрансферазы, глутатионредуктазы и содержания глутатиона в надпочечниках и печени крыс при воздействии хлоританом

Вивчався вплив хлоритану (о,п'-ДДД, мітотану), препарату, що викликає руйнування кори надниркових залоз у людини та собаки, на найбільш важливу систему обміну ксенобіотиків: глутатіон-S-трансферази — глутатіон. У дослідженнях на щурах, стійких до адренокортиколітичної дії о,п'-ДДД, аналізували вплив препарату на активність глутатіон-S-трансферази, вміст глутатіону та активність глутатіонредуктази, яка забезпечує необхідний рівень відновленого глутатіону в тканині надниркових залоз і печінки. Показано, що введення щурам масою 200—240 г олійного розчину о,п'-ДДД (75 мг/тварина щоденно) протягом 3 діб призводить до зниження глутатіонтрансферазної активності в надниркових залозах при одночасному збільшенні рівня відновленого глутатіону та зниженні — окисленої форми. В печінці активність глутатіон-S-транс-

© П.А.ЗОРИЧ, Н.Д.ТРОЩКО, А.С.МИКОША, 1994

феррази та глутатіонредуктази під впливом о,п'-ДДД зростає. Паралельно спостерігається зниження рівня відновленого глутатіону в тканині печінки. Виявлені зміни можуть пояснити різну видову чутливість тварин до хлодитану.

Введение

Ферменты, функционирующие с участием глутатиона, и сам глутатион в последние годы привлекли большое внимание исследователей. Этот интерес связан с участием системы глутатионзависимых ферментов в обезвреживании перекисей и обмене ксенобиотиков, в частности лекарств. Исследуя механизм действия блокатора функции коры надпочечников о,п'-ДДД (хлодитана, митотана, о,п'-дихлордифенилдиоксидана), мы показали активацию глутатинредуктазы (КФ 1.6.4.2) в ткани железы под влиянием препарата при скормливания собакам и при добавлении *in vitro* [4, 5]. Активность глутатин-S-трансферазы (КФ 2.5.1.18) под влиянием о,п'-ДДД снижалась *in vitro* и *in vivo* у собак, но повышалась у морских свинок [7]. Важно подчеркнуть, что о,п'-ДДД блокирует функцию коры надпочечников у человека и собак, но не влияет на адренокортикальную функцию морских свинок и крыс [2]. Индукция глутатин-S-трансферазы в надпочечниках крыс показана при введении ксенобиотика транс-стильбеноксида [11].

За счет высокой липофильности о,п'-ДДД накапливается в ткани коры надпочечников, причем и у собак, и у морских свинок, но не у крыс [6, 8]. Имеются сообщения о метаболических превращениях в ткани желез и ковалентном связывании метаболитов о,п'-ДДД [13—15]. Эти трансформации могут приводить к образованию активных метаболитов, непосредственно вызывающих деструкцию адренокортикоцитов, или, альтернативно, обеспечивать инактивацию о,п'-ДДД и защиту клеток от разрушения. В этом плане анализ изменений активности глутатинзависимых ферментов и содержания глутатиона у животных, чувствительных и резистентных к о,п'-ДДД, представляется перспективным.

Цель работы — определить влияние хлодитана на активность глутатин-S-трансферазы, глутатинредуктазы и содержание глутатиона в надпочечниках и печени крыс.

Методика

Опыты проведены на самках крыс линии Вистар массой 200—240 г. На протяжении 3 сут крысам перорально вводили о,п'-ДДД (75 мг/животное), растворенный в подсолнечном масле. Контрольные животные получали соответствующий объем подсолнечного масла. Крыс декапитировали через 24 ч после последнего введения препарата.

Образцы для определения концентрации общего глутатиона и окисленной формы готовили по Akerboom и Sies [9]. Глутатион определяли энзиматическим методом Tietze [16], основанном на ферментативном восстановлении 5,5-дитиобис-(2-нитробензойной кислоты — ДТНБ) до 5-тио-2-нитробензоата — ТНБ системой глутатин — глутатинредуктаза (фирма «Sigma», США) и НАДФ·Н₂ (фирма «Reanal», Венгрия). Скорость реакции пропорциональна концентрации глутатиона в системе. Параллельно обрабатывали стандарты. Образование ТНБ измеряли при 412 нм на спектрофотометре СФ-46 «ЛОМО».

Для определения количества окисленного глутатиона (GSSG) в образцах

восстановленный глутатион (GSH) связывали N-этилмалеимидом (NEM) (фирма «Sigma», США). Избыток NEM удаляли экстракцией диэтиловым эфиром. Количество восстановленного глутатиона рассчитывали как разницу между общим глутатионом и его окисленной формой.

Приготовление гомогенатов ткани надпочечников и печени для определения ферментов описано ранее [3]. Надпочечники крыс гомогенизировали без отделения мозгового вещества. В работе использовали 1 %-ный гомогенат надпочечников и 4 %-ный гомогенат печени. Активность глутатион-S-трансферазы определяли спектрофотометрически по образованию конъюгата, используя 1-хлор-2,4-динитробензол (ХДНБ) в качестве субстрата [12]. Инкубационная смесь содержала 1 ммоль/л восстановленного глутатиона (фирма «Reanal», Венгрия), 1 ммоль/л ХДНБ и 0,1 моль/л K^+ -фосфатный буфер с ЭДТА (1 ммоль/л), pH 7,0. Оптическую плотность измеряли при 340 нм с помощью регистрирующего спектрофотометра EPS-3T «Hitachi» в термостатирующей кювете (37 °C) в течение 3 мин при работе с гомогенатом надпочечников и 2 мин — с гомогенатом печени. Для расчета скорости образования конъюгата использовали участок линейного повышения оптической плотности. Коэффициент молярной экстинкции для конъюгата — $9,6 \text{ ммоль} \cdot \text{л}^{-1} \cdot \text{см}^{-1}$. Ферментативную активность выражали в нанолях конъюгата за 1 мин на миллиграмм белка.

Инкубационная смесь для определения активности глутатионредуктазы содержала окисленный глутатион (фирма «Reanal», Венгрия) 1 ммоль/л НАДФ $\cdot H_2$ — 60 нмоль/л и 0,05 моль/л *трис*-HCl-буфер, pH 7,4. В контроле глутатиона не было. Активность глутатионредуктазы определяли спектрофотометрически по убыли НАДФ $\cdot H_2$ при 340 нм. Оптическую плотность измеряли на спектрофотометре EPS-3T «Hitachi» при 37 °C в течение 3 мин. Для расчета скорости окисления НАДФ $\cdot H_2$ использовали участок линейного снижения оптической плотности. Коэффициент молярной экстинкции для НАДФ $\cdot H_2$ — $6,22 \text{ ммоль} \cdot \text{л}^{-1} \cdot \text{см}^{-1}$. Ферментативную активность выражали в нанолях НАДФ $\cdot H_2$, окисленного за 1 мин, на миллиграмм белка.

Белок определяли по методу Bramhall и соавт. [10].

Результаты обрабатывали статистически с использованием критерия t Стьюдента и непараметрического критерия Вилкоксона — Манна — Уитни [1].

Результаты и их обсуждение

В результате скормливания крысам о,п'-ДДД в течение 3 сут в надпочечных железах наблюдается существенное снижение активности глутатион-S-трансферазы (табл. 1). Одновременно отмечено увеличение содержания восстановленного глутатиона и снижение — окисленной его формы (табл. 2). Так как GSH является вторым субстратом глутатион-S-трансферазы, то снижение активности фермента вполне согласуется с изменениями содержания глутатиона. В надпочечниках собак активность глутатион-S-трансферазы также снижалась, однако у морских свинок значение этого показателя под влиянием о,п'-ДДД возрастала [7].

В печени активность глутатион-S-трансферазы при скормливании о,п'-ДДД возрастает (см. табл. 1). Параллельно наблюдается снижение содержания восстановленного глутатиона в ткани печени, хотя содержание окисленной формы при этом не изменяется (см. табл. 2). Это кажущееся противоречие объясняется активацией глутатионредуктазы, обеспечивающей восстановление окисленного глутатиона (см. табл. 1).

Изменение активности глутатионтрансферазы в печени крыс под влия-

Таблица 1. Изменение активности (нмоль · мин⁻¹ · мг белка⁻¹) глутатионтрансферазы и глутатионредуктазы в надпочечниках и печени крыс, получавших о,п'-ДДД ($M \pm m$)

Показатель	Животные, получающие подсолнечное масло (контроль)	Животные, получавшие о,п'-ДДД	P	Критерий
Активность глутатионтрансферазы надпочечников	169,9 ± 18,0 (8)	95,7 ± 8,6 (8)	<0,01	U
печени	479,3 ± 37,3 (8)	638,9 ± 59,4 (8)	<0,01 <0,05	U t
Активность глутатионредуктазы печени	21,2 ± 2,3 (8)	27,9 ± 2,1 (8)	<0,05	U

Примечание. Здесь и в табл. 2 в скобках указано число наблюдений.

нием о,п'-ДДД, очевидно, отражает типичный ответ на ксенобиотики [11]. В печени индукция глутатион-S-трансферазы возникала под влиянием фенотербитала и 3-метилхолантрена, однако эти соединения никак не влияли на ферментативную активность в надпочечниках [11].

Сопоставление всех этих результатов позволяет предположить, что изменение активности глутатион-S-трансферазы в коре надпочечников обуславливает изменение обмена о,п'-ДДД, связанное с его активностью.

Таблица 2. Изменение содержания (мкмоль/г ткани) восстановленного и окисленного глутатиона в надпочечниках и печени крыс, получавших о,п'-ДДД ($M \pm m$)

Группа животных	Восстановленный глутатион (GSH)	Относительное изменение содержания GSH, %	Окисленный глутатион (GSSG)	Относительное изменение содержания GSSG, %
Надпочечники				
Крысы, получавшие подсолнечное масло (контроль)	3,2 ± 0,3 (8)	—	0,11 ± 0,02 (8)	—
Крысы, получавшие о,п'-ДДД (опыт)	4,0 ± 0,4 P < 0,05 (8)	+24	0,05 ± 0,006 P < 0,01 (8)	-54
Печень				
Крысы, получавшие подсолнечное масло (контроль)	5,8 ± 0,4 (8)	—	0,17 ± 0,03 (8)	—
Крысы, получавшие о,п'-ДДД (опыт)	4,7 ± 0,3 P < 0,05 (8)	-19	0,13 ± 0,01 P > 0,05 (8)	-23

P.A.Zorich, N.D.Tron'ko, A.S.Miksha

CHANGES IN ACTIVITY OF GLUTATHIONE-S-TRANSFERASE AND GLUTATHIONE REDUCTASE AND GLUTATHIONE LEVEL IN THE RAT ADRENALS AND LIVER AFFECTED BY CHLODITAN

The chloditan (o,p-DDD, mitotane), which causes the destruction of the human and dog adrenal cortex, on the most essential system of xenobiotic metabolism: glutathione-S-transferase — glutathione has been studied. The effect of o,p-DDD on GSH level and activity of glutathione-S-transferase and glutathione reductase which maintain the level of reduced glutathione was analyzed in the adrenal and liver tissue of rats. This species is resistant to adrenocorticolytic action of o,p-DDD.

It was shown that feeding of rats weighting 200—240 g with oil solution of o,p-DDD (75 mg daily) for 3 days causes the decrease in activity of glutathione-S-transferase and content of oxidized glutathione in the adrenals with simultaneous increase of the content of reduced glutathione. The glutathione-S-transferase and glutathione reductase activity in the liver rises under the effect of o,p-DDD, the decrease of the GSH level being observed.

The revealed changes may explain the species sensitivity of animals to o,p-DDD.

Kiev Research Institute of Endocrinology and Metabolism,
Ministry of Public Health of Ukraine

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. Гублер Е.В., Генкин А.А. Применение критериев непараметрической статистики для оценки различий двух групп наблюдений в медико-биологических исследованиях // М.: Медицина, 1969. — 30 с.
2. Комиссаренко В.П., Резников А.Г. Ингибиторы функций коры надпочечных желез // К.: Здоров'я, 1972. — С. 97—122.
3. Комиссаренко В.П., Местечкина А.Я., Микоша А.С. Влияние о,п'-дихлордифенилдихлорэтана на активность глутатионредуктазы и содержание SH-групп в надпочечниках собак // Бюл. эксперим. биологии. — 1974. — № 7. — С. 44—46.
4. Комиссаренко И.П., Челнакова И.С., Микоша А.С. Влияние о,п'-дихлордифенилдихлорэтана и пертана in vitro на активность глутатионредуктазы в надпочечниках собак и морских свинок // Бюл. эксперим. биологии. — 1978. — № 2. — С. 159—161.
5. Комиссаренко В.П., Челнакова И.С., Микоша А.С. Активность глутатионредуктазы в надпочечниках и печени собак при введении о,п'-ДДД, пертана и АКГТ // Пробл. эндокринологии. — 1978. — № 1. — С. 95—97.
6. Корпачев В.В. Накопичення та виведення о,п'-ДДД в органах і тканинах морських свинок і собак // Фізіол. журн. АН УРСР. — 1972. — № 5. — С. 585—590.
7. Челнакова И.С., Микоша А.С., Тодор И.Н. Анализ влияния хлоритана на глутатион-S-трансферазу в надпочечниках и печени // Фармакология и токсикология. — 1985. — № 6. — С. 104—106.
8. Шевченко А.В., Корпачев В.В. Особенности распределения ингибитора функции коры надпочечников хлоритана (о,п'-ДДД) в организме // Физиология, биохимия и патология эндокринной системы: Респ. межведомствен. сб. Надпочечные железы. — К.: Здоров'я, 1975. — Вып. 5. — С. 25—27.
9. Akerboom T.P.M., Sies H. Assay of glutathione, glutathione disulfide and glutathione mixed isulfides in biological samples // Methods in Enzymology. — 1981. — 77. — P. 373—382.
10. Bramhall S., Noak N., Wu A. et al. A simple colorimetric method for determination of protein // Anal. Biochem. — 1969. — 31, № 1. — P. 146—148.
11. Depierre J.W., Seidegard J., Morgenstern R. et al. Induction of cytosolic glutathione transferase and microsomal epoxide hydrolase activities in extrahepatic organs of the rat by phenobarbital, 3-methylcholanthrene and trans-stilbene oxide // Xenobiotica. — 1984. — 14, № 4. — P. 295—301.
12. Habig W.H., Pabst M.J., Jakoby W.B. Glutathione-S-transferase. The first enzymatic step in mercapturic acid formation // J. Biol. Chem. — 1974. — 249. — P. 7130—7139.
13. Martz F., Straw J. The in vitro metabolism of 1-(o-chlorophenyl)-1-(p-chlorophenyl)-2,2-dichloroethane (o,p-DDD) by dog adrenal mitochondria and metabolite covalent binding to mitochondrial macromolecules. A possible mechanism for the adrenocorticolytic effect // Drug Metabolism and Disposition. — 1977. — 5, № 5. — P. 482—486.
14. Martz F., Straw J. Metabolism and covalent binding of 1-(o-chlorophenyl)-1-(p-chlorophenyl)-2,2-dichloroethane (o,p-DDD). Correlation between adrenocorticolytic activity and metabolic activation by adrenocortical mitochondria // Drug Metabolism and Disposition. — 1980. — 8, № 3. — P. 127—130.
15. Sinsheimer J.E., Freeman C.J. Mitotane (1-(o-chlorophenyl)-1-(p-chlorophenyl)-2,2-dichloroethane) metabolism in perfusion studies with dog adrenal glands // Ibid. — 1987. — 15, № 2. — P. 267—269.
16. Tietze F. Enzymic method for quantitative determination of nanogram amounts of total and oxidized glutathione // Anal. Biochem. — 1969. — № 27. — P. 502—522.

Київ. науч.-исслед. ин-т эндокринологии
і обмену веществ
М-ва здравоохранения Украины

Матеріал надійшов
в редакцію 20.04.93