УДК 612.466:577.151.63

АКТИВНОСТЬ ФЕРМЕНТОВ СИСТЕМЫ ГЛУТАТИОНА В ПОЧКАХ КРЫС ПРИ ЧРЕЗМЕРНЫХ ФИЗИЧЕСКИХ НАГРУЗКАХ В СОЧЕТАНИИ С ОСТРОЙ ИНТОКСИКАЦИЕЙ ЭТАНОЛОМ

Чигринский Е.А. [1], Соснин М.И. [1], Рева И.А.[1], Конвай В.Д. [1], Ефременко Е.С. [1], Жукова О.Ю. [1]

[1]ФГБОУ ВО «Омский государственный медицинский университет» Минздрава России, Омск, e-mail: chigrinski@list.ru

Исследование было проведено на 79 крысах-самцах, которых делили на шесть групп (n=10-15): 1-ю группу составили интактные крысы; 2-ю группу – контрольные животные, которые плавали без груза по усредненному времени (3–5 мин.); 3-ю – контрольные крысы, получавшие физиологический раствор вместо этанола; 4-ю – крысы, подвергнутые чрезмерным физическим нагрузкам; 5-ю – крысы, получавшие этанол; 6-ю – крысы, подвергнутые чрезмерным физическим нагрузкам в сочетании с острой интоксикацией этанолом. После завершения эксперимента в почках крыс определяли содержание глутатиона, активность глутатионпероксидазы, глутатионредуктазы, глутатион-S-трансферазы и гамма-глутамилтрансферазы. Установлено, что острая интоксикация этанолом на фоне чрезмерных физических нагрузок приводит к снижению уровня глутатиона в тканях почек крыс. Активность глутатионпероксидазы и глутатионредуктазы в этих условиях снижена на фоне повышения активности глутатион-S-трансферазы и гамма-глутамилтрансферазы. Уменьшение содержания глутатиона и изменение активности ферментов его обмена в почках крыс свидетельствуют о нарушении функции антиоксидантной системы при чрезмерных физических нагрузках в сочетании с острой интоксикацией этанолом.

Ключевые слова: глутатион, антиоксидантная система, физические нагрузки, этанол, почки, крысы.

THE ENZYME ACTIVITY OF GLUTATHIONE SYSTEM IN THE RATS' KIDNEYS DURING THE EXCESSIVE PHYSICAL EXERCISE IN COMBINATION WITH ACUTE ETHANOL INTOXICATION

Chigrinskiy E.A.[1], Sosnin M.I.[1], Reva I.A.[1], Konvay V.D.[1], Efremenko E.S.[1], Zhukova O.Yu.[1]

[1]Omsk State Medical University, Omsk, e-mail: chigrinski@list.ru

The study was carried out on 79 male rats, which were randomly divided into six groups (n = 10 - 15): group 1 was represented by intact rats; group 2 consists of control animals, which were swimming without weight applied for average amount of time (3 - 5 min.); group 3 - control rats, which were treated with the isotonic saline instead of alcohol; group 4 - rats being under excessive physical exercise; group 5 - rats treated with ethanol; group 6 - rats having both excessive physical exercise and acute ethanol intoxication. After completing an experiment the amount of glutathione, activity of glutathione peroxidase, glutathione reductase, glutathione S-transferase and gamma-glutamyl transferase in rats' kidneys was measured. It was found that acute intoxication with ethanol under excessive exercise leads to lower level of glutathione in rats' kidney tissues. The decrease in activity of glutathione peroxidase and glutathione reductase is accompanied with the increase of activity of glutathione S-transferase and gamma-glutamyl transferase. A decrease in level of glutathione and change in activity of its metabolism enzymes in rats' kidneys represents malfunction of an antioxidant system under acute ethanol intoxication and excessive exercise.

Keywords: glutathione, antioxidant system, excessive exercise, ethanol, kidney, rats.

Научная литература содержит достаточно данных о вреде физических нагрузок высокой интенсивности, в частности об их влиянии на биохимические процессы в различных органах [4; 6; 10; 11; 13], в том числе и почках [11]. Несмотря на это, наблюдается дефицит исследований, занимающихся выявлением особенностей сочетанного воздействия на организм человека чрезмерных физических нагрузок с другими факторами. Одним из таких

факторов может быть острая интоксикация этанолом, так как злоупотреблению спиртными напитками не редко предшествует интенсивная физическая работа. В связи с этим актуальным является изучение физиологических процессов, происходящих в организме, и в органах выделительной системы в частности, при одновременном действии на него чрезмерных физических нагрузок и острой интоксикации этанолом.

Важным звеном метаболизма является антиоксидантная система. Она защищает клетки от свободных радикалов и продуктов перекисного окисления липидов и белков. Глутатионовая антиоксидантная система является составной частью антирадикальной и антиперекисной защиты клеток и состоит из ферментов, участвующих в редокс-цикле глутатиона, а также энзимов, использующих глутатион или образующие его аминокислоты для конъюгирования различных веществ.

Цель исследования: оценить состояние системы глутатиона в почках крыс, подвергнутых чрезмерным физическим нагрузкам в сочетании с острой алкогольной интоксикацией.

Материал и методы. Исследования проводились на кафедре биохимии Омского государственного медицинского университета в 2012–2015 гг. В качестве экспериментальных животных были использованы 79 белых крыс-самцов массой 180–200 г. Методом случайной выборки крыс делили на 6 групп: 1-ю группу составили интактные крысы (n=15); 2-ю группу – контрольные животные, которые плавали без груза по усредненному времени (3–5 мин.) (n=15); 3-ю – контрольные крысы, получавшие физиологический раствор вместо этанола (n=15); 4-ю – крысы, подвергнутые чрезмерным физическим нагрузкам по методу В.В. Корняковой с соавт., 2007 [5], плававшие с грузом 10% от массы тела до полного утомления (n=12); 5-ю – крысы, получавшие этанол (n=10); 6-ю – крысы, подвергнутые чрезмерным физическим нагрузкам в сочетании с острой алкогольной интоксикацией (n=12). Введение этанола крысам 5 и 6-й групп осуществлялось перорально при помощи металлического катетера в дозе 4 г/кг массы тела. При этом необходимо отметить, что крысы 6-й группы получали этанол после развития у них чрезмерных физических нагрузок. По истечении двух часов после введения этанола животных выводили из эксперимента. Температура воздуха в виварии составляла 19–21 °С, воды при плавании – 28–30 °С. При проведении эксперимента соблюдались требования Европейской конвенции по защите позвоночных животных, применяемых для экспериментальных и других научных целей 86/609 EEC.

После завершения эксперимента проводилось извлечение почек, которые позднее подвергались гомогенизации на 0,15 *М* растворе хлорида калия (KCl) в стеклянном гомогенизаторе Поттера при температуре 0–2 °С. В супернатанте гомогенатов определяли

содержание общего белка при помощи биуретового реактива и глутатиона по Н.А. Костромитикову, Е.А. Суменкову, 2005 [7]. Данный метод основан на реакции восстановленного глутатиона с реактивом Эллмана, в результате которого образуется тионитрофенольный анион, и под его воздействием меняется цвет раствора, приобретая желтый оттенок. Активность глутатионпероксидазы (КФ 1.11.1.9) и глутатионредуктазы (КФ 1.6.4.2) определяли по С.Н. Власовой с соавт., 1990 [2], глутатион-S-трансферазы (GST, КФ 2.5.1.1.8) по Habig and Jakoby, 1981 [12] и гамма-глутамилтрансферазы (ГГТ, КФ 2.3.2.2) по Persijn and van der Slik [14].

Статистическую обработку полученных данных проводили с использованием программы Statistica 6.0 фирмы StatSoft Inc. (США). Экспериментальные данные обрабатывали при помощи непараметрического *U*–критерия Манна–Уитни. Результаты представлены как *Me* – медиана, Q_1 – нижний квартиль, Q_3 – верхний квартиль.

Результаты исследования и их обсуждение

Эксперимент показал, что изучаемые биохимические показатели у животных контрольных (2 и 3-й) групп не имеют статистически значимых различий по сравнению с интактными крысами. Чрезмерные физические нагрузки вызвали снижение концентрации глутатиона в почках крыс и изменение активности ферментов, участвующих в его метаболизме. Содержание глутатиона в почках животных 4-й группы снижено в 2,04 раза относительно аналогичного показателя во 2-й группе (табл. 1). Снижение концентрации трипептида у крыс с чрезмерными физическими нагрузками обусловлено развитием в почках острого нарушения метаболизма пуринов, сопряженного с усиленной генерацией активированных кислородных метаболитов (АКМ) в ксантиноксидазной реакции [11]. Острое нарушение метаболизма пуринов – это процесс, характеризующийся повреждением нуклеиновых кислот, нарушением энергетического обмена с последующим накоплением АМФ, запускающим процесс катаболизма пуриновых мононуклеотидов до урата [4; 6; 10]. Одним из негативных последствий острого нарушения метаболизма пуринов является активация ксантиноксидазы. Данный энзим активно генерирует АКМ, которые способны повреждать липиды, белки, а также нуклеиновые кислоты. Атака АКМ на липиды мембранных структур клетки приводит к накоплению в них продуктов перекисного окисления липидов.

Таблица 1

Изменение биохимических показателей в почках крыс, подвергнутых острой интоксикации этанолом на фоне чрезмерных физических нагрузок, *Me* (Q_1–Q_3)

Группа	Показатель		
	Глутатион, *нмоль/мг белка*	**Глутатионпероксидаза**, *МЕ/мг белка*	**Глутатионредуктаза**, *МЕ/мг белка*
1-я *n=15*	**14,9 (8,24–21,1)**	**378 (271–489)**	**288 (171–365)**
2-я *n=15*	**15,7 (8,31–22,5)**	**395 (282–476)**	**258 (144–386)**
3-я *n=15*	**15,1 (9,80–24,5)**	**359 (263–475)**	**270 (180–357)**
4-я *n=12*	**7,30 (2,40–12,4)** $p_{[1]}$=0,00015 $p_{[2]}$=0,00009	**149 (87,6–206)** $p_{[1]}$=0,00001 $p_{[2]}$=0,00001	**93,8 (72,9–126)** $p_{[1]}$=0,00001 $p_{[2]}$=0,00001
5-я *n=10*	**19,2 (5,73–16,5)** $p_{[1]}$=0,01357 $p_{[3]}$=0,00300	**558 (432-723)** $p_{[1]}$=0,00018 $p_{[3]}$=0,00028	**345 (264–635)** $p_{[1]}$=0,01161 $p_{[3]}$=0,00714
6-я *n=12*	**5,90 (1,52–10,4)** $p_{[1]}$=0,00007 $p_{[4]}$=0,17964 $p_{[5]}$=0,01341	**107 (60,3–161)** $p_{[1]}$=0,00001 $p_{[4]}$=0,05704 $p_{[5]}$=0,00009	**70,9 (35,2–116)** $p_{[1]}$=0,00001 $p_{[4]}$=0,02811 $p_{[5]}$=0,00009

Примечание: (здесь и в табл. 2) $p_{[1]}$ – различия статистически значимы с 1-й группой; $p_{[2]}$ – со 2-й группой; $p_{[3]}$ – с 3-й группой; $p_{[4]}$ – с 4-й группой; $p_{[5]}$ – с 5-й группой.

Чрезмерные физические нагрузки у крыс 4-й группы вызвали снижение активности глутатионпероксидазы и глутатионредуктазы на фоне активации глутатион-S-трансферазы и гамма-глутамилтрансферазы. Показатель глутатионпероксидазы в 2,65, а глутатионредуктазы в 2,75 раза ниже относительно аналогичного показателя 2-й группы (табл. 1). Снижение активности глутатионпероксидазы и глутатионредуктазы может быть вызвано ингибированием ферментов продуктами реакции, а также меньшей стимуляцией экспрессии данных белков под влиянием антиоксидант-респонсивного элемента (ARE). Еще одной причиной снижения активности этих ферментов *in vivo* может быть дефицит селена [1; 8; 9].

Активность глутатион-S-трансферазы в почках крыс 4-й группы оказалась выше в 1,63 раза относительно аналогичного показателя 2 группы (табл. 2), что свидетельствует об интенсивном включении глутатион-S-трансферазы в процессы инактивации продуктов свободнорадикального окисления. Образовавшиеся глутатион-S-конъюгаты в результате реакции, катализируемой глутатион-S-трансферазой, подвергаются дальнейшему изменению под действием ряда ферментов, одним из которых является гамма-глутамилтрансфераза.

Активность этого энзима у крыс 4-й группы была выше в 2,18 раза относительно аналогичных показателей 2-й группы.

Таблица 2

Изменение биохимических показателей в почках крыс, подвергнутых острой интоксикации этанолом на фоне чрезмерных физических нагрузок, Me (Q_1–Q_3)

Группа	Показатель	
	Глутатион-S-трансфераза, *МЕ/г белка*	**Гамма-глутамилтрансфераза**, *МЕ/мг белка*
1-я n=15	**1,12 (0,76–1,97)**	**430 (290–537)**
2-я n=15	**1,05 (0,73–2,01)**	**435 (289–536)**
3-я n=15	**1,14 (0,79–1,83)**	**429 (287–525)**
4-я n=12	**1,71 (1,21–2,36)** $p_{[1]}$=0,00049 $p_{[2]}$=0,00229	**959 (764–1146)** $p_{[1]}$=0,00001 $p_{[2]}$=0,00001
5-я n=10	**1,59 (1,17–2,19)** $p_{[1]}$=0,01840 $p_{[3]}$=0,00714	**601 (434–839)** $p_{[1]}$=0,00107 $p_{[3]}$=0,00118
6-я n=12	**1,85 (1,55–2,47)** $p_{[1]}$=0,00007 $p_{[4]}$=0,14892 $p_{[5]}$=0,06021	**1154 (947–1553)** $p_{[1]}$=0,00001 $p_{[4]}$=0,00456 $p_{[5]}$=0,00005

Острая интоксикация этанолом у крыс 5-й группы, так же как и чрезмерные физические нагрузки у крыс 4-й группы, приводит к снижению содержания глутатиона в почках. Уровень этого метаболита в гомогенатах почек крыс 5-й группы был в 1,27 раза ниже относительно аналогичного показателя в 3-й группе. Это может быть связано с интенсивным вовлечением данного трипептида в реакции конъюгации с продуктами свободно-радикального окисления, образующимися в результате действия острой алкогольной интоксикации. Источниками АКМ при острой интоксикации этанолом могут быть различные ферментативные реакции как с участием самого этанола, так и с участием ацетальдегида, образующегося из этого спирта под действием алкогольдегидрогеназы [3]. Кроме того, усиленное образование кетоновых тел из-за избытка ацетил-КоА и NADH приводит к развитию кетоацидоза, способствующего интенсификации процессов острого нарушения метаболизма пуринов.

Снижение уровня восстановленного глутатиона в почках животных, подвергнутых острой алкогольной интоксикации, сопровождается активацией глутатионпероксидазы,

глутатионредуктазы, глутатион-S-трансферазы и гамма-глутамилтрансферазы. Активность глутатионпероксидазы 5-й группы в 1,55, а глутатионредуктазы в 1,28 раза превышает аналогичный показатель 3-й группы. Увеличение активности данных ферментов в этих условиях может быть обусловлено индукцией экспрессии данных ферментов под влиянием ARE. Активность глутатион-S-трансферазы в почках животных 5-й группы в 2,00 раза выше относительно аналогичного показателя 3-й группы. Активность гамма-глутамилтрансферазы у крыс 5-й группы оказалась выше в 1,4 раза в сравнении с аналогичным показателем 3-й группы.

Острая интоксикация этанолом на фоне чрезмерных физических нагрузок привела к более выраженным изменениям биохимических показателей. Содержание глутатиона в почках крыс 6-й группы ниже в 1,24 и 3,25 раза относительно аналогичного показателя в 4 и 5-й группах соответственно. Несмотря на то что введение этанола крысам 5-й группы способствовало увеличению активности глутатионпероксидазы и глутатионредуктазы, у крыс 6-й группы отмечается снижение этих показателей. Активность глутатионпероксидазы в почках животных 6-й группы ниже в 1,41 и 3,24 раза относительно аналогичного показателя в 4 и 5-й группах соответственно. Активность глутатионредуктазы снизилась в 5,23 и 4,06 раза в сравнении с аналогичным показателем в 4 и 5-й группах соответственно. Объяснить это можно тем, что на момент введения этанола животным у них уже отмечаются признаки угасания функции антиоксидантной системы, в частности ее глутатионового звена. Этиловый спирт в этих условиях только лишь усугубляет положение, внося дополнительное количество АКМ, образующихся в процессе его метаболизма. Также немаловажно то, что острая алкогольная интоксикация способствует снижению активности общих путей катаболизма [3], приводя тем самым к истощению запасов углеводов. Усиление анаэробного гликолиза также способствует интенсификации острого нарушения метаболизма пуринов.

Несмотря на снижение активности глутатионпероксидазы и глутатионредуктазы в почках крыс 6-й группы, активность глутатион-S-трансферазы и гамма-глутамилтрансферазы в них остается самой высокой в сравнении со всеми группами. Значение показателя активности глутатион-S-трансферазы у крыс 6-й группы в 1,08 и 1,16 раза выше относительно аналогичного показателя в 4 и 5-й группах соответственно. Активность гамма-глутамилтрансферазы в 1,22 и 1,92 раза выше в сравнении с аналогичным показателем в 4 и 5-й группах соответственно. Данная особенность связана с тем, что накопившиеся при чрезмерных физических нагрузках продукты перекисного окисления липидов ингибируют активность энзимов глутатионового редокс-цикла и стимулируют активность глутатион-S-трансферазы и гамма-глутамилтрансферазы. Введение крысам

этанола на фоне чрезмерных физических нагрузок вызывает еще большее подавление активности первых ферментов и значительное увеличение активности вторых.

Заключение

Острая интоксикация этанолом на фоне чрезмерных физических нагрузок приводит к падению уровня глутатиона в почках крыс, снижению активности глутатионпероксидазы и глутатионредуктазы на фоне активации глутатион-S-трансферазы и гамма-глутамилтрансферазы.

Список литературы

1. Вировец О.А. О повышенных потерях макро- и микроэлементов при занятиях спортом и целесообразности их компенсации биологически активными добавками // Вопросы питания. – 2009. – Т. 78, № 2. – С. 67–71.
2. Власова С.Н., Шабунина Е.И., Переслегина И.А. Активность глутатионзависимых ферментов эритроцитов при хронических заболеваниях печени у детей // Лабораторное дело. – 1990. – № 8. – С. 19–21.
3. Зезеров Е.Г. Биохимические механизмы острого и хронического действия этанола на организм человека // Вопросы биологической, медицинской и фармацевтической химии. – 1998. – № 2. – С. 47–55.
4. Конвай В.Д., Чигринский Е.А., Корнякова В.В., Рейс Б.А. Активность антиоксидантных ферментов эритроцитов при интенсивных физических нагрузках на фоне приема D-рибозы // Вопросы питания. – 2011. – Т. 80, № 3. – С.75–79.
5. Корнякова В.В., Конвай В.Д., Величко Г.Н. Роль нарушения метаболизма пуринов в развитии повреждений эритроцитов, вызванных чрезмерными физическими нагрузками // Проблема сохранения здоровья в Сибири и в условиях Крайнего Севера : сборник материалов Всероссийской научно-практической конференции (Омск, 16–19 октября 2007 г.). – Омск : СибГУФК, 2007. – С. 315–320.
6. Корнякова В.В., Конвай В.Д., Муратов В.А. Нарушение метаболизма пуринов в организме людей и крыс при утомлении при интенсивных физических нагрузках и прогнозирование этого состояния // Омский научный вестник. – 2015. – № 2 (144). – С. 227–230.
7. Костромитиков Н.А., Суменков Е.А. Определение глутатиона фотоколориметрическим методом исследования // Вестник РАСХН. – 2005. – № 5. – С. 69–70.

8. Синдирева А.В. Критерии и параметры действия микроэлементов в системе почва-растение-животное : автореф. дис. … д-ра. биол. наук. – Тюмень, 2012. – 32 с.

9. Синдирева А.В., Зайко О.А. Влияние селена, содержащегося в кормах, на структурные и функциональные изменения в печени // Научная жизнь. – 2012. – № 2. – С. 88.

10. Чигринский Е.А. Антиоксидантная система семенников крыс при физических нагрузках разной интенсивности : автореф. дис. … канд. биол. наук. – Новосибирск, 2010. – 22 с.

11. Чигринский Е.А., Конвай В.Д., Ефременко Е.С., Соснин М.И. Активность ферментов системы глутатиона в почках крыс при чрезмерных физических нагрузках // Современные проблемы науки и образования : электронный журнал. – 2014. – № 4. - URL: www.science-education.ru/118-13884 (дата обращения: 10.10.2016).

12. Habig W.H., Jakoby W.B. Glutathione S-transferases (rat and human) // Methods Enzymol. – 1981. Vol. 77. – P. 218–231.

13. Nikolaidis M.G., Jamurtas A.Z., Paschalis V. The effect of muscle-damaging exercise on blood and skeletal muscle oxidative stress: magnitude and time-course considerations // Sports Med. – 2008. – Vol. 38, № 7. – P. 579–606.

14. Persijn J.P., van der Slik W. A new method for the determination of gamma-glutamyltransferase in serum // J. Clin. Chem. Biochem. – 1976. – V. 14, N 9. – P. 421–427.