

## СОСТОЯНИЕ ТИОЛ-ДИСУЛЬФИДНОГО ЗВЕНА СИСТЕМЫ АНТИОКСИДАНТНОЙ ЗАЩИТЫ ПРИ ЖИРОВОМ ПОВРЕЖДЕНИИ ПАРЕНХИМАТОЗНЫХ ОРГАНОВ ПИЩЕВАРИТЕЛЬНОЙ СИСТЕМЫ

Денисенко Ю.К.<sup>1</sup>, Бочарова Н.В.<sup>1</sup>, Ковалевский Д.А.<sup>1</sup>, Новгородцева Т.П.<sup>1</sup>,  
Кыткова О.Ю.<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Владивостокский филиал Федерального государственного бюджетного научного учреждения «Дальневосточный научный центр физиологии и патологии дыхания» – Научно-исследовательский институт медицинской климатологии и восстановительного лечения, Владивосток, e-mail: karaman@inbox.ru

Изучено состояние тиол-дисульфидного звена антиоксидантной системы у крыс линии Вистар по уровню глутатиона и активности глутатионовых ферментов в печени и поджелудочной железе в динамике развития их жирового повреждения. Эксперимент осуществляли на 30 половозрелых крысах-самцах линии Вистар. Ожирение и жировое повреждение паренхиматозных органов пищеварительной системы у крыс формировали в течение 12–24 недель высококалорийным рационом, богатым животными жирами и холестерином. В органах-мишенях исследовали содержание восстановленного глутатиона (колориметрическим методом), активность глутатионредуктазы, глутатионпероксидазы оценивали иммуноферментным методом. Воздействие на крыс высококалорийным рационом в течение 12–24 недель приводило к развитию ожирения, гипертрофии, некрозу и формированию фиброзной трансформации поджелудочной железы и печени. Состояние тиол-дисульфидного звена антиоксидантной системы уже на 12-й неделе эксперимента характеризовалось динамичным истощением уровня глутатиона и активности глутатионовых ферментов как в печени, так и в поджелудочной железе по мере их жирового повреждения. Прогрессирование повреждения паренхиматозных органов пищеварительной системы (24 недели эксперимента) приводило к еще большему дефициту антиоксидантной защиты. Таким образом, патогенетической основой жирового повреждения паренхиматозных органов пищеварительной системы при ожирении является дисбаланс тиол-дисульфидного гомеостаза, угнетение активности редокс-системы глутатиона.

Ключевые слова: поджелудочная железа, печень, стеатопанкреатит, тиол-дисульфидное звено, глутатион, антиоксидантная система, крысы линии Вистар.

## THE THIOL-DISULFIDE STATUS OF THE ANTIOXIDANT DEFENSE SYSTEM IN FATTY DAMAGE TO THE PARENCHYMAL ORGANS OF THE DIGESTIVE SYSTEM

Denisenko Yu.K.<sup>1</sup>, Bocharova N.V.<sup>1</sup>, Kovalevskiy D.A.<sup>1</sup>, Novgorodtseva T.P.<sup>1</sup>,  
Kytikova O.Yu.<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Vladivostok Branch of Far Eastern Scientific Center of Physiology and Pathology of Respiration – Research Institute of Medical Climatology and Rehabilitation Treatment, Vladivostok, e-mail: karaman@inbox.ru

The state of the thiol-disulfide link of the antioxidant system in Wistar rats was studied according to the level of glutathione and the activity of glutathione enzymes in the liver and pancreas in the dynamics of the development of their fatty damage. The experiment was carried out on 30 sexually mature male Wistar rats. Obesity and fatty damage to the parenchymal organs of the digestive system (PS) in rats were formed for 12–24 weeks with a high-calorie diet rich in animal fats and cholesterol. In target organs, the content of reduced glutathione was studied, the activity of glutathione reductase, glutathione peroxidase was assessed by the enzyme immunoassay. Exposure of rats to a high-calorie diet for 12–24 weeks led to the development of obesity, hypertrophy, necrosis, and the formation of the fibrous transformation of the pancreas and liver. The state of the thiol-disulfide link of the antioxidant system already at the 12th week of the experiment was characterized by a dynamic depletion of the level of glutathione and the activity of glutathione enzymes both in the liver and in the pancreas as they were damaged by fat. The progression of damage to the parenchymal organs of the PS (24 weeks of the experiment) led to an even greater deficiency of antioxidant protection. Thus, the pathogenetic basis of fatty damage to the parenchymal organs of the digestive system in obesity is the imbalance of thiol-disulfide homeostasis, inhibition of the activity of the rare glutathione system.

Keywords: pancreas, liver, steatopancreatitis, thiol-disulfide exchange, glutathione, antioxidant system, Wistar rats.

Жировое повреждение паренхиматозных органов пищеварительной системы является основным отягощающим следствием неправильного питания и ожирения. Ожирение значительно увеличивает риск развития неалкогольной жировой болезни печени (НАЖБП) и поджелудочной железы (НЖБ ПЖ). Проблема ожирения приобретает глобальные масштабы пандемии, что, в свою очередь, оказывает большое влияние на развитие и распространенность заболеваний паренхиматозных органов пищеварительной системы. По данным Всемирной организации здравоохранения в 2016 г. более 1,9 млрд взрослых имели избыточный вес, из них свыше 650 млн страдали ожирением. Нарушение структуры питания и малоподвижный образ жизни служат основными триггерами развития ожирения и сопутствующих ему заболеваний органов пищеварения. Однако патогенетические механизмы, лежащие в основе развития жирового перерождения паренхиматозных органов пищеварительной системы, не ограничиваются только социальными факторами, а являются многогранными и комплексными.

В частности, к формированию указанных патологий, а также к их прогрессированию приводит активация процессов перекисного окисления липидов при недостаточной антиоксидантной защите [1]. Одной из причин развития окислительного стресса и усиления свободнорадикальных реакций в железах пищеварительной системы служит истощение активности синтеза глутатиона и сопряженных с ним ферментов [2]. Глутатион-зависимая антиоксидантная система поддерживает тиол-дисульфидный гомеостаз за счет необходимого баланса глутатиона и функционально связанных ферментов, включая глутатион-S-трансферазу, глутатионпероксидазу и глутатионредуктазу [3]. Печень имеет приоритетное значение в метаболизме глутатиона, удаляя резорбированный цистеин из портального кровотока и превращая его в менее реактивный глутатион, который возвращается в кровоток. Поскольку печень играет центральную роль в межорганном гомеостазе глутатиона, ее дисфункция может влиять на эндогенную продукцию и использование глутатиона и, возможно, в дальнейшем приводить к нарушению регуляции глутатион-зависимой антиоксидантной системы [4].

Поддержание необходимого тиол-дисульфидного гомеостаза является важным фактором физиологической редокс-регуляции клеточной сигнализации и апоптоза [5]. Многочисленные исследования доказали важность коррекции тиол-дисульфидного баланса при жировом повреждении печени, однако недостаточно сведений о состоянии редокс-системы глутатиона в динамике формирования заболеваний паренхиматозных органов пищеварительной системы. Жировое повреждение печени и поджелудочной железы являются ассоциированными заболеваниями, которые, возможно, влияют друг на друга в отношении

начала и их прогрессирования. Интересным является также установление взаимосвязанной роли редокс-статуса печени и поджелудочной железы в условиях ожирения.

Цель исследования – изучить состояние тиол-дисульфидного звена антиоксидантной системы по уровню глутатиона и активности глутатионовых ферментов в печени и поджелудочной железе у крыс линии Вистар в динамике развития их жирового повреждения.

**Материал и методы исследования.** Эксперимент осуществляли на 30 половозрелых крысах-самцах линии Вистар в возрасте 6 месяцев и начальной массой  $172 \pm 5$  г. Ожирение и жировое повреждение органов пищеварительной системы у крыс формировали в течение 12–24 недель высококалорийным рационом, богатым животными жирами и холестерином [6]. Все манипуляции с животными и их эвтаназию осуществляли согласно правилам лабораторной диагностики (GLP), требованиям Европейской конвенции по защите экспериментальных животных 86/609 ЕЕС, приказам МЗ РФ № 267 от 19.06.2003 г. и МЗ СССР № 755 от 12.08.1977 г. Экспериментальное исследование было одобрено локальным этическим комитетом Научно-исследовательского института медицинской климатологии и восстановительного лечения (протокол № 6 от 20.12.2018 г).

Животные были разделены на 3 группы: интактная группа крыс находилась на стандартном рационе питания (10 крыс); опытная группа 1 – крысы содержались на экспериментальном рационе в течение 12 недель (10 крыс) и опытная группа 2 (10 крыс) – 24 недели соответственно. После декапитации животных печень и поджелудочная железа извлекались и взвешивались. Состояние редокс-системы глутатиона печени и поджелудочной железы оценивали по содержанию восстановленного глутатиона (ГЛ), активности глутатионредуктазы (ГР), глутатионпероксидазы (ГП). Определение ГЛ проводили колориметрическим методом (ArborAssays, USA). Активность ГР и ГП в паренхиматозных органах пищеварительной системы оценивали иммуноферментным методом (Northwest Life Science Specialties, LLC, USA).

Для подтверждения жирового повреждения паренхиматозных органов пищеварительной системы проводили гистологическое исследование печени и поджелудочной железы на препаратах, окрашенных гематоксилин-эозином по Романовскому. Морфологию тканей анализировали при помощи микроскопа фирмы «Carl Zeiss» (Германия). Статистическую обработку результатов осуществляли в программе Statistika 10.0. Вычисляли среднее арифметическое значение ( $M$ ), ошибку среднего арифметического значения ( $m$ ) и представляли в виде  $M \pm m$ . Статистическую значимость различий средних величин определяли с помощью критерия Стьюдента после проверки на нормальность распределения.

**Результаты исследования и их обсуждение.** Подтверждением развития ожирения у крыс опытных групп стало интенсивное увеличение общей массы тела (табл. 1). Так, масса

крыс опытной группы 1, находящихся на высококалорийном рационе в течение 12 недель, увеличивалась на  $189,2 \pm 11,3$  г. Через 24 недели эксперимента масса животных опытной группы 2 возрастала на  $299,5 \pm 6,1$  г. Развитие ожирения у крыс характеризовалось увеличением массы органов пищеварительной системы. По сравнению с интактной группой масса печени возрастала в 1,7 раза через 12 недель эксперимента и в 2,8 раза на 24-й неделе алиментарной жировой нагрузки ( $p < 0,001$ ). Масса поджелудочной железы у крыс опытной группы 1 увеличивалась в 2 раза, у крыс опытной группы 2 – в 3,2 раза относительно интактных животных ( $p < 0,001$ ).

Таблица 1

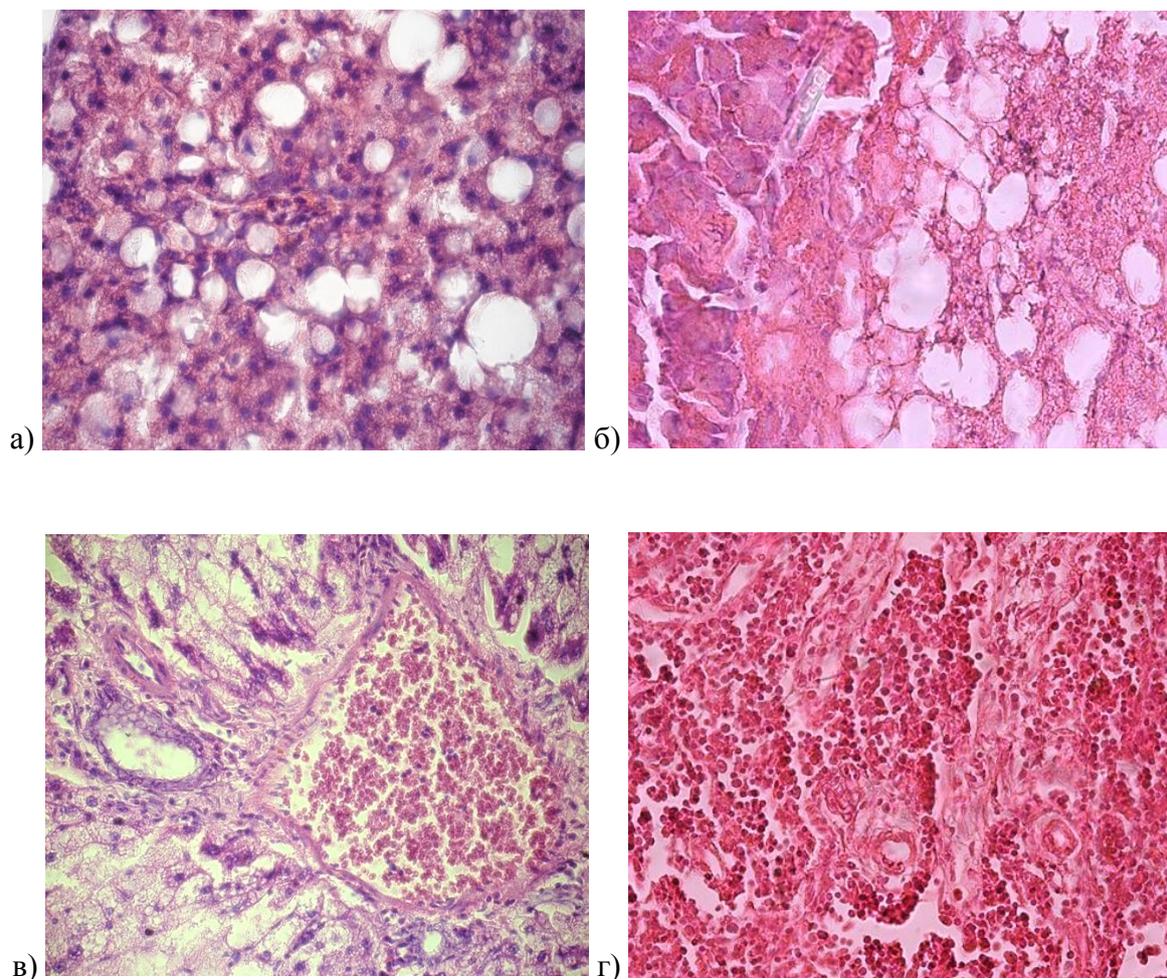
Масса печени и поджелудочной железы крыс с ожирением,  $M \pm m$

Масса	Интактная группа	Опытная группа 1	Опытная группа 2
Общая масса тела крысы	$172,2 \pm 5,3$	$361,5 \pm 12,7^{***}$	$471,9 \pm 69,1^{**}$
Печень, г	$9,1 \pm 0,3$	$16,2 \pm 1,0^{***}$	$27,9 \pm 4,1^{***}$
Поджелудочная железа, г	$3,5 \pm 0,1$	$7,0 \pm 0,3^{***}$	$11,2 \pm 0,2^{***}$

Примечание здесь и в таблице 2: (\*) – статистическая значимость различий относительно интактной группы: \* –  $p < 0,05$ ; \*\* –  $p < 0,01$ ; \*\*\* –  $p < 0,001$ .

Полученные данные свидетельствуют, что воздействие на крыс высококалорийным рационом в течение 12–24 недель приводит к развитию ожирения и гипертрофии паренхиматозных органов пищеварительной системы.

Гистологический анализ поджелудочной железы и печени у крыс при формировании ожирения выявил значительные изменения морфологии органов в сравнении с крысами интактной группы. Через 12 недель развития жирового повреждения в тканях поджелудочной железы у крыс опытной группы 1 наблюдались признаки жировой инфильтрации панкреатических клеток, что характеризовало формирование стеатоза (рис. 1а). На препаратах печени обнаруживались признаки стеатогепатита в виде жировой дистрофии гепатоцитов в сочетании с фокальными участками некроза ткани (рис. 1б). Исследование морфологии тканей паренхиматозных органов пищеварительной системы крыс опытной группы 2 выявило очаги некроза с воспалительно-клеточной инфильтрацией и нарушение дольчатого строения тканей, формирование фиброзной трансформации как в поджелудочной железе, так и в печени (рис. 1в, 1г).



*Гистологическое строение печени и поджелудочной железы у крыс с жировым повреждением: а) печень крысы опытной группы 1; б) печень крысы опытной группы 2; в) поджелудочная железа крысы опытной группы 1; г) поджелудочная железа крысы опытной группы 2. Окраска гематоксилин-эозином. Ув. ок.  $\times 15$ , ув. об.  $\times 40$*

Активность редокс-системы глутатиона в печени крыс опытной группы 1 через 12 недель жирового повреждения характеризовалось незначительным снижением количества восстановленного глутатиона ( $p < 0,01$ ), тогда как активность ГП и ГР уменьшалась в 2,5 и 4,5 раза ( $p < 0,001$ ) соответственно относительно животных интактной группы (табл. 2).

Таблица 2

Динамика изменений показателей редокс-системы глутатиона в печени и поджелудочной железе крыс с ожирением,  $M \pm m$

Показатели	Интактная группа	Опытная группа 1	Опытная группа 2
Печень			
Глутатион, мкг/мг белка	$7,12 \pm 0,13$	$5,21 \pm 0,17^{***}$	$4,10 \pm 0,14^{***}$
Глутатионредуктаза, нмоль НАДФН/мин/мг	$3,91 \pm 0,13$	$1,45 \pm 0,11^{***}$	$0,98 \pm 0,04^{***}$

белка			
Глутатионпероксидаза, нмоль ГЛ /мин/мг белка	2,63±0,03	1,09±0,02***	0,92±0,02***
Поджелудочная железа			
Глутатион, мкг/мг белка	5,40±0,17	3,61±0,21**	2,71±0,16***
Глутатионредуктаза, нмоль НАДФН/мин/мг белка	2,10±0,13	1,36±0,09***	1,20±0,06***
Глутатионпероксидаза, нмоль ГЛ /мин/мг белка	3,79±0,19	2,53±0,13***	1,73±0,18***

Через 24 недели эксперимента у крыс опытной группы 2 наблюдалось угнетение всех компонентов глутатионового звена в печени. Концентрация ГЛ в печени снижалась в 2 раза ( $p < 0,001$ ), активность ГП и ГР – в 3 и 5 раз соответственно ( $p < 0,001$ ) по сравнению с интактными животными. Похожая динамика изменения активности редокс-системы глутатиона наблюдалась и в поджелудочной железе. Установлено, что на 12-й неделе формирования ожирения уровень глутатиона в поджелудочной железе крыс уменьшался на 49% ( $p < 0,01$ ) относительно интактных животных. Активность глутатионовых ферментов у крыс опытной группы 1 в данном органе снижалась на 35% для ГР и на 33% для ГП ( $p < 0,001$ ). Жировое повреждение пищеварительной железы в течение 24 недель значительным образом сказалось на тиол-дисульфидном статусе поджелудочной железы. Наблюдалось угнетение всех исследуемых параметров антиоксидантной защиты: уровень ГЛ снизился в 2 раза, активности ГР и ГП – в 1,7 и 2,1 раза соответственно относительно здоровых животных.

**Заключение.** Исследования жирового перерождения тканей печени и поджелудочной железы ведутся давно, но при обсуждении патогенетического механизма развития до сих пор существуют многочисленные споры о триггерах формирования и утяжеления заболеваний желез пищеварительной системы. Важную роль в прогрессировании заболевания и развитии фиброза при жировом повреждении паренхиматозных органов системы пищеварения играет окислительный стресс, триггерами которого являются липотоксичность, гипоксия, что выражается в секреции провоспалительных цитокинов, запуске процессов фиброгенеза и прогрессировании патологии. Дефицит активности систем антиоксидантной защиты может быть основным фактором прогрессирования жировой болезни печени и поджелудочной железы. Однако механизмы, лежащие в основе защитного действия антиоксидантов, нуждаются в изучении. Редокс-система глутатиона задействована в устранении продуктов перекисного окисления макромолекул, таких как липиды, белки. Современные результаты исследований предполагают, что ферментная редокс-система глутатиона может быть важной терапевтической мишенью для предотвращения прогрессирования и развития заболеваний паренхиматозных органов пищеварительной системы за счет уменьшения продукции

воспалительных цитокинов, ингибирования продукции активных форм кислорода и, соответственно, реализации мощного антифиброзного эффекта.

Результаты нашего исследования показали, что нарушение тиол-дисульфидного гомеостаза и истощение компонентов глутатионового звена антиоксидантной системы происходят на начальных этапах жирового повреждения паренхиматозных органов пищеварительной системы. Прогрессирование повреждения печени и поджелудочной железы приводило к большому дефициту антиоксидантной защиты, проявившемуся в снижении уровня глутатиона и активности глутатионзависимых ферментов. Угнетение активности антиоксидантной защиты служит идеальным фактором для гиперпродукции реактивных форм кислорода, повышения липотоксичности, повреждения макромолекул, деструкции органелл и клеток [7]. Патогенетической основой жирового повреждения паренхиматозных органов пищеварительной системы является дисфункция глутатионового звена антиоксидантной защиты [8]. Интересно, что динамика изменений состояния тиол-дисульфидного звена имела однонаправленный характер как в печени, так и в поджелудочной железе. Полученные результаты исследования показывают тесную структурную и функциональную взаимосвязь между состоянием паренхиматозных органов пищеварительной системы при ожирении, что необходимо учитывать при разработке диагностических и лечебных программ.

### **Список литературы**

1. Cheng S.B., Liu H.T., Chen S.Y., Lin P.T., Lai C.Y., Huang Y.C. Changes of oxidative stress, glutathione, and its dependent antioxidant enzyme activities in patients with hepatocellular carcinoma before and after tumor resection. PLoS one. 2017. Vol. 12. no. 1. e0170016. DOI: 10.1371/journal.pone.0170016.
2. Simioni C., Zauli G., Martelli A.M., Vitale M., Sacchetti G., Gonelli A., Neri L.M. Oxidative stress: role of physical exercise and antioxidant nutraceuticals in adulthood and aging. Oncotarget. 2018. Vol. 9. P. 17181-17198. DOI: 10.18632/oncotarget.24729.
3. Erel O., Erdoğan S. Thiol-disulfide homeostasis: an integrated approach with biochemical and clinical aspects. Turk. J. Med. Sci. 2020. Vol. 50. P. 1728-1738. DOI: 10.3906/sag-2003-64.
4. Benton Sh.M., Liang Zh., Hao L., Liang Y., Gautam H., Jones D., Coopersmith C., Ziegler T. Differential regulation of tissue thiol-disulfide redox status in a murine model of peritonitis. Journal of Inflammation. 2012. Vol. 9. no 1. P. 1-6.
5. Dertli R., Keskin M., Biyik M., Ataseven H., Polat H., Demir A., Oltulu P., Neşelöglu S., Erel O., Asil M. Dynamic thiol-disulfide homeostasis is disturbed in hepatitis B virus-related chronic

hepatitis and liver cirrhosis. Turk. J. Med. Sci. 2018. Vol. 48. P. 985-992 DOI: 10.3906/sag-1803-135.

6. Кытикова О.Ю., Новгородцева Т.П., Денисенко Ю.К., Ковалевский Д.А. Метаболические и генетические детерминанты нарушения липидного обмена при неалкогольной жировой болезни печени // «Российский журнал гастроэнтерологии, гепатологии, колопроктологии». 2020. Т. 30. № 2. С. 15-25. DOI: 10.22416/1382-4376-2020-30-2-15-25.

7. Machado M., Diehl A. Pathogenesis of nonalcoholic steatohepatitis gastroenterology. 2016. Vol. 150. No. 8. P. 1769-1777. DOI: 10.1053/j.gastro.2016.02.066.

8. Караман (Денисенко) Ю.К., Новгородцева Т.П., Бивалькевич Н.В., Лобанова Е.Г. Способ моделирования неалкогольного стеатогепатита у крыс // Патент РФ № 2394281. Патентообладатель Владивостокский филиал ДНЦ ФПД – НИИМКВЛ. 2010. Бюл. № 19.