

••• БІОХІМІЯ ••• BIOCHEMISTRY •••

УДК: [577.127.3+57.044: 577.112.386]

Вплив відновленого глутатіону на показники оксидативного стресу й обміну гему в печінці та крові щурів при введенні хлориду геміну *in vivo* I.В.Нікітченко, А.К.Павлій, Т.В.Бараннік, В.Г.Гевоян

Гем (залізо-протопорфірин IX) бере участь у реалізації різноманітних клітинних функцій. Вивільнення гему за умов гемолізу або при пошкодженні внутрішньоклітинних гемопротейнів призводить до його накопичення в тканинах і, як наслідок, до активації вільнорадикальних процесів. Відновлений глутатіон (GSH) функціонує як ендogenous водорозчинний антиоксидант і регулятор редокс-статусу клітин, але його вплив на розвиток оксидативного стресу за дії геміну у ссавців залишається не вивченим. Метою цієї роботи було дослідження впливу хлориду геміну на активність деяких гемопротейнів та низку показників прооксидантно-антиоксидантного статусу печінки та крові щурів при модуляції рівня GSH *in vivo*. Дослідження проводили на білих щурах-самцях масою 170–280 г. Хлорид геміну і GSH вводили внутрішньочеревинно. Об'єктами дослідження були плазма крові, гомогенат та постмітохондріальна фракція печінки. За введення хлориду геміну (50 мг/кг маси тіла) встановлено зростання рівня гемовмісних продуктів у крові і вільного гему в печінці щурів, що супроводжувалось активацією вільнорадикальних процесів у цих тканинах. Про накопичення вільного гему в печінці свідчило підвищення активності холоферменту та ступеню насиченості гемом триптофан-2,3-діоксигенази (ТДО). Попереднє введення GSH (500 мг/кг маси тіла) за 0,5 год до введення хлориду геміну приводило до нормалізації вмісту GSH, але не запобігало накопиченню гему, зниженню рівня тригліцеридів та підвищенню вмісту гідропероксидів ліпідів у плазмі крові щурів під впливом геміну. У печінці введення GSH попереджало збільшення вмісту гідропероксидів ліпідів і карбонільних похідних білків, підвищення активності холоферменту ТДО, зменшувало ступінь насиченості ТДО гемом. Всі ці зміни відбувались на тлі підвищення вмісту GSH в печінці. Каталазна активність в печінці при введенні хлориду геміну та після сумісного введення глутатіону і геміну не відрізнялась від контролю. Аналіз взаємозв'язку досліджених показників виявив тісну позитивну кореляцію вмісту GSH в плазмі та печінці ($r=0,85$; $p<0,001$), що узгоджується з даними літератури про значну роль печінки у забезпеченні інших тканин відновленим глутатіоном. Крім того, виявлено негативну кореляцію вмісту продуктів ліпопероксидації й вмісту тригліцеридів у плазмі ($r=-0,52$; $p<0,05$), що свідчить про участь ненасичених жирних кислот тригліцеридів як субстратів пероксидних процесів за дії геміну. Значущою кореляцією вмісту GSH і гідропероксидів, а також вмісту GSH і рівня гемовмісних продуктів у плазмі крові не встановлено. Отже, водорозчинний антиоксидант відновлений глутатіон не є достатньо ефективним для попередження пошкоджень ліпідних компонентів крові за умов введення хлориду геміну в обраній дозі. В печінці, навпаки, введення GSH запобігало накопиченню гему і розвитку оксидативного стресу за дії геміну, що, очевидно, пов'язано зі збільшенням вмісту GSH в цьому органі.

Ключові слова: обмін гему; відновлений глутатіон; оксидативний стрес; печінка; плазма крові.

Effect of reduced glutathione on the indexes of oxidative stress and heme metabolism in liver and blood of rats under hemin chloride injection *in vivo* I.V.Nikitchenko, T.V.Barannik, A.K.Pavliy, V.G.Gevoian

Heme (iron-protoporphyrin IX) is involved in various cellular functions. The release of heme under hemolysis or under the damage of intracellular hemeproteins leads to its accumulation in tissues and, as a result, to the activation of free radical processes. Reduced glutathione (GSH) functions as an endogenous water-soluble antioxidant and a regulator of cells redox status, but its effect on the development of oxidative stress under hemin action in mammals remains not investigated. The aim of this work was to study the effect of hemin chloride on some hemeproteins activity and a number of prooxidant-antioxidant status indexes in rat liver and blood under GSH level modulation *in vivo*. White male rats weighing 170–280 g were taken for investigation. Hemin chloride and GSH were injected intraperitoneally. Blood plasma, homogenate, and postmitochondrial fraction of liver were the objects of study. Hemin chloride injection (50 mg/kg body weight) caused the increase in heme-containing products level in blood and free heme level in liver of rats, which was accompanied by the activation of free radical processes in these tissues. The accumulation of free heme in liver was proved by an increase in tryptophan 2,3-dioxygenase (TDO) holoenzyme activity and heme saturation. The pretreatment by GSH (500 mg/kg body weight) 0.5 h before hemin chloride injection normalized GSH content, but did not prevent heme accumulation, the decrease in triglycerides level and the

increase in lipid hydroperoxides content in rat blood plasma under hemin action. In liver, GSH injection prevented the increase in lipid hydroperoxides and protein carbonyl derivatives concentration as well as in TDO holoenzyme activity, and decreased the degree of TDO heme saturation. All these changes occurred under GSH content increase in liver. Catalase activity in liver did not differ from the control values after hemin chloride injection as well as after glutathione and hemin coadministration. The analysis of relationship between parameters studied in this work revealed the strong positive correlation between GSH content in plasma and liver ($r=0.85$; $p<0.001$), which was consistent with literature data on the significant role of liver in supplying other tissues with reduced glutathione. A negative correlation was found between lipid peroxidation products and triglycerides content in plasma ($r=-0.52$; $p<0.05$), which indicated the participation of triglycerides unsaturated fatty acids as substrates in the peroxidation processes under hemin action. No significant correlation between GSH and hydroperoxides content, as well as between GSH and heme-containing products levels in blood plasma was revealed. Thus, the water-soluble antioxidant glutathione was not effective enough to prevent damage of lipid components in blood under hemin chloride action in the selected dose. In the liver, on the contrary, GSH injection prevented heme accumulation and oxidative stress development under hemin action, which was obviously associated with an increase in the GSH content in this organ.

Key words: *heme metabolism; reduced glutathione; oxidative stress; liver; blood plasma.*

Влияние восстановленного глутатиона на показатели оксидативного стресса и обмена гема в печени и крови крыс при введении хлорида гемина *in vivo*

И.В.Никитченко, А.К.Павлий, Т.В.Баранник, В.Г.Гевоян

Гем (железо-протопорфирин IX) принимает участие в реализации различных клеточных функций. Высвобождение гема в условиях гемолиза или при повреждении внутриклеточных гемопротеинов приводит к его накоплению в тканях и, как следствие, к активации свободнорадикальных процессов. Восстановленный глутатион (GSH) функционирует как эндогенный водорастворимый антиоксидант и регулятор редокс-статуса клеток, однако его влияние на развитие оксидативного стресса при действии гемина у млекопитающих остается неизученным. Целью настоящей работы было исследование влияния хлорида гемина на активность некоторых гемопротеинов и ряд показателей прооксидантно-антиоксидантного статуса печени и крови крыс при модуляции уровня GSH *in vivo*. Исследования проводились на белых крысах-самцах массой 170–280 г. Хлорид гемина и GSH вводили внутривентриально. Объектами исследования явились плазма крови, гомогенат и постмитохондриальная фракция печени. При введении хлорида гемина (50 мг/кг массы тела) установлено увеличение уровня гемосодержащих продуктов в крови и свободного гема в печени крыс, которое сопровождалось активацией свободнорадикальных процессов в этих тканях. О накоплении свободного гема в печени свидетельствовало повышение активности холофермента и степени насыщенности гемом триптофан-2,3-диоксигеназы (ТДО). Предварительное введение GSH (500 мг/кг массы тела) за 0,5 ч до введения хлорида гемина приводило к нормализации содержания GSH, но не предотвращало накопление гема, снижение уровня триглицеридов и повышение содержания гидроперекисей липидов в плазме крови крыс под влиянием гемина. В печени введение GSH предупреждало увеличение содержания гидроперекисей липидов и карбонильных производных белков, повышение активности холофермента ТДО, уменьшало степень насыщенности ТДО гемом. Все указанные изменения происходили на фоне повышения содержания GSH в печени. Каталазная активность в печени при введении хлорида гемина и после совместного введения глутатиона и гемина не отличалась от контроля. Анализ взаимосвязи исследованных показателей выявил тесную положительную корреляцию содержания глутатиона в плазме и печени ($r=0,85$; $p<0,001$), что согласуется с данными литературы о значительной роли печени в обеспечении других тканей восстановленным глутатионом. Кроме того, выявлена отрицательная корреляция содержания продуктов липопероксидации и содержания триглицеридов в плазме ($r=-0,52$; $p<0,05$), что свидетельствует об участии ненасыщенных жирных кислот триглицеридов как субстратов перекисных процессов при действии гемина. Значимой корреляции содержания GSH и гидропероксидов, а также уровней GSH и гемосодержащих продуктов в плазме крови не установлено. Таким образом, водорастворимый антиоксидант восстановленный глутатион не является достаточно эффективным для предупреждения повреждений липидных компонентов крови в условиях введения хлорида гемина в выбранной дозе. В печени, наоборот, введение GSH предотвращало накопление гема и развитие оксидативного стресса при действии гемина, что, очевидно, связано с увеличением содержания GSH в этом органе.

Ключевые слова: *обмен гема; восстановленный глутатион; оксидативный стресс; печень; плазма крови.*

Вступ

Гем (залізо-протопорфірин IX) бере участь у реалізації різноманітних клітинних функцій як простетична група гемопротейнів та як алостеричний регулятор специфічних білків. В організмі ссавців значна кількість гему зосереджена у гемоглобіні крові та внутрішньоклітинних цитохромах. Руйнування гемопротейнів за умов гемолізу або порушень роботи електронтранспортних ланцюгів викликає вивільнення й накопичення молекул гему в тканинах. Вільний гем проявляє властивості ліпофільного прооксиданту, тому його надлишок спричинює пошкодження клітин через пряму дію на мембранні структури або активацію вільнорадикальних процесів (Yalamanoglu et al., 2018; Porto et al., 2007). Один із шляхів обмеження негативних ефектів вільного гему – це утворення комплексів гему з гем-зв'язувальними білками крові (гемопексин, альбумін та ін.) та інших тканин з подальшою його деградацією в гемоксигеназній реакції (Vinchi et al., 2013). Порушення метаболізму гему обумовлює розвиток низки серйозних захворювань, в тому числі деяких видів анемії та порфірії, які виникають при дефіциті або пригніченні активності ферментів біосинтезу гему (Mense, Zhang, 2006). Крім того, деякі патології можуть ускладнюватись вивільненням гему із гемопротейнів у значній кількості, як це відбувається за умов розвитку гемолітичних процесів (Chiabrando et al., 2014).

Відновлений глутатіон (GSH) належить до ендогенних водорозчинних антиоксидантів й, поряд з прямим знешкодженням вільних радикалів, функціонує як кофактор і субстрат ферментативної антиоксидантної системи. Він безпосередньо впливає на редокс-статус клітин як відновлений тіол з найбільшою (мілімолярною) концентрацією. Відомо, що введення *in vivo* відновленого глутатіону є ефективним захистом крові, печінки та деяких інших тканин від пошкоджуючої дії важких металів (Barannik et al., 2005), але вплив GSH на розвиток оксидативного стресу *in vivo* за дії геміну на ссавців залишається не вивченим. Метою цієї роботи було дослідити вплив хлориду геміну (ХГ) на активність деяких гемопротейнів та низку показників прооксидантно-антиоксидантного статусу печінки та крові щурів при модуляції рівня GSH *in vivo*.

Об'єкти та методи дослідження

Дослідження проводили на білих щурах-самцях масою 170–280 г, які знаходились на стандартному раціоні віварію. Тварини були розділені на три групи: (1) тварини, яким внутрішньочеревинно вводили хлорид геміну в дозі 50 мг/кг маси тіла; (2) тварини, яким за 0,5 год до ін'єкції геміну внутрішньочеревинно вводили відновлений глутатіон в дозі 500 мг/кг, (3) інтактні тварини (контроль). Тварин декапітували під легким ефірним наркозом через 2 год після введення хлориду геміну. Експерименти проведені з дотриманням Європейської конвенції із захисту хребетних тварин, яких використовують в експериментальних та інших наукових цілях (Страсбург, 1986, Директиви ЄЕС № 609 від 24.11.1986 і наказ МОЗ України № 690 від 23.09.2009).

Об'єктами дослідження були плазма крові, гомогенат та постмітохондріальна фракція печінки щурів, які після виділення поміщали у пластикові ампули з кришкою (об'єм 1,5 мл) для заморожування у рідкому азоті. Перед вимірюваннями проби розморожували у термостаті (водяній бані) при 37°C. Рівень гідропероксидів ліпідів визначали спектрофотометрично за реакцією з тіобарбітуровою кислотою, як описано в роботі (Ohkawa et al., 1979). Рівень карбонільювання білків визначали в постмітохондріальній фракції печінки спектрофотометрично при 360 нм та 550 нм за реакцією з 2,4-динітрофенілгідразином (ДНФГ) і виражали в нмоль білкових карбонільних похідних на 1 мг білка. Спонтанне утворення карбонільних груп білків визначали без, а індуковане металами утворення карбонільних груп білків – з додаванням розчину, що містив 1 мМ Fe²⁺, 1 мМ трилон Б та 10 мМ H₂O₂ (Levine et al., 1994). Накопичення гемовмісних продуктів оцінювали за оптичною густиною (ΔE) плазми крові в Soret-області 390–450 нм (Hrkal, Mueller-Eberhard, 1971). Вміст відновленого глутатіону визначали спектрофотометрично (305 нм) за кількістю утвореного комплексу з алоксаном (Patterson, Lazarow, 1955). Вміст загального холестерину та тригліцеридів в плазмі крові визначали стандартними ензиматичними методами, як описано (Tietz, 1995), й виражали в ммоль/л. Вміст протеїну визначали за методом Лоурі в модифікації Міллера (Miller, 1959). Активність гем-зв'язувального білка триптофан-2,3-диоксигенази (ТДО, КФ 1.13.11.11) визначали в гомогенаті печінки спектрофотометричним методом при 365 нм за вмістом утвореного кінуреніну (Badawy, Evans, 1973) та виражали в нмоль кінуреніну/год на 1 мг білка. Насиченість ТДО гемом оцінювали за співвідношенням активності холоферменту до загальної активності ферменту, виражали у відсотках та використовували як показник вмісту вільного гему в печінці

(Badawy, Evans, 1973). Активність каталази (КФ 1.11.1.6) визначали в постмітохондріальній фракції печінки спектрофотометрично (240 нм) за швидкістю зменшення кількості пероксиду водню, як описано (Muller et al., 1997), і виражали в мкмоль H_2O_2 /хв на 1 мг білка.

Статистичний аналіз одержаних результатів здійснювали за допомогою комп'ютерної програми Past (Hammer et al., 2001). Тип розподілу визначали за допомогою *W*-критерію Шапіро-Уїлка. Залежно від типу розподілу результати представляли як середні значення та стандартне відхилення або як медіани та квартилі, достовірність різниці між групами даних розраховували з використанням *t*-критерію Стьюдента або непараметричного *U*-критерію Манна-Уїтні. Розходження вважали статистично значущими при $p < 0,05$. Кореляцію між показниками розраховували за критерієм Пірсона або Спірмена, залежно від типу розподілу.

Результати і обговорення

Показники прооксидантно-антиоксидантного статусу плазми крові при введенні хлориду геміну або сумісного введення геміну та відновленого глутатіону надані у табл. 1. Через 2 години після введення геміну *in vivo* у вибраній дозі встановлено зростання поглинання плазми крові в області Soret у два рази, що свідчить про накопичення гемовмісних продуктів у кров'яному руслі.

Таблиця 1.

Вміст відновленого глутатіону, гемовмісних продуктів, продуктів ліпопероксидації, холестерину та тригліцеридів у плазмі крові щурів після введення хлориду геміну або хлориду геміну на тлі попереднього введення відновленого глутатіону ($M \pm s$ або Me (25%; 75%), $n=5-6$, * $p < 0,05$ відносно контролю, ** $p < 0,01$ відносно контролю)

| Показник | Одиниці | Контроль | Гемін | GSH + Гемін |
|------------------------|---------------------|-------------------------|--------------------------|--------------------------|
| GSH | нмоль/мг білка | 2,66 ± 0,79 | 1,33 ± 0,71* | 2,56 ± 1,00 |
| Гемовмісні продукти | ΔA/мг білка | 0,020 (0,016; 0,020) | 0,040 (0,028; 0,073)* | 0,043 (0,025; 0,057)* |
| Гідропероксиди ліпідів | нмоль МДА/ мг білка | 0,043 ± 0,007 | 0,055 ± 0,005* | 0,060 ± 0,007** |
| Холестерол | ммоль/л | 1,42 ± 0,45 | 1,46 ± 0,39 | 1,11 ± 0,23 |
| Тригліцериди | ммоль/л | 0,44 ± 0,11 | 0,26 ± 0,06* | 0,33 ± 0,05* |

Джерелом гемовмісних продуктів у плазмі може бути як екзогенний гем, що надійшов до крові, так і гем лізованих під дією хлориду геміну еритроцитів. Введення хлориду геміну викликало зниження вмісту відновленого глутатіону на 50% і підвищення рівня гідропероксидів ліпідів на 28% у порівнянні з контрольними показниками. Вміст холестеролу не змінювався, а вміст тригліцеридів у плазмі крові знижувався на 40% відносно контролю після ін'єкції хлориду геміну. Ймовірно, ненасичені жирні кислоти тригліцеридів за цих умов залучені до реакцій вільно-радикального окислення, що і спричинило зниження рівня цих сполук у плазмі крові.

Попереднє введення відновленого глутатіону не запобігало зниженню рівня тригліцеридів (75% від контролю), накопиченню гемму (215% від контролю) та підвищенню вмісту гідропероксидів ліпідів (141% від контролю) у плазмі крові щурів під впливом геміну, але нормалізувало вміст глутатіону (табл. 1). Відомо, що не зв'язаний з білками гем виявляє прооксидантні ефекти за декількома механізмами: безпосередня участь гемму в окисно-відновних реакціях завдяки присутності іону заліза у його складі, накопичення вільного заліза внаслідок деградації гемму (Dutra, Bozza, 2014), утворення окиснених форм ліпопротеїнів низької щільності (Yalamanoglu et al., 2018), активація сигнальних шляхів, що призводить до ферментативного утворення активних форм кисню (Porto et al., 2007).

Триптофан-2,3-діоксигеназа є одним із гем-зв'язувальних білків печінки, що може блокувати прооксидантні ефекти вільного гемму за рахунок зв'язування його апоферментом ТДО (Badawy, 2017). Для оцінки накопичення вільного гемму в печінці використовували показники активності холоферменту та ступеню насиченості ТДО гемом (табл. 2). Введення геміну призводило до підвищення у 3 рази активності холоферменту в порівнянні з контрольними значеннями. Загальна активність ТДО не змінювалась після ін'єкції геміну, а ступінь насиченості ферменту гемом зростав у 3 рази. Останнє свідчить про накопичення вільного гемму в цитоплазмі клітин печінки. Джерелом

вільного гему за цих умов може бути гем, що надійшов до клітин із кров'яного русла неспецифічним шляхом, та/або гем, що вивільнився із внутрішньоклітинних гемопротеїнів (Worthington et al., 2001).

Таблиця 2.
Активність холоферменту, загальна активність та насиченість гемом ТДО в печінці щурів після введення хлориду геміну або хлориду геміну на тлі попереднього введення відновленого глутатіону (Me (25%; 75%), n=5–6, *p<0,05 відносно контролю, ** p<0,01 відносно контролю)

| Показник | Одиниці | Контроль | Гемін | GSH + Гемін |
|---------------------|-----------------------------------|----------------------|------------------------|-----------------------|
| Холофермент | нмоль кінуреніну/ год/мг білка | 1,03 (0,79; 1,42) | 3,14 (1,47; 6,77)* | 1,23 (1,11; 1,60) |
| Загальна активність | нмоль кінуреніну/ год/мг білка | 3,52 (2,54; 4,53) | 4,91 (2,96; 6,98) | 2,96 (2,89; 3,48) |
| Насиченість гемом | % | 24,3 (22,1; 25,0) | 70,7 (52,6; 89,0)** | 46,6 (33,2; 60,5)* |

Авторами роботи (Liao et al., 2007) також продемонстровано, що підвищення насиченості ТДО гемом відбувається за рахунок підвищення активності холоферменту як при введенні щурам *in vivo* геміну, так і при інкубації геміну з гомогенатом печінки *in vitro*. Попереднє введення відновленого глутатіону повністю запобігало підвищенню активності холоферменту під дією хлориду геміну і не чинило впливу на загальну активність ферменту. Ступінь насиченості ТДО гемом знижувався з 71% до 47%, але залишався достовірно вищим порівняно з контрольними тваринами (табл. 2).

Як встановлено в наших експериментах, накопичення вільного гему в печінці після ін'єкції хлориду геміну супроводжувалося збільшенням вмісту гідропероксидів ліпідів на 29% у порівнянні з контрольними тваринами (табл. 3).

Таблиця 3.
Показники прооксидантно-антиоксидантного статусу печінки щурів після введення хлориду геміну або хлориду геміну на тлі попереднього введення відновленого глутатіону (M±s, n=7–9, *p<0,05 відносно контролю, ** p<0,01 відносно контролю)

| Показник | Одиниці | Контроль | Гемін | GSH + Гемін |
|---|--|---------------|---------------|---------------|
| Вміст гідропероксидів ліпідів | нмоль МДА/мг білка | 0,48 ± 0,10 | 0,62 ± 0,10* | 0,52 ± 0,14 |
| Рівень спонтанного карбонілювання білків | нмоль білкових карбонільних похідних/мг білка | 1,27 ± 0,24 | 1,72 ± 0,40* | 1,39 ± 0,32 |
| Рівень індукованого карбонілювання білків | нмоль білкових карбонільних похідних/мг білка | 4,67 ± 0,93 | 5,71 ± 1,60 | 3,38 ± 0,82* |
| Вміст GSH | нмоль/мг білка | 39,2 ± 8,2 | 54,7 ± 13,4 | 83,6 ± 12,4* |
| Каталазна активність | мкмоль H ₂ O ₂ /хв на 1 мг білка | 0,132 ± 0,031 | 0,111 ± 0,034 | 0,107 ± 0,028 |

Підвищення рівня гідропероксидів ліпідів свідчить про активацію геміном вільнорадикальних процесів у мембранних структурах гепатоцитів. Найбільш чутливими до дії високореакційного гідроксильного радикалу, що утворюється в реакціях за участю активних метаболітів кисню та іонів заліза, є ліпіди за рахунок вмісту в них ненасичених жирних кислот, але й інші макромолекули також піддаються окисненню. Окисна модифікація білків може відбуватись як за пептидною групою, так і за боковими радикалами амінокислотних залишків (Lushchak, 2007). Треба відзначити, що введення хлориду геміну призводило до підвищення рівня спонтанного карбонілювання білків на 36% у порівнянні з контрольними значеннями, однак не впливало на рівень індукованого карбонілювання білків. Відомо, що утворення карбонільних груп може відбуватися не тільки в

результаті окиснення залишків амінокислот безпосередньо активними формами кисню, але й при взаємодії білків з продуктами окиснення ліпідів, зокрема малоновим діальдегідом (Trachootham et al., 2008; Lushchak, 2007).

Попереднє введення відновленого глутатіону повністю запобігало підвищенню вмісту гідропероксидів ліпідів і рівня спонтанного карбонілювання білків під впливом хлориду геміну. Рівень індукованого карбонілювання білків за умов спільного введення відновленого глутатіону і геміну був на 28% нижчий від цього показника у контрольних тварин. При дослідженні антиоксидантної ланки клітин печінки встановлено, що ні введення хлориду геміну, ні спільне введення відновленого глутатіону і хлориду геміну не впливає на активність каталази. Вміст відновленого глутатіону не змінюється при введенні хлориду геміну, але за умов спільного введення відновленого глутатіону і геміну цей показник підвищується і складає 213% від контрольного рівня.

Аналіз взаємозв'язку досліджених показників виявив тісну позитивну кореляцію вмісту глутатіону в плазмі та печінці ($r=0,85$, $p<0,001$), що узгоджується з даними літератури про значну роль печінки у забезпеченні інших тканин відновленим глутатіоном (Lauterburg et al., 1984). Виявлено також негативну кореляцію вмісту продуктів ліпопероксидації й вмісту тригліцеридів у плазмі ($r=-0,52$, $p<0,05$), що свідчить про участь ненасичених жирних кислот тригліцеридів як субстратів пероксидних процесів за дії геміну. Значущою кореляцією вмісту GSH і гідропероксидів, а також вмісту GSH і рівня гемовмісних продуктів у плазмі крові не встановлено, отже водорозчинний антиоксидант глутатіон не є достатньо ефективним для попередження пошкоджень ліпідних компонентів крові молекулами геміну. В печінці, на відміну від крові, введення відновленого глутатіону у вибраній дозі нормалізувало прооксидантно-антиоксидантний стан, порушений за дії геміну. Цей захисний ефект, очевидно, пов'язаний зі збільшенням в гепатоцитах концентрації GSH, який може безпосередньо взаємодіяти з деякими активними формами кисню. Крім того, GSH використовується в реакціях, каталізуємих глутатіонпероксидазами, що відновлюють гідропероксиди ліпідів, і глутатіон-S-трансферазами, що забезпечують кон'югацію GSH з електрофільними сполуками, у тому числі з вільним гемом (Espinoza-Diez et al., 2015; Powers et al., 2011). Обмеження процесів вільнорадикального окиснення також може викликати зменшення кількості пошкоджених внутрішньоклітинних гемопротеїнів, отже, вмісту вільного геміну в гепатоцитах. Іншим фактором нормалізації рівню геміну в печінці, ймовірно, є менше надходження геміну з кров'яного русла за умов введення глутатіону, що становить інтерес для подальшого дослідження.

Висновки

Через 2 години після введення геміну у дозі 50 мг/кг маси тіла спостерігалось зниження вмісту GSH в плазмі крові, зростання рівня гемовмісних сполук у крові і вільного геміну в печінці щурів. Ці зміни супроводжувались окисними пошкодженнями ліпідних й білкових молекул в крові та печінці, що є ознаками розвитку оксидативного стресу в цих тканинах.

Введення відновленого глутатіону у дозі 500 мг/кг за 0,5 год до ін'єкції геміну запобігало падінню вмісту GSH, але не чинило вираженого захисного ефекту на інші досліджені показники плазми крові. У крові зберігався підвищений під впливом геміну рівень гемовмісних сполук та продуктів ліпопероксидації й знижений вміст тригліцеридів.

У печінці, навпаки, введення GSH виявилось ефективним засобом попередження розвитку оксидативного стресу, про що свідчить нормалізація рівня гідропероксидів ліпідів та білкових карбонільних похідних, а також зниження рівня вільного геміну. Вказані зміни спостерігались на фоні підвищення в печінці вмісту GSH, що, можливо, обумовлено зменшенням його транспорту до крові за умов надходження екзогенного глутатіону.

Список літератури / References

- Badawy A.A. Kynurenine pathway of tryptophan metabolism: regulatory and functional aspects // *Int. J. Tryptophan Res.* – 2017. – Vol.10. – P. 1–20.
- Badawy A.A.-B., Evans M. The effects of chemical porphyrins and drugs on the activity of rat liver tryptophan pyrrolase // *Biochem. J.* – 1973. – Vol.136, no.4. – P. 885–892.

- Barannik T.V., Inshina N.M., Kaliman P.A. Free heme pool and activity of key enzyme of heme synthesis in the rat liver under action of agents affecting reduced glutathione level // *Ukr. Biokhim. Zh.* (1999). – 2005. – Vol.77, no.5. – P. 120–122.
- Chiabrando D., Vinchi F., Fioritoet V. *al.* Heme in pathophysiology: a matter of scavenging, metabolism and trafficking across cell membranes // *Frontiers in Pharmacology*. – 2014. – Vol.5. – 24p.
- Dutra F.F., Bozza M.T. Heme on innate immunity and inflammation // *Frontiers in pharmacology*. – 2014. – Vol.5. – 20p.
- Espinosa-Diez C., Miguel V., Mennerich D. *et al.* Antioxidant responses and cellular adjustments to oxidative stress // *Redox Biology*. – 2015. – Vol.6. – P. 183–197.
- Hammer Ø., Harper D. A. T., Ryan P.D. Past: Paleontological Statistics Software Package for Education and Data Analysis // *Palaeontologia Electronica*. – 2001. – Vol.4, no.1. – Art.4. – 9p.
- Hrkal Z., Mueller-Eberhard U. Partial characterization of the heme-binding serum glycoproteins rabbit and human hemopexin // *Biochemistry*. – 1971. – Vol.10, no.10. – P. 1746–1750.
- Lauterburg B.H., Adams J.D., Mitchell J.R. Hepatic glutathione homeostasis in the rat: efflux accounts for glutathione turnover // *Hepatology*. – 1984. – Vol.4, no.4. – P. 586–590.
- Levine R.L., Williams J.A., Stadtman E.R., Shacter E. Carbonyl assays for determination of oxidatively modified proteins // *Methods Enzymol.* – 1994. – Vol.233. – P. 346–357.
- Liao M., Pabarcus M.K., Wang Y. *et al.* Impaired dexamethasone-mediated induction of tryptophan 2,3-dioxygenase in heme-deficient rat hepatocytes: translational control by a hepatic eIF2 α kinase, the heme-regulated inhibitor // *J. Pharmacol. Exp. Ther.* – 2007. – Vol.323, no.3. – P. 979–989.
- Lushchak V.I. Free radical oxidation of proteins and its relationship with functional state of organisms // *Biochemistry (Mosc)*. – 2007. – Vol.72, no.8. – P. 809–927.
- Mense S.M., Zhang L. Heme: a versatile signaling molecule controlling the activities of diverse regulators ranging from transcription factors to MAP kinases // *Cell Research*. – 2006. – Vol.16, no.8. – P. 681–692.
- Miller G.L. Protein determination for large numbers of samples // *Anal. Chem.* – 1959. – Vol.31, no.5. – P. 964–966.
- Mueller S., Riedel H.D., Stremmel W. Direct evidence for catalase as the predominant H₂O₂-removing enzyme in human erythrocytes // *Blood*. – 1997. – Vol.90, no.12. – P. 4973–4978.
- Ohkawa H., Ohahi N., Jadi K. Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction // *Anal. Biochem.* – 1979. – Vol.95, no.2. – P. 351–358.
- Patterson J.W., Lazarow A. Determination of glutathione // In: D.Glick, ed. *Methods of Biochemical analysis*. Vol. 2. – Interscience, 1955. – P. 259–279.
- Porto B.N., Alves L.S., Fernández P.L. *et al.* Heme induces neutrophil migration and reactive oxygen species generation through signaling pathways characteristic of chemotactic receptors // *J. Biol. Chem.* – 2007. – Vol.282, no.33. – P. 4430–4436.
- Powers S.K., Ji L., Kavazis A.N., Jackson M.J. Reactive oxygen species: impact on skeletal muscle // *Comprehensive Physiology*. – 2011. – Vol.1, no.2. – P. 941–969.
- Tietz N.W. ed. *Clinical Guide to Laboratory Tests*, 3rd ed. – Philadelphia, PA: WB Saunders, 1995. – P.610.
- Trachootham D., Lu W., Ogasawara M.A. *et al.* Redox regulation of cell survival // *Antioxidants & Redox Signaling*. – 2008. – Vol.10, no.8. – P. 1343–1374.
- Vinchi F., De Franceschi L., Ghigo A. *et al.* Hemopexin therapy improves cardiovascular function by preventing heme-induced endothelial toxicity in mouse models of hemolytic diseases // *Circulation*. – 2013. – Vol.127, no.12. – P. 1317–1329.
- Worthington M.T., Cohn S.M., Miller S.K. *et al.* Characterization of a human plasma membrane heme transporter in intestinal and hepatocyte cell lines // *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.* – 2001. – Vol.280, no.6. – P. G1172–G1177.
- Yalamanoglu A., Deuel J.W., Hunt R.C. *et al.* Depletion of haptoglobin and hemopexin promote hemoglobin-mediated lipoprotein oxidation in sickle cell disease // *Am. J. Physiol. Lung Cell Mol. Physiol.* – 2018. – Vol.315, no.5. – P. L765–L774.

Представлено: В.В.Соколік / Presented by: V.V.Sokolik
Рецензент: Є.Е.Перський / Reviewer: Ye.E.Persky
Подано до редакції / Received: 10.10.2019

Про авторів: І.В.Нікітченко – Харківський національний університет імені В.Н.Каразіна, пл. Свободи, 4, Харків, Україна, 61022, irina.v.nikitchenko@karazin.ua, <https://orcid.org/0000-0001-5858-3382>

А.К.Павлій – Харківський національний університет імені В.Н.Каразіна, пл. Свободи, 4, Харків, Україна, 61022, akpavliy@gmail.com, <https://orcid.org/0000-0001-5760-0224>

Т.В.Бараннік – Харківський національний університет імені В.Н.Каразіна, пл. Свободи, 4, Харків, Україна, 61022, tbarannik@karazin.ua, <http://orcid.org/0000-0002-8123-3871>

В.Г.Гевоян – Харківський національний університет імені В.Н.Каразіна, пл. Свободи, 4, Харків, Україна, 61022, gevoyan@gmail.com, <https://orcid.org/0000-0001-7256-898X>

About the authors: I.V.Nikitchenko – V.N.Karazin Kharkiv National University, Svobody Sq., 4, Kharkiv, Ukraine, 61022, irina.v.nikitchenko@karazin.ua, <https://orcid.org/0000-0001-5858-3382>

A.K.Pavliy – V.N.Karazin Kharkiv National University, Svobody Sq., 4, Kharkiv, Ukraine, 61022, akpavliy@gmail.com, <https://orcid.org/0000-0001-5760-0224>

T.V.Barannik – V.N.Karazin Kharkiv National University, Svobody Sq., 4, Kharkiv, Ukraine, 61022, tbarannik@karazin.ua, <http://orcid.org/0000-0002-8123-3871>

V.G.Gevoian – V.N.Karazin Kharkiv National University, Svobody Sq., 4, Kharkiv, Ukraine, 61022, gevoyan@gmail.com, <https://orcid.org/0000-0001-7256-898X>

Об авторах: И.В.Никитченко – Харьковский национальный университет имени В.Н.Каразина, пл. Свободы, 4, Харьков, Украина, 61022, irina.v.nikitchenko@karazin.ua, <https://orcid.org/0000-0001-5858-3382>

А.К.Павлий – Харьковский национальный университет имени В.Н.Каразина, пл. Свободы, 4, Харьков, Украина, 61022, akpavliy@gmail.com, <https://orcid.org/0000-0001-5760-0224>

Т.В.Баранник – Харьковский национальный университет имени В.Н.Каразина, пл. Свободы, 4, Харьков, Украина, 61022, tbarannik@karazin.ua, <http://orcid.org/0000-0002-8123-3871>

В.Г.Гевоян – Харьковский национальный университет имени В.Н.Каразина, пл. Свободы, 4, Харьков, Украина, 61022, gevoyan@gmail.com, <https://orcid.org/0000-0001-7256-898X>