

УДК: 577.3, PACS: 82.39.Pj;82.39.Wj

## ВЛИЯНИЕ ЭКСТРАКТА ШАФРАНА НА ДИНАМИКУ АКТИВНОСТИ ФЕРМЕНТОВ КАТАЛАЗЫ, ГЛУТАТИОНПЕРОКСИДАЗЫ И СУПЕРОКСИДДИСМУТАЗЫ ПРИ РЕНТГЕНОВСКОМ ОБЛУЧЕНИИ

Рзаева И.А.

*Бакинский Государственный Университет, биологический факультет, кафедра физиологии.  
Азербайджан AZ 1148, Баку, ул. З.Халилова, 23.  
Институт Физиологии им А.И.Караева НАН Азербайджана . Азербайджан, AZ 1100 Баку,  
ул. А. Шарифзаде, 2*

*Показано, что действие рентгеновского облучения приводит к подавлению активности ферментов (каталазы, глутатионпероксидазы, супероксиддисмутазы) в различных структурах мозга. Также установлено, что рентгеновское облучение на фоне предварительного введения экстракта шафрана в большинстве случаев приводит к повышению активности ферментов в исследованных нами структурах мозга .*

**Ключевые слова:** Рентгеновское облучение, антиоксидант, каталаза, головной мозг, радиопротектор

Действие рентгеновского облучения приводит к подавлению активности исследуемых ферментов (каталазы, глутатионпероксидазы, супероксиддисмутазы) в различных структурах мозга. Также было установлено, что рентгеновское облучение на фоне предварительного введения экстракта шафрана в большинстве случаев приводит к повышению активности ферментов в исследованных нами структурах мозга.

При воздействии ионизирующих излучений развитие реакции организма обусловлено активацией свободнорадикального окисления липидов, белков, ДНК и снижением концентрации антиоксидантов и активности ряда антиоксидантных ферментов [1,2, 3]. Определение антиокислительной активности организма дает возможность наблюдать за состоянием антиоксидантной системы и регистрировать уровень окислительного стресса. Помимо этого можно оценить эффективность проводимых защитных или терапевтических мероприятий [4, 5].

Эндогенная антиоксидантная система организма обеспечивает защиту биомолекул от повреждений продуктами свободнорадикальных реакций. Данная система включает в себя ферменты (каталаза, глутатионпероксидаза, супероксиддисмутаза и др.), низкомолекулярные антиоксиданты, белки хелаторы ионов металлов с переменной валентностью и др. [6, 7]. При этом представляет интерес исследование активности эндогенной антиоксидантной системы в некоторых образованиях головного мозга при радиации.

Активность СОД определяли по методу [8], основанному на способности СОД конкурировать с нитросиним тетразолием (НСТ) за супероксидные радикалы. Состав реакционной смеси следующий:  $2,2 \times 10^{-9}$  М ксантинооксидаза,  $10^{-4}$  М ксантин,  $10^{-4}$  М ЭДТА, 0,05 М натрий-карбонатный буфер (рН 10,2),  $5 \times 10^{-4}$  М НСТ. В кювету заливается 2 мл Na-карбонатного буфера, добавляется 0,02 мл ксантина, 0,01 мл НСТ, 0,01 мл ксантинооксидазы. Ксантин-ксантинооксидаза генерирует супероксидный ион кислорода, который окисляет НСТ, и при длине волны 560 нм раствор темнеет. Далее в опытную кювету добавляют увеличивающееся количество источника СОД, которая ингибирует окисление НСТ. За единицу активности принимают количество белка, вызывающего 50% ингибирование. Вычисляли процентное ингибирование по следующей формуле:

$$T = \frac{(k - x)}{k} 100 \%$$

Активность глутатионпероксидазы измеряли по методу, предложенному Паглия и Валентине [8], основанному на том, что концентрация восстановленного глутатиона поддерживается постоянным добавлением в реакционную среду глутатионредуктазы и НАДФН, которые осуществляют восстановление окисленного глутатиона.

Активность определялась по скорости окисления НАДФН (по изменению поглощения при длине волны 340 нм). Гомогенизация тканей производилась в 0,05 М фосфатном буфере (рН 7,4). Гомогенаты центрифугировали при 10 000 оборотов в минуту в течение 40 мин. при 4°C. Надосадочные жидкости переливали в пробирки. Реакционная смесь содержала: 2 мл 0,05 М фосфатного буфера с ЭДТА ( $10^{-3}$  М),  $2 \times 10^{-2}$  М НАДФН,  $10^{-1}$  М восстановленного глутатиона, 2,2 единицы глутатионредуктазы. Реакцию начинали добавлением гидроперекиси кумола (0,15 М). Это реакция неферментативного окисления. Добавлением 0,1 мл соответствующей водорастворимой фракции запускали реакцию ферментативного окисления.

Активность глутатионпероксидазы выражается в нмоль окисленного НАДФН в мин на 1 мг белка. Расчет производился по формуле:

$$A_{\text{уд}} = \Delta E \cdot V_{\text{пробы}} / M \Gamma_{\text{белка}} \cdot 1 \text{ мин} \cdot \varepsilon,$$

где  $\varepsilon$  – коэффициент экстинкции, равный  $6,22 \cdot 10^6$ .

Скорость окисления НАДФН определяется спектрофотометрически на «Spekol – 220/221» при длине волны 340 нм.

Активность каталазы определяли по методу Bergmeyer [9]. В раствор 0,05 М  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  добавляется 0,066 М  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  до получения рН 7,0 буфера. Затем в буфер  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ -М  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  добавляется 0,06 мл 30%  $\text{H}_2\text{O}_2$ . Оптическая плотность по буферу раствора, полученного после смешивания, определяется при длине волны 240 нм. Добавляя 30%  $\text{H}_2\text{O}_2$ , оптическая плотность раствора достигается до  $0,500 \pm 0,01$ . После чего в раствор добавляется 0,02 мл суспензии, после смешивания определяется оптическая плотность. В результате реакции показатель спектрофотометра постепенно падает. На отметке  $D = 0,450$  секундомер включается, и при отметке  $D = 0,400$  он останавливается. Используя показатель времени инкубации, определяющийся по секундам, можно вычислить активность каталазы по следующей формуле:

$$A = \frac{17 \cdot 13,1}{t \cdot 0,02}$$

где,  $A$  - активность каталазы (единица / мл гомогенат),  $t$  - время инкубации (в секундах).

**Материалы и методы.** Исследования были проведены на крысах-самцах весом  $180 \pm 20$  г. Исследование проводилось по следующей схеме: I группа – контроль, II группа – рентгеновское облучение, III группа – экстракт шафрана+ рентгеновское облучение. В течение 21 дня до облучения в организм животных предварительно был введен экстракт шафрана *per os* в дозе 120 мг/кг. При облучении показатели были зафиксированы после 1 часа, 3 и 6 дней. Рентгеновское облучение проводили на аппарате «РУМ-17», дозы облучения 4 Гр.

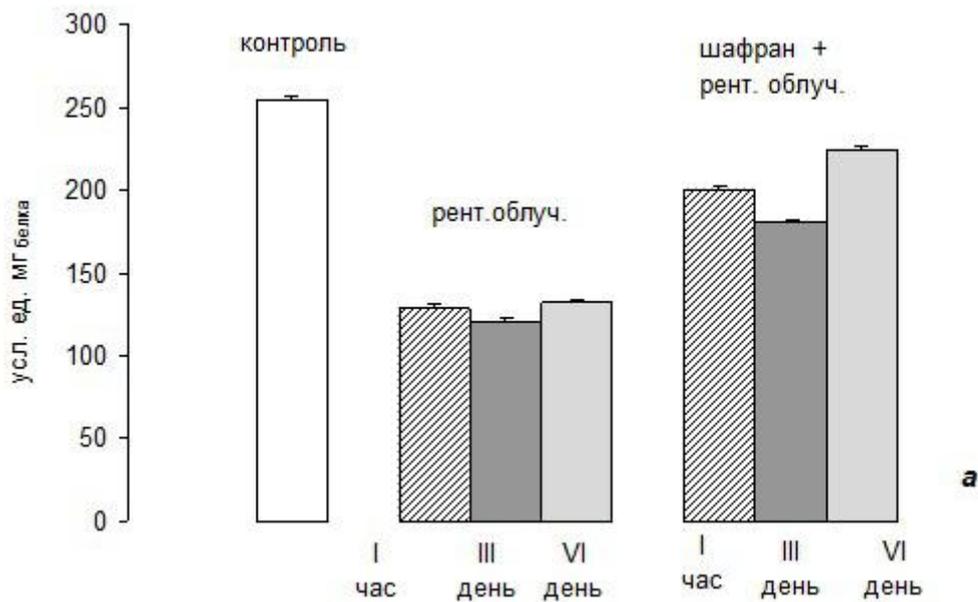
### Результаты и обсуждение

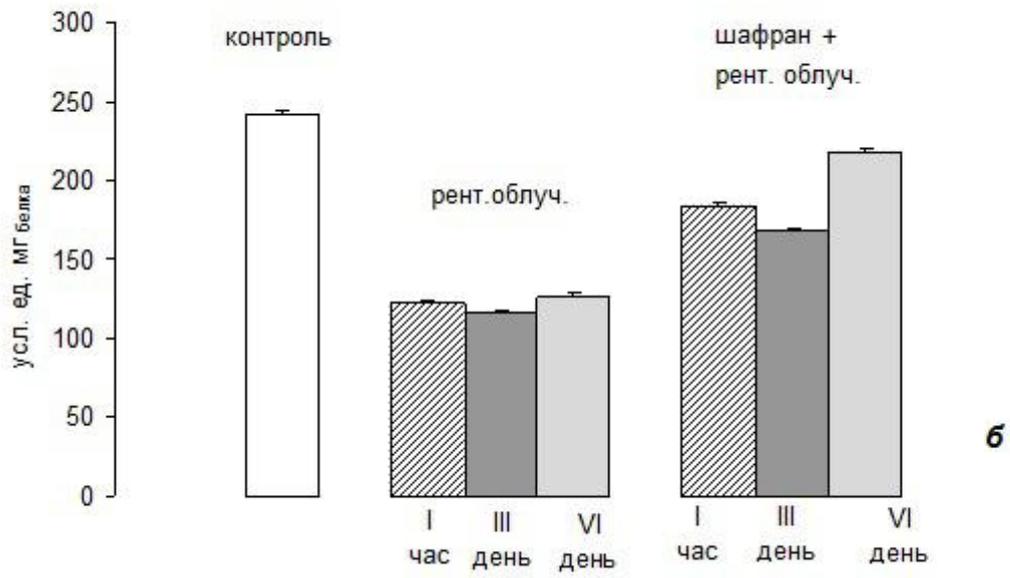
Активность каталазы в гомогенате субстрата, полученного из продолговатого мозга животных после 1 часа облучения в летальной дозе составила  $128,14 \pm 2,07$  усл. ед./мг белка. Это на 49,6% ниже показателя контрольных животных ( $254,34 \pm 2,31$  усл. ед./мг белка) (рис. 1). После 3 дня облучения активность каталазы понижается до  $120,26 \pm 2,18$  усл. ед./мг белка (ниже на 52,7% контрольной группы). Изменения, происходящие после 6 дней, приблизительно достигают показателя, полученного в 1-й час экспозиции. Отметим, что активность исследуемого фермента при всех сроках тестирования снижается до 2-х раз контрольного уровня.

Если не учитывать незначительные различия, также как и в продолговатом мозге, в мозжечке наблюдается аналогичная динамика (рис. 1). Для животных, облученных в летальной дозе облучения, в зрительной и сенсомоторной коре получена схожая динамика изменения.

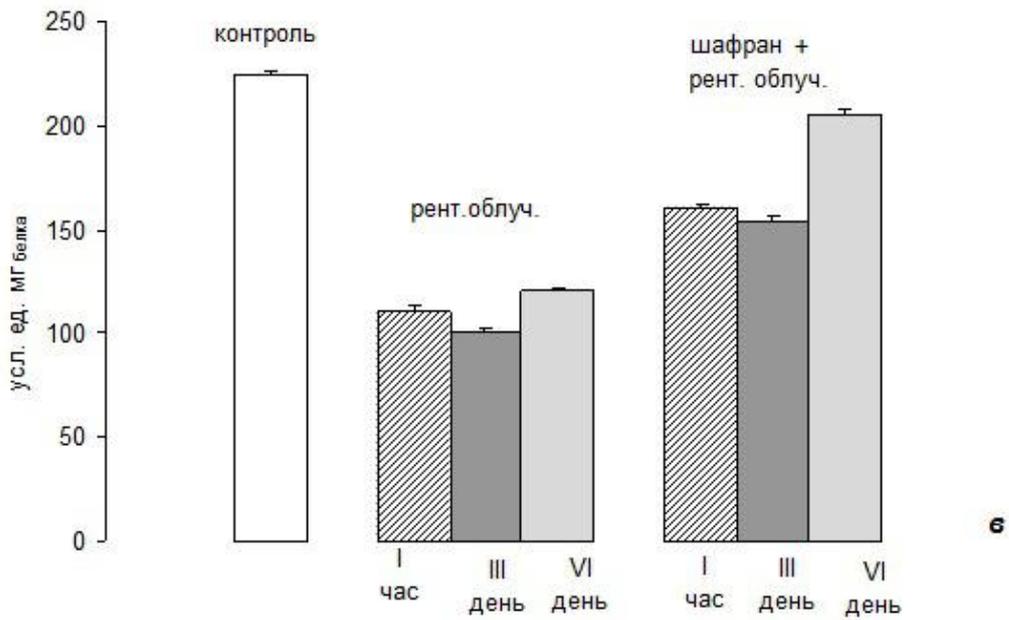
Как видно из рис.1, в зрительной коре после часа, 3 и 6 дней облучения активность каталазы падает ниже контроля на 50,6%, 55 и 46%, соответственно. А в сенсомоторной коре на 1-й час, 3-й и 6-й день облучения снижение составил 50,7%, 56% и 44,6% соответственно.

При анализе полученных данных становится ясно, что в подкорковых структурах мозга крыс независимо от времени исследования между всеми показателями существует схожесть, не учитывая незначительные различия. А в корковых структурах выявлены существенные различия.

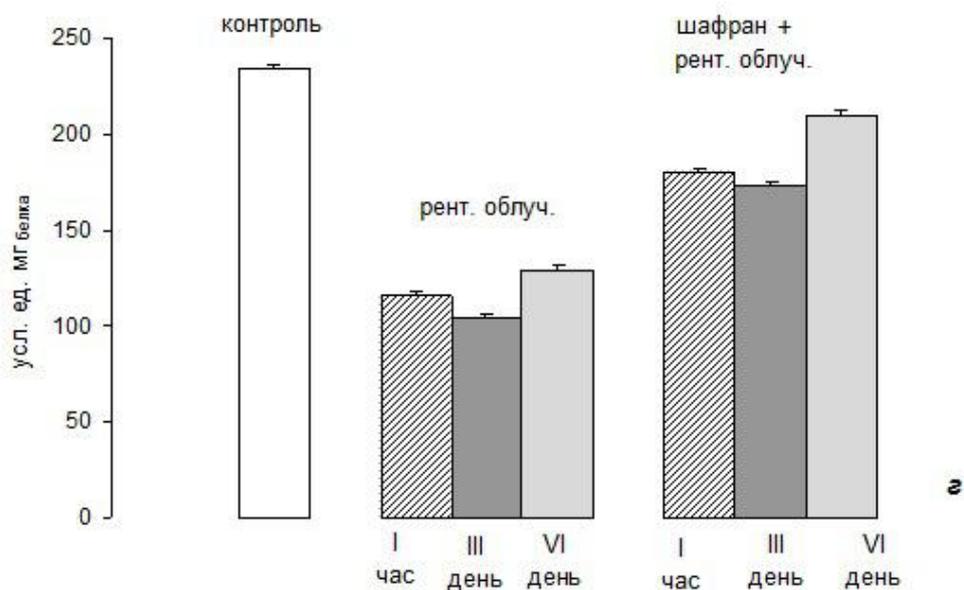




**б**



**б**



**Рис. 1.** Динамика изменения ферментативной активности каталазы при влиянии рентгеновского облучения в дозе 6,9 Гр на фоне введения экстракта шафрана в структурах головного мозга животных: продолговатый мозг (а), мозжечок (б) зрительная (в) и сенсомоторная кора (г).

Изменение активности ГПО в подкорковых структурах мозга крыс, при влиянии летальной дозы облучения аналогично. Если обратить внимание на динамику изменения этого фермента, то становится ясно, что после часа облучения активность составляет  $10,6 \pm 0,64$  нмоль  $\text{NADP}^+$ /мин/мг белка. Это в свою очередь на 28% ниже контрольной величины ( $14,8 \pm 0,82$  нмоль  $\text{NADP}^+$ /мин/мг белка). Дальнейшее облучение вызывает постепенный спад активности, который на 3-й и 6-й день составляет 33% и 54%. Снижение активности фермента до 2-х раз ниже контроля свидетельствует о протекании необратимых биохимических процессов в клетках и тканях. Аналогичная картина также наблюдается в мозжечке. Так, на 1-й час, 3 и 6 дней после облучения активность ГПО снижается на 27%, 41% и 50% соответственно (табл. 1).

Несмотря на тенденцию к снижению в активности ГПО в корковых структурах при летальной дозе облучения, этот спад не так интенсивен, как в подкорковых структурах.

Как видно из табл. 1, после часа облучения в зрительной коре снижение составляет 20%, в сенсомоторной коре 22%. На 3-й день облучения прослеживается интенсификация понижения активности ГПО и в зрительной коре равняется  $15,4 \pm 0,68$  нмоль  $\text{NADP}^+$ /мин/мг белка, в сенсомоторной коре  $22,6 \pm 1,14$  нмоль  $\text{NADP}^+$ /мин/мг белка. В процентах эти показатели составляют 34% и 32% ниже контрольной величины (в зрительной коре -  $23,4 \pm 0,84$  нмоль  $\text{NADP}^+$ /мин/мг белка; в сенсомоторной коре  $27,4 \pm 1,18$  нмоль  $\text{NADP}^+$ /мин/мг белка). На 6-й день активность падает на 37% и 40,5% соответственно.

В летальной дозе облучения рентгеновскими лучами, во всех рассмотренных подкорковых и корковых структурах мозга крыс ферментативная активность СОД резко снижается. Данные ферментативной активности СОД в продолговатом мозге, представленные в табл. 2, свидетельствуют о том, что в течение часового облучения обнаруживается тенденция изменения в сторону уменьшения этого показателя. Снижение составляет 20,5% ниже контроля ( $227,0 \pm 20,9$  усл. ед. мг белка). На 1-й час, 3-й и 6-й день облучения ферментативная активность СОД достигает до  $180,4 \pm 21,4$  усл. ед. мг белка,  $150,3 \pm 18,9$  усл. ед. мг белка (33,7% ниже контроля) и  $130,4 \pm 16,4$  усл. ед. мг белка (42,5% ниже контроля).

Аналогичная картина наблюдается и в мозжечке. Отличием является резкое снижение активности. Экспериментальное исследование изменений в активности СОД на 1-й час, 3-й и 6-й день облучения выявило следующие данные:  $160,3 \pm 18,6$  усл. ед. мг белка,  $130,4 \pm 15,8$  усл. ед. мг белка,  $164,0 \pm 18,9$  усл. ед. мг белка. Контрольный показатель составил  $211,8 \pm 21,6$  усл. ед. мг белка. Это означает снижение на 24% - в 1-й час, 38% - в 3-й день и 45% - в 6-й день облучения. Становится очевидным, что в мозжечке падение активности фермента достигает приблизительно до 2-х раз.

Таблица 1

**Влияние рентгеновского облучения в летальной дозе (6,9 Гр) на фоне введения экстракта шафрана на активность ГПО (в нмоль  $NADP^+$ /мин/мг белка), ( $M \pm m$ ,  $n=10$ ).**

		Продолговатый мозг	Мозжечок	Зрительная кора	Сенсомоторная кора
1. Контроль		$14,8 \pm 0,82$	$11,6 \pm 0,74$	$23,4 \pm 0,84$	$27,4 \pm 1,18$
2. Рент. облуч.	1 с	$10,6 \pm 0,64$	$8,4 \pm 0,53$	$18,6 \pm 0,74$	$21,3 \pm 1,16$
	$P_{2-1}$	$<0,02$	$<0,01$	$<0,02$	$<0,001$
3.	3-й день	$8,4 \pm 0,46$	$6,8 \pm 0,64$	$15,4 \pm 0,68$	$18,6 \pm 1,16$
	$P_{3-1}$	$<0,01$	$<0,02$	$<0,02$	$<0,02$
4.	6-й день	$6,8 \pm 0,78$	$5,9 \pm 0,61$	$14,7 \pm 0,54$	$16,3 \pm 1,19$
	$P_{4-1}$	$<0,01$	$<0,01$	$<0,01$	$<0,01$
5. Шафран + Рент. облуч.	1 час	$12,4 \pm 0,91$	$9,3 \pm 0,41$	$19,3 \pm 0,64$	$25,3 \pm 1,15$
	$P_{5-1}$	$<0,01$	$<0,001$	$<0,02$	$<0,02$
6.	3-й день	$11,6 \pm 0,74$	$9,1 \pm 0,54$	$19,8 \pm 0,81$	$22,6 \pm 1,14$
	$P_{6-1}$	$<0,01$	$<0,01$	$<0,02$	$<0,02$
7.	6-й день	$10,8 \pm 0,61$	$9,8 \pm 0,61$	$19,4 \pm 0,82$	$25,8 \pm 1,17$
	$P_{7-1}$	$<0,01$	$<0,01$	$<0,001$	$<0,05$

В зрительной коре после часа облучения активность СОД снижается на 20,8%, в 3-й день на 35% и в 6-й день 43% в сравнении с контрольным показателем (рис. 2).

Таблица 2

**Влияние рентгеновского облучения в летальной дозе (6,9 Гр) на фоне введения экстракта шафрана на активность СОД (в усл. ед./мг белка) в продолговатом мозге и мозжечке ( $M \pm m$ ,  $n=10$ ).**

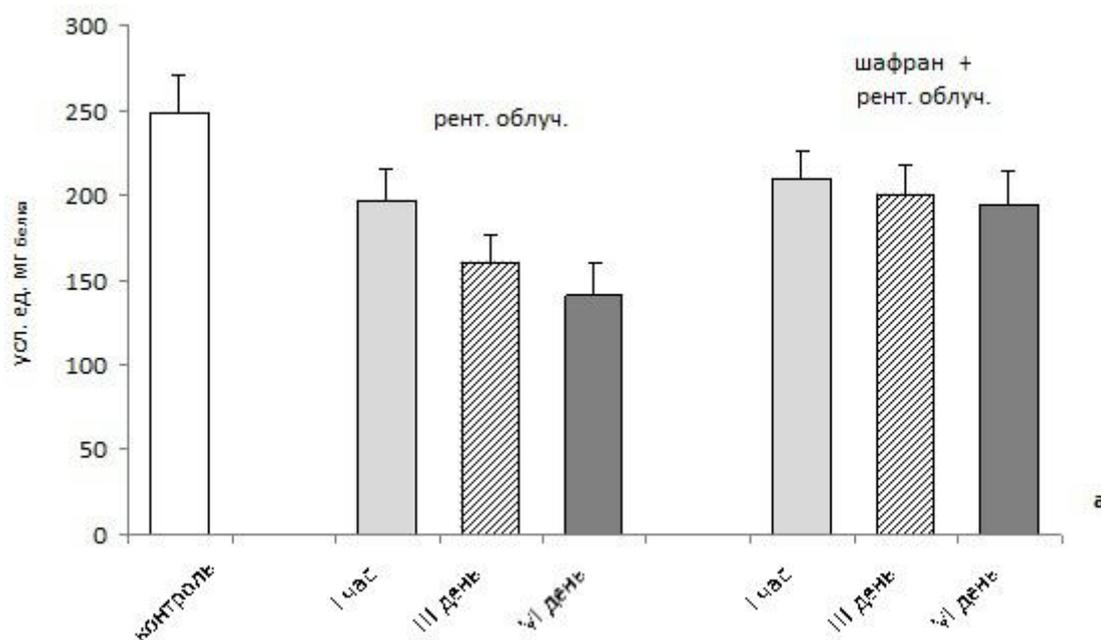
		Продолговатый мозг	Мозжечок
1. Контроль		$227,0 \pm 20,9$	$211,8 \pm 21,6$
2. Рент. облуч.	1 час	$180,4 \pm 21,4$	$160,3 \pm 18,3$
	$P_{2-1}$	$<0,01$	$<0,01$
3.	3-й день	$150,3 \pm 18,9$	$130,4 \pm 15,8$
	$P_{3-1}$	$<0,01$	$<0,02$
4.	6-й день	$130,4 \pm 16,4$	$115,6 \pm 13,1$
	$P_{4-1}$	$<0,01$	$<0,01$

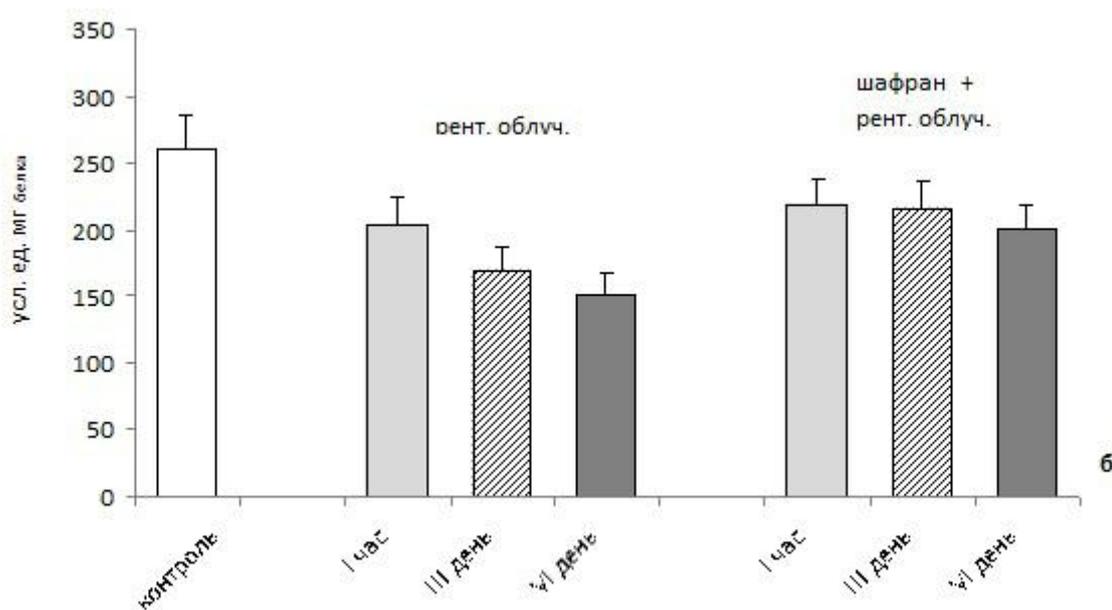
1. Шафран+	1 час	200,6±18,9	190,4±20,4
Рент. облуч.	P <sub>5-1</sub>	<0,01	<0,01
6.	3-й день	180,4±19,3	175,6±16,3
	P <sub>6-1</sub>	<0,01	<0,01
7.	6-й день	170,8±20,1	164±18,9
	P <sub>7-1</sub>	<0,01	<0,01

В сенсомоторной коре контрольный показатель активности СОД равняется 261,3±24,6 усл. ед. мг белка, после часа облучения составляет 204,2±21,4 усл. ед. мг белка, на 3-й и 6-й день 170,3±18,1 усл. ед. мг белка и 151,6±17,4 усл.ед.мг белка соответственно. Как видно, в этой структуре мозга также наблюдается резкое снижение активности.

Флавоноиды, входящие в состав экстракта шафрана, обладают широким спектром физиологического и биохимического действия [10]. Основным биохимическим свойством флавоноидов является способность улавливать свободные кислородные радикалы, модифицирующие клеточные структуры, инициирующие перекисное окисление липидов (ПОЛ) и белков [11]. Можно предположить, что антиокислительные свойства этих соединений связаны со способностью ингибировать липоксигеназу и улавливать активные радикальные продукты перекисного окисления.

Из полученных данных видно, что облучение вызывает значительное понижение активности ГПО и каталазы во всех изученных нами структурах мозга. В различных сроках времени облучение приводит к более значительному подавлению активности ГПО и каталазы в различных отделах мозга. Предварительное введение животным экстракта шафрана заметным образом предотвращает процессы ингибирования активностей ГПО и каталазы в тканях мозга, вызываемого летальной дозой облучения. Для сравнения отметим, что активность ГПО в продолговатом мозге после часа облучения составила 10,6±0,64 нмоль NADP<sup>+</sup>/мин на 1 мг белка, на 3-й день 8,4±0,46 нмоль NADP<sup>+</sup>/мин на 1 мг белка, а на 6-й день облучения 6,8±0,78 нмоль NADP<sup>+</sup>/мин на 1 мг белка, что значительно ниже исходного уровня (14,8±0,82 нмоль NADP<sup>+</sup>/мин на 1 мг белка). У животных, получавших экстракт шафрана активность ГПО значительно превышает интактный уровень и после 1 часа облучения достигает 12,4±0,91 нмоль NADP<sup>+</sup>/мин на 1 мг белка, на 3-й день 11,6±0,74 нмоль NADP<sup>+</sup>/мин на 1 мг белка, а на 6-й день 10,8±0,61 нмоль NADP<sup>+</sup>/мин на 1 мг белка. Значительно возрастает при этом активность каталазы в различных структурах мозга (рис. 1).





**Рис.2. Динамика изменения активности СОД при влиянии рентгеновского облучения в дозе 6,9 Гр на фоне введения экстракта шафрана в зрительной (а) и сенсомоторной коре (б) животных.**

В результате проведенных исследований было установлено, что летальная доза рентгеновского облучения на фоне предварительного введения экстракта шафрана в большинстве случаев не только не приводит к подавлению активностей изучаемых ферментов, напротив, способствует повышению их активностей, проявляя антиоксидантные свойства.

Интересные данные были получены при изучении действия экстракта шафрана на активность ГПО и каталазы в отдельных структурах мозга животных, переживших летальную дозу рентгеновского облучения. Введение экстракта шафрана подопытным животным оказывает стимулирующее влияние на активность ГПО и каталазы во всех исследованных нами структурах мозга. Более высокое повышение активностей этих антиоксидантных ферментов на фоне введения экстракта шафрана наблюдается в сенсомоторной коре головного мозга. Следовательно, действие экстракта шафрана на активность изучаемых ферментов особенно благоприятствует на 6-й день после облучения в продолговатом мозге, мозжечке и зрительной коре, а в сенсомоторной коре на 3-й день после облучения.

Таким образом, при влиянии летальной дозы рентгеновского облучения на фоне применения экстракта шафрана наблюдается неоднозначное снижение уровня активности ГПО и каталазы, которая проявляется в организации мозга.

Рассматривая в общем виде антиоксидантные системы, следует иметь в виду, что организм располагает ферментативными системами, ингибирующими ПОЛ на этапе инициации. Так, СОД инактивирует супероксид анион радикал. В результате предварительного введения животным экстракт шафрана в значительной мере предотвращает процессы ингибирования активности СОД в тканях мозга, вызываемого летальной дозой облучения. После перорального введения экстракта шафрана активность СОД значительно превышает интактный показатель и после 1 часа облучения достигает  $200,6 \pm 18,9$  усл. ед./мг белка, на 3-й день и 6-й день  $180,4 \pm 19,3$  усл. ед./мг белка и  $170,8 \pm 20,1$  усл. ед./мг белка соответственно (табл. 2).

Интересные данные были получены при изучении действия экстракта шафрана на активность ГПО и каталазы в отдельных структурах мозга животных, переживших летальную дозу рентгеновского облучения. Введение экстракта шафрана подопытным животным оказывает стимулирующее влияние на активность ГПО и каталазы во всех исследованных нами структурах мозга. Более высокая повышение активностей этих антиоксидантных ферментов на фоне введения экстракта шафрана наблюдается в сенсомоторной коре головного мозга. Следовательно, действие экстракта шафрана на активность изучаемых ферментов особенно благоприятствует на 6-й день после облучения в продолговатом мозге, мозжечке и зрительной коре, а в сенсомоторной коре на 3-й день после облучения.

Следует особо отметить, что введение экстракта шафрана перед воздействием рентгеновского облучения в летальной дозе способствовало сокращению падежа животных на 20-23%, а кровотечения из носа и из ротовой полости, понос у животных наблюдаются в поздние сроки. Можно сказать, что шерсть практически не выпадает, гибель животных наблюдается на 10-15 сутки после облучения.

Таким образом, на фоне применения экстракта шафрана при влиянии летальной дозы рентгеновского облучения наблюдается неоднозначное снижение уровня активности ГПО и каталазы, которая проявляется в организации мозга. Возможно, полученные данные могут дать основание для утверждения наличия у шафрана радиопротекторных свойств.

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Барабой В.А., Орел В.Э., Карнаух И.М. Перекисное окисление и радиация. Киев. Наук. думка. 1991. 236 с.
2. Бурлакова Е.Б., Алесенко А.В., Дубинина Е.Е. Роль активных форм кислорода в качестве сигнальных молекул в метаболизме тканей при состояниях окислительного стресса // Вопросы медицинской химии. 2001, т. 47, № 6, с. 561-581.
3. Miura Y. Oxidative Stress, Radiation-Adaptive Responses, and Aging // J. Radiat. Res., 2004, v. 45, № 3, p. 357-372.
4. Клебанов Г.И., Теселкин Ю.О., Бабенкова И.В. и др. Антиоксидантная активность сыворотки крови // Вестн. РАМН, 1999, № 2, с. 15-22.
5. Prior R.L., Cao G. In vivo total antioxidant capacity: comparison of different analytical methods // Free Radic. Biol. Med., 1999, v. 27, № 11-12, p. 1173-1181.
6. Барабой В.А., Брехман И.И., Голотин В.Г., Кудряшов Ю.Б. Перекисное окисление и стресс. СПб.: Наука. 1992. 148 с
7. Журавская А.Н., Кершенгольц Б.М., Курилюк Т.Т., Щербакова Т.М. Энзимологические механизмы адаптации растений к условиям повышенного естественного радиационного фона // Радиационная биология. Радиоэкология. 1995, т. 35, № 3, с. 349-355.
8. Paglia D., Valentine W. Studies on the quantitative characterization of erythrocyte glutathione peroxidase // J. Lab. Clin. Med., 1967, v. 70, № 1, p.158.
9. Bergmeyer H.U. Test for detecting of catalase // Biochem. J., 1956, v. 237, p. 255-262.
10. Tahara S., Ibrahim R.K. [Prenylated isoflavonoids-An update](#) // Phytochemistry. 1995, v. 38, № 5, p. 1073-1094.
11. Soszynski M., Bartosz G. Effect of postirradiation treatment on the radiation-induced haemolysis of human erythrocytes // Int. J. Radiat. Biol., 1997, v. 71, № 3, p. 337-343.