



ОРИГИНАЛЬНЫЕ СТАТЬИ

Научная статья

УДК 577.151: 612.352.3: 547.831.3 543.544

doi: 10.17308/sorpchrom.2023.23/11872

Исследование каталитических свойств глутатионредуктазы, полученной с помощью хроматографических методов из печени крыс с парацетамол-индуцированным поражением печени, при введении 6-гидрокси-2,2,4-триметил-1,2-дигидрохинолина

Светлана Евгеньевна Кравцова[✉], Татьяна Николаевна Попова, Евгений Дмитриевич Крыльский, Александр Алексеевич Агарков, Хидмет Сафарович Шихалиев, Светлана Михайловна Медведева, Сергей Александрович Олейник, Андрей Игоревич Лаврушев

Воронежский государственный университет, Воронеж, Россия, vip.sveta.popova@mail.ru[✉]

Аннотация. В ходе настоящей работы была проведена оценка ряда каталитических и регуляторных свойств ферментного препарата глутатионредуктазы (ГР, КФ 1.6.4.2.) из печени крыс (*Rattus norvegicus* линии Wistar) с парацетамол-индуцированным повреждением печени (ППП), получавших 6-гидрокси-2,2,4-триметил-1,2-дигидрохинолин (ДГХ), очищенного с использованием гель-фильтрации и ионообменной хроматографии. Были сформированы три экспериментальные группы животных. Крысам контрольной группы вводили перорально вазелиновое масло. Вторая группа была представлена животными с ППП, которое моделировали путём перорального введения парацетамола в дозе 1000 мг/кг массы тела, растворенного в 1 см³ вазелинового масла. Животные третьей группы на фоне индукции ППП получали перорально ДГХ в дозе 50 мг на 1 кг веса в виде раствора в 1 см³ 1% крахмала, через 1 час и 12 часов после моделирования патологии. Печень и сыворотку крови забирали через 24 часа после введения парацетамола. На спектрофотометре при длине волны 340 нм измеряли активность ГР. С помощью методов фракционирования сульфатом аммония, гель-фильтрации через сефадекс G-25 и ионообменной хроматографии на ДЭАЭ-целлюлозе проводили очистку фермента из печени крыс. При помощи набора реактивов ВСА protein assay kit измеряли общее количество белка в пробах. В ходе работы была получена ГР из печени крыс, которым вводили ДГХ на фоне ППП, с 32-кратной степенью очистки. С применением метода двойных обратных координат Лайнуивера-Берка показано, что введение крысам ДГХ сопровождалось снижением сродства фермента к НАДФН, по сравнению с показателями при патологии. Внесение изоцитрата в среду спектрофотометрирования приводило к менее значительному возрастанию активности ГР из печени животных, получавших ДГХ на фоне ППП, по сравнению с животными, получавшими парацетамол. Было отмечено более существенное снижение активности для фермента из печени животных третьей группы при внесении в реакционную среду глюкозо-6-фосфата. Цитрат оказывал менее выраженное регуляторное влияние на ГР из печени животных, получавших ДГХ на фоне патологии, относительно показателей животных с ППП. Продemonстрированные изменения свойств фермента могли быть обусловлены конформационными изменениями его молекулы в результате снижения под действием ДГХ интенсивности свободнорадикального окисления, развивающегося на фоне токсического действия метаболитов парацетамола.

Ключевые слова: глутатионредуктаза, парацетамол-индуцированное поражение печени, 6-гидрокси-2,2,4-триметил-1,2-дигидрохинолин, окислительный стресс, гель-фильтрация, ионообменная хроматография.

Для цитирования: Кравцова С.Е., Попова Т.Н., Крыльский Е.Д., Агарков А.А., Шихалиев Х.С., Медведева С.М., Олейник С.А., Лаврушев А.И. Исследование каталитических свойств глутатионредуктазы, полученной с помощью хроматографических методов из печени крыс с парацетамол-индуциро-



ванным поражением печени, при введении 6-гидрокси-2,2,4-триметил-1,2-дигидрохинолина // *Сорбционные и хроматографические процессы. 2023. Т. 23, № 6. С. 1113-1123.* <https://doi.org/10.17308/sorpchrom.2023.23/11872>

Original article

Investigation of catalytic properties of glutathione reductase obtained by chromatographic methods from the liver of rats with paracetamol-induced liver damage upon administration of 6-hydroxy-2,2,4-trimethyl-1,2-dihydroquinoline

Svetlana E. Kravtsova[✉], Tatyana N. Popova, Evgenii D. Kryl'skii, Alexander A. Agarkov, Khidmet S. Shikhaliev, Svetlana M. Medvedeva, Sergej A. Oleinik, Andrei I. Lavrushev

Voronezh State University, Voronezh, Russia, vip.sveta.popova@mail.ru[✉]

Abstract. The aim of the present study was to analyze some catalytic and regulatory properties of the enzyme preparation of glutathione reductase (GR, EC 1.6.4.2.) obtained from rat liver using gel filtration and ion exchange chromatography under conditions of paracetamol-induced liver injury (PILI) and administration of 6-hydroxy-2,2,4-trimethyl-1,2-dihydroquinoline (DHQ). Laboratory animals (*Rattus norvegicus* rats of the Wistar line) were divided into 3 groups. The animals of the control group were orally administered vaseline oil. The second group consisted of rats with PILI induced by a single oral administration of paracetamol at a dose of 1000 mg/kg body weight dissolved in 1 cm³ of vaseline oil. Animals of the third group were modeled by PILI and orally administered with DHQ at a dose of 50 mg per 1 kg body weight dissolved in 1 cm³ of 1% starch, 1 hour and 12 hours after paracetamol administration. Liver and serum were collected 24 hours after paracetamol administration. GR activity was measured on a spectrophotometer at 340 nm wavelength. The enzyme was purified from rat liver by ammonium sulfate fractionation, gel filtration through Sephadex G-25, and ion exchange chromatography on DEAE-cellulose. The total amount of protein in the samples was measured using the BCA protein assay kit. GR was obtained from the liver of rats treated with DHQ on the background of PILI with a 32-fold purification degree. Using the method of double inverse Lineweaver-Burk coordinates it was shown that administration of DHQ to rats was accompanied by a decrease in the affinity of the enzyme for NADPH, as compared to the indicators at pathology. The introduction of isocitrate into the spectrophotometric medium resulted in a less pronounced increase in the activity of GR from the liver of animals treated with DHQ on the background of PILI, compared to the second group of rats. The enzyme from the liver of animals of the third group was characterized by a more significant decrease in activity when glucose-6-phosphate was introduced into the reaction medium. Citrate had a less pronounced regulatory effect on GR from the liver of rats treated with DHQ on the background of pathology, relative to the indicators of animals with PILI. The changes in enzyme properties demonstrated may be due to conformational changes in the molecule resulting from the inhibition effect of DHQ on the intensity of free radical-induced oxidation, which develops against the background of the toxic effect of paracetamol metabolites.

Keywords: glutathione reductase, paracetamol-induced liver injury, 6-hydroxy-2,2,4-trimethyl-1,2-dihydroquinoline, oxidative stress, gel filtration, ion exchange chromatography.

For citation: Kravtsova S.E., Popova T.N., Kryl'skii E.D., Agarkov A.A., Shikhaliev Kh.S., Medvedeva S.M., Oleinik S.A., Lavrushev A.I. Investigation of catalytic properties of glutathione reductase obtained by chromatographic methods from the liver of rats with paracetamol-induced liver damage upon administration of 6-hydroxy-2,2,4-trimethyl-1,2-dihydroquinoline. *Sorbtsionnye i khromatograficheskie protsessy. 2023. 23(6): 1113-1123.* (In Russ.). <https://doi.org/10.17308/sorpchrom.2023.23/11872>

Введение

Одной из существенных проблем здравоохранения в настоящее время являются токсические поражения печени, вызванные употреблением лекарственных

средств, в частности, парацетамола (ацетаминофена). Воздействие подобных ксенобиотиков способно привести к метаболической дисфункции печени, которая может характеризоваться кратковременным повышением активности маркерных



ферментов в сыворотке крови или иметь более глубокие последствия, такие как фиброз, цирроз, гепатоцеллюлярная карцинома печени [1]. Парацетамол – анальгетик и антипиретик, оказывающий жаропонижающее действие, который при высоких дозах способен повреждать печеночную ткань, в связи с чем он широко используется для моделирования лекарственного гепатита у животных в эксперименте [2]. Согласно литературным данным, парацетамол утилизируется печенью цитохромом P450 2E1 (CYP2E1), в результате чего образуется высокореактивное токсическое соединение N-ацетил-п-бензохинонимин, которое способно ковалентно связываться с многими белками. Накопление N-ацетил-п-бензохинонимина выступает в качестве основного фактора запуска окислительного стресса и воспаления в ткани печени, что приводит, в конечном итоге, к гибели гепатоцитов [3]. Обезвреживание N-ацетил-п-бензохинонимина осуществляется, главным образом, за счёт восстановленного глутатиона (GSH). В то же время, при избыточном образовании продуктов метаболизма парацетамола развивается истощение пула GSH и соответствующее нарушение работы глутатионовой антиоксидантной системы [4]. Реакцию восстановления окисленного глутатиона (GSSG) до GSH катализирует НАДФН-зависимый фермент глутатионредуктаза (ГР, КФ 1.6.4.2). Таким образом, поиск новых способов коррекции функционирования ферментов глутатионового звена, в частности ГР, при токсическом поражении печени представляется актуальным.

В настоящее время в кормовой и пищевой промышленности широко используется этоксихин – соединение хинолинового ряда, обладающее противомикробными свойствами [5]. Кроме этоксихина, ряд других хинолиновых производных способны проявлять антиоксидантную и противовоспалительную активность [6, 7]. В связи с этим, соединения

данного класса являются перспективными кандидатами для использования в качестве гепатопротекторных средств.

Таким образом, целью настоящей работы явилось получение очищенного препарата ГР для исследования его некоторых каталитических и регуляторных свойств в условиях введения 6-гидрокси-2,2,4-триметил-1,2-дигидрохинолина (ДГХ) на фоне парацетамол-индуцированного поражения печени (ППП) у крыс.

Экспериментальная часть

В качестве объекта исследования были использованы самцы белых лабораторных крыс Wistar массой 200-250 г. (Филиал «Столбовая» ФГБУН НЦБМТ ФМБА России, Россия, Московская обл.). Работа осуществлялась в соответствии с правилами гуманного обращения с лабораторными животными (Директива 2010/63/EU Европейского Парламента и Совета Европейского Союза от 22.09.2010) и санитарными нормами вивариев (ГОСТ 33216-2014). В ходе работы было сформировано три экспериментальные группы животных. Крысам первой (контрольной) группы (n=8) вводили перорально вазелиновое масло. Вторая группа (n=8) была представлена животными с ППП, которое моделировали путём перорального введения парацетамола в дозе 1000 мг/кг массы тела, растворенного в 1 см³ вазелинового масла [8]. Животные третьей группы (n=8) на фоне индукции ППП получали перорально ДГХ в дозе 50 мг на 1 кг веса в виде раствора в 1 см³ 1% крахмала, через 1 час и 12 часов после моделирования патологии. После введения парацетамола через 24 часа печень наркотизированных животных забирали для дальнейшего исследования. Для гомогенизации ткани использовали среду выделения в 4-х кратном объеме, состоящую из 1мМ ЭДТА, 0.05 М трис-НСl буфера (рН=7.8) и 2 мМ β-меркаптоэтанола, после чего в течение 15 мин при 8000 g гомогенат подвергали

центрифугированию. Полученный супернатант применяли для дальнейших исследований.

Для оценки активности ферментов аланинаминотрансферазы (АЛТ) и аспаратаминотрансферазы (АСТ) в сыворотке крови крыс применяли диагностические наборы фирмы Ольвекс (Россия). Спектрофотометрически при длине волны 340 нм осуществляли анализ активности ГР [9]. Метод основан на падении поглощения раствора в процессе превращения НАДФН в НАДФ в реакции восстановления GSSG до GSH. За единицу активности (Е) принимали количество фермента, катализирующее превращение 1 мкмоль субстрата за 1 минуту при 25°C. Показатели активности ГР представляли в Е/мг белка. Среда для определения активности фермента имела следующий состав: 50 мМ калий-фосфатный буфер (рН 7.4), содержащий 1 мМ ЭДТА, 0.16 мМ НАДФН, 0.85 мМ GSH. С помощью набора BCA protein assay kit (BioVision, США) измеряли концентрацию белка.

Для получения ферментных препаратов ГР применялась следующая схема очистки. На первом этапе было проведено фракционирование белков с сульфатом аммония ((NH₄)₂SO₄), для чего применяли ступенчатое увеличение содержания фракционирующего агента в гомогенате от 0 до 40%, затем от 40 до 70%. Избавление препарата от низкомолекулярных примесей осуществляли с помощью гель-фильтрации через сефадекс G-25 (1.7×20 см). Вносили образец в количестве не более 20-25% от объёма колонки. В качестве элюирующей среды использовали 0.01 М калий-фосфатный буфер (рН 7.4). Скорость элюции составляла 25-30 см³/ч, её регулирование осуществляли путем изменения гидростатического давления. В каждой фракции объёмом 2 см³ регистрировали ферментативную активность. Фракции с наибольшей активностью объединяли и очищали с применением ионообменной хроматографии на колонке с ДЭАЭ-целлюлозой (1.2×13 см).

При подборе сорбента руководствовались литературными данными, в соответствии с которыми молекулярная масса ГР из печени крысы составляет 100 кДа, а изоэлектрическая точка фермента находится в области рН 6.4 [10]. Таким образом, для хроматографии был выбран сорбент на основе ДЭАЭ-целлюлозы, представляющий из себя анионит, область диссоциации для которого лежит в интервале рН 6-9. После набухания сорбента его заряжали в растворах 0.5 М NaOH, 0.5 М HCl и снова в 0.5 М NaOH, в течение часа в каждом растворе, отмывая ионообменник каждый раз до рН дистиллированной воды. После зарядки ДЭАЭ-целлюлозу уравнивали в среде элюции. Адсорбцию ГР на анионите проводили при низкой ионной силе буферного раствора (10 мМ трис-HCl буфер, содержащий 1 мМ ЭДТА и 0.005% β-меркаптоэтанола), в последующем ступенчато повышая градиент концентрации элюирующего раствора KCl для десорбции фермента. Скорость элюции составляла 20-25 см³/час. В каждой фракции объёмом 2 см³ вычисляли ферментативную активность и содержание белка. Температурный режим 4°C поддерживался на всех этапах выделения и очистки фермента. Константу Михаэлиса (К_м) рассчитывали методом двойных обратных координат Лайнуивера-Берка.

Опыты выполняли в 8-кратных биологических и 2-кратных аналитических повторностях. Все результаты были обработаны с применением методов описательной статистики путём определения выборочного среднего, выборочного стандартного отклонения. Критерий Колмогорова-Смирнова использовали для оценки нормальности распределения значений в группах. Сравнение показателей осуществляли с помощью однофакторного дисперсионного анализа для параметрических выборок или теста Краскела-Уоллиса для непараметрических выборок. Достоверными считали различия при p<0.05.

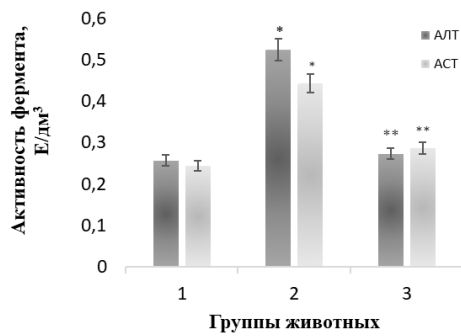


Рис. 1. Показатели активности маркерных ферментов цитолиза гепатоцитов в сыворотке крови контрольных крыс (1), животных с парацетамол-индуцированным повреждением печени (2) и животных, которым на фоне развития патологии вводили 6-гидрокси-2,2,4-триметил-1,2-дигидрохинолин в дозе 50 мг/кг (3).

* - $p < 0.05$ по сравнению с контрольной группой; ** - $p < 0.05$ по сравнению с группой животных с парацетамол-индуцированным повреждением печени.

Fig. 1. Marker indicators of hepatocyte cytolysis in the blood serum of rats of the control group (1), animals with paracetamol-induced liver damage (2) and rats who had a pathology and were administered 6-hydroxy-2,2,4-trimethyl-1,2-dihydroquinoline at a dose of 50 mg/kg (3).

Обсуждение результатов

С целью анализа гепатопротекторного потенциала ДГХ было проведено исследование активности АЛТ и АСТ в сыворотке крови экспериментальных животных. Как показали результаты, пероральное введение ДГХ в дозе 50 мг/кг животным с ППП приводило к снижению активности маркерных ферментов поражения печени, что подтвердило протекторное действие исследуемого соединения (рис. 1).

Ферментный препарат ГР был получен из печени животных с ППП, получавших ДГХ, методом фракционирования с использованием ступенчатого повышения концентрации $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$. Степень очистки после данной стадии составила 1.2 раза (таблица 1). На следующей ста-

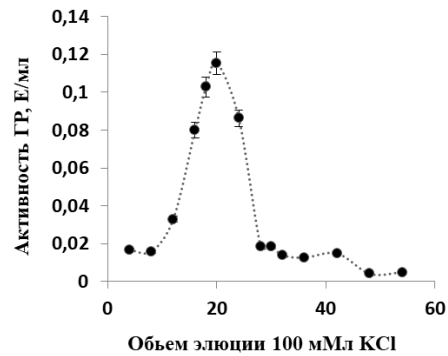


Рис. 2. Профиль элюции глутатионредуктазы из печени крыс, которым на фоне парацетамол-индуцированного повреждения печени вводили гидрокси-2,2,4-триметил-1,2-дигидрохинолин в дозе 50 мг/кг, в ходе хроматографии на ДЭАЭ-целлюлозе.

Fig. 2. The profile of glutathione reductase elution from the liver of rats who, against the background of paracetamol-induced liver damage, were injected with hydroxy-2,2,4-trimethyl-1,2-dihydroquinoline at a dose of 50 mg/kg, during DEAE cellulose chromatography.

дии с целью удаления низкомолекулярных примесей очистку ГР производили с использованием гель-фильтрации на сефадексе G-25. В дальнейшем применяли хроматографию на ДЭАЭ-целлюлозе, в результате чего удалось получить ферментный препарат со степенью очистки 32.6 раза. В ходе эксперимента было установлено, что в процессе ионообменной хроматографии на колонке с ДЭАЭ-целлюлозой фермент из печени исследуемых животных десорбировался в виде максимального пика при наслаивании на колонку 20 см³ среды элюции 100 мМ КСl (рис. 2). Частично очищенный ферментный препарат служил объектом для анализа каталитических и регуляторных свойств ГР.

В ходе проведенного исследования методом двойных обратных координат Лай

Таблица 1. Очистка глутатионредуктазы из печени крыс контрольной групп (Контроль), животных с парацетамол-индуцированным повреждением печени (Парацетамол), и крыс, которым на фоне развития патологии вводили 6-гидрокси-2,2,4-триметил-1,2-дигидрохинолин в дозе 50 мг/кг (Парацетамол+ДГХ).

Table 1. Purification of glutathione reductase from the liver of rats of the control group (Control), animals with paracetamol-induced liver damage (Paracetamol), and rats who had a pathology and were administered 6-hydroxy-2,2,4-trimethyl-1,2-dihydroquinoline at a dose of 50 mg/kg (Paracetamol + DHC)

| Стадия очистки | Условия | Общая активность $E_{\text{общ}}$ | Количество белка, мг | Удельная активность, Е/мг белка | Выход, % | Степень очистки |
|-----------------------------------------------|-----------------|-----------------------------------|----------------------|---------------------------------|----------|-----------------|
| Гомогенат | Контроль | 2.67±0.11 | 243.1±9.7 | 0.011±0.001 | 100 | 1 |
| | Парацетамол | 6.98±0.35 | 415.3±20.8 | 0.017±0.001 | 100 | 1 |
| | Парацетамол+ДГХ | 5.98±0.29 | 475.1±23.7 | 0.013±0.007 | 100 | 1 |
| Фракционирование $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ | Контроль | 2.44±0.09 | 198.1±9.9 | 0.013±0.001 | 91 | 1.2 |
| | Парацетамол | 2.56±0.13 | 45.1±2.3 | 0.043±0.002 | 38 | 2.5 |
| | Парацетамол+ДГХ | 1.18±0.59 | 80.1±4.0 | 0.015±0.002 | 20 | 1.2 |
| Хроматография на сефадексе G-25 | Контроль | 2.29±0.08 | 115.2±5.8 | 0.021±0.001 | 86 | 1.9 |
| | Парацетамол | 1.52±0.08 | 37.8±1.9 | 0.046±0,003 | 22 | 2.7 |
| | Парацетамол+ДГХ | 1.07±0.06 | 45.2±2.3 | 0.024±0.002 | 18 | 1.9 |
| Хроматография на ДЭАЭ-целлюлозе | Контроль | 1.21±0.04 | 1.9±0.1 | 0.601±0.027 | 45 | 54.5 |
| | Парацетамол | 1.05±0.03 | 9.7±0.5 | 0.574±0.027 | 15 | 33.4 |
| | Парацетамол+ДГХ | 0.85±0.05 | 2.1±0.1 | 0.410±0.041 | 14 | 32.6 |

нуивера-Берка удалось вычислить Константу Михаэлиса (K_m) по отношению к НАДФН, которая в контроле составила 0.13 ммоль/дм³, у животных с ППП – 0.07 ммоль/дм³, а у крыс, которым на фоне развития патологии вводили ДГХ – 0.14 ммоль/дм³ (рис. 3). Наблюдаемое уменьшение сродства ГР к НАДФН могло происходить в результате улучшения оксидативного статуса в ткани печени под действием ДГХ. По-видимому, тестируемое соединение способствовало снижению интенсивности окисления GSH в процессе детоксикации ксенобиотиков и реактивных молекул, что отражалось в уменьшении степени мобилизации ГР. В литературе встречаются данные, свидетельствующие об антиоксидантном эффекте дигидрохинолиновых производных, что связано с наличием в его структуре хинолинового кольца [11]. Показано, что за счёт гидроксильной группы и

p-сопряжения электронов атомов N и O в пара-положении ароматического цикла реализуется антирадикальная активность ДГХ [12]. Экспериментально установлено, что некоторые производные хинолона могут действовать как поглотители свободных радикалов. Синтетические производные хинолина, такие как 2-хлорхинолин-3-карбоксальдегиды, спиртозамещенные 4-гидроксипиранохинолины и производные пиримидохинолина, также показали в эксперименте значительную антиоксидантную активность [13-15].

Как известно, в условиях окислительного стресса на фоне развития парацетамоловой интоксикации наблюдается истощение пула GSH, что сопровождается накоплением реактивных молекул, повреждающих клеточные биомолекулы [16]. Эффективность восстановления GSSG зависит от уровня НАДФН в

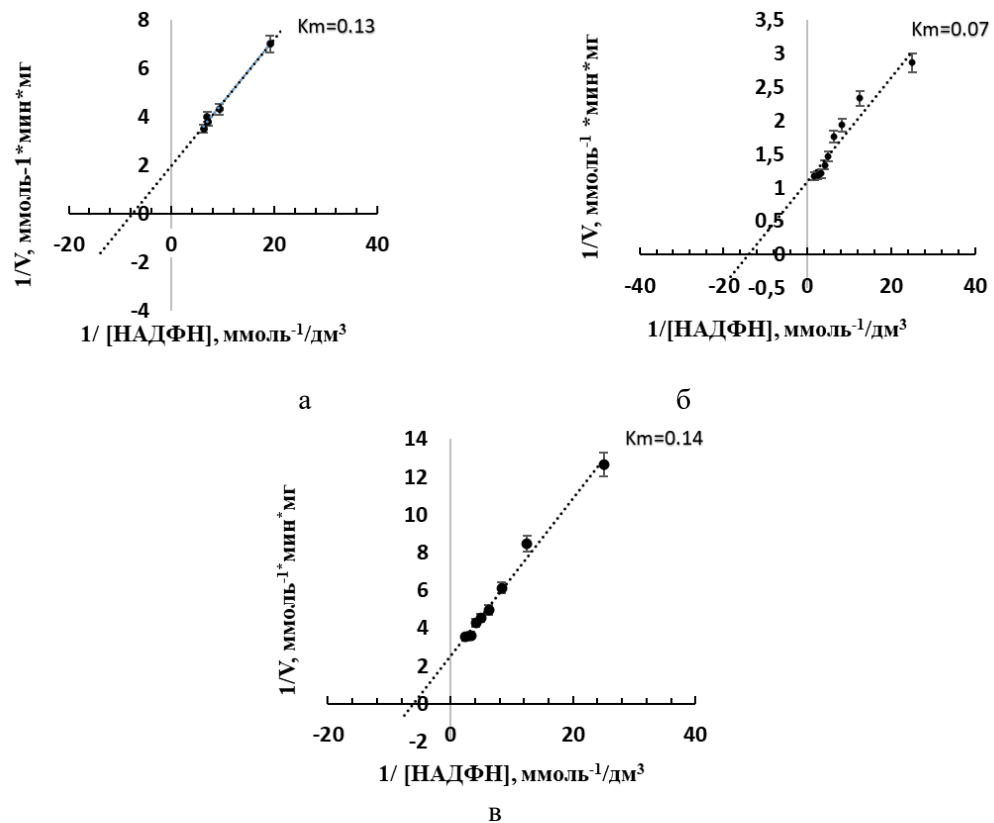


Рис. 3. Зависимость скорости реакции, катализируемой глутатионредуктазой, от концентрации НАДФН, представленная в двойных обратных координатах Лайнуивера-Берка, у контрольных крыс (а), животных с парацетамол-индуцированным поражением печени (б), и крыс, которым на фоне развития патологии вводили и 6-гидрокси-2,2,4-триметил-1,2-дигидрохинолин в дозе 50 мг/кг (в).

Fig. 3. Dependence (shown using the Lineweaver–Burk method of double inverse coordinates) of the rate of reaction catalysed by glutathione reductase on the NADPH concentration in animals of the control group (a), animals with paracetamol-induced liver damage (b), and rats who had a pathology and were administered 6-hydroxy-2,2,4-trimethyl-1,2-dihydroquinoline at a dose of 50 mg/kg (c).

клетке, который, в свою очередь, определяется активностью пентозофосфатного пути и НАДФ-зависимой изоцитратдегидрогеназы. В связи с этим, актуальным является анализ регуляторного влияния изоцитрата (ИЦ) и глюкозо-6-фосфата (Г6Ф) – субстратов НАДФ-зависимой изоцитратдегидрогеназы и глюкозо-6-фосфатдегидрогеназы, на активность ГР при ППП и влиянии ДГХ. Было показано, что введение ДГХ на фоне патологии приводило к изменению регуляторного влияния ИЦ и Г6Ф на активность ГР в направлении значений контрольных крыс. Так, в отличие от животных с патологией, для ГР из печени крыс с ППП, получавших ДГХ, было отмечено наличие

ингибирующего эффекта ИЦ в концентрации 0.05 мМ. По мере возрастания концентрации данного соединения до 0.1 мМ выявлялось небольшое увеличение активности фермента, которая практически не изменялась при дальнейшем внесении в реакцию среду ИЦ (рис. 4). Помимо этого, у крыс, получавших ДГХ на фоне ППП, было отмечено несколько более существенное понижение активности ГР по мере увеличения содержания Г6Ф до 0.1 мМ, относительно показателей группы с ППП (рис. 5). Наблюдаемые изменения регуляторных свойств ГР у животных с патологией, которым вводили ДГХ, могли быть связаны с конформационными изменениями молекул ГР,

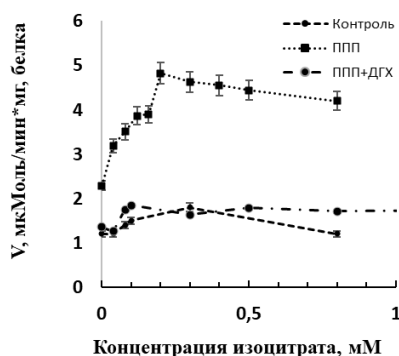


Рис. 4. Воздействие изоцитрата на активность глутатионредуктазы из печени контрольных крыс (Контроль), животных с парацетамол-индуцированным поражением печени (ППП) и крыс, которым на фоне развития патологии вводили и 6-гидрокси-2,2,4-триметил-1,2-дигидрохиолин в дозе 50 мг/кг (ППП+ДГХ).

Fig. 4. The effect of isocitrate on the activity of glutathione reductase from the liver of rats of the control group (Control), animals with paracetamol-induced liver damage (PLD) and rats who had a pathology and were administered 6-hydroxy-2,2,4-trimethyl-1,2-dihydroquinoline at a dose of 50 mg/kg (PLD + DHQ).

происходящими в результате нормализации клеточного оксидативного статуса и снижения потребности в восстановлении GSSH, которое сопровождалось уменьшением интенсивности окисления ИЦ и Г6Ф с образованием НАДФН.

Определенный интерес представляет также оценка воздействия цитрата на активность ГР на фоне введения ДГХ при патологии. Известно, что цитрат обладает антиоксидантными свойствами, что заключается в его способности хелатировать ионы Fe^{2+} , способные запускать образование свободных радикалов в реакции Фентона. Как показали проведенные исследования, для ГР из печени крыс с ППП, получавших ДГХ, наблюдалось менее выраженное снижение активности по мере добавления в реакционную среду цитрата, по сравнению с ферментом из печени животных с патологией (рис. 6). Наблюдаемые изменения свойств ГР, по-

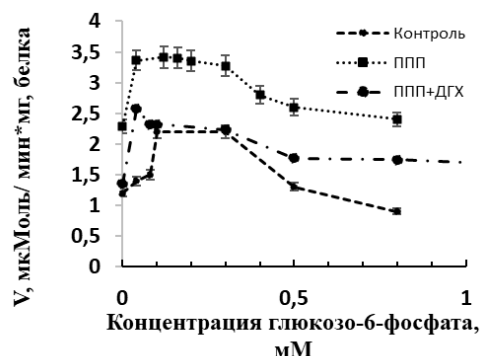


Рис. 5. Воздействие глюкозо-6-фосфата на активность глутатионредуктазы из печени контрольных крыс (Контроль), животных с парацетамол-индуцированным поражением печени (ППП) и крыс, которым на фоне развития патологии вводили и 6-гидрокси-2,2,4-триметил-1,2-дигидрохиолин в дозе 50 мг/кг (ППП+ДГХ).

Fig. 5. The effect of glucose-6-phosphate on the activity of glutathione reductase from the liver of rats of the control group (Control), animals with paracetamol-induced liver damage (PLD) and rats who had a pathology and were administered 6-hydroxy-2,2,4-trimethyl-1,2-dihydroquinoline at a dose of 50 mg/kg (PLD + DHQ).

видимому, были связаны со структурными особенностями ДГХ, заключающимися в наличии в составе молекулы гидроксильной группы и ароматического цикла. Наличие антиоксидантной активности у тестируемого соединения, по-видимому, обуславливало нейтрализацию свободных радикалов, образующихся в условиях превращения парацетамола в N-ацетил-p-бензохинонимин, что способствовало изменению свойств ГР в направлении значений, характерных для контрольных животных.

Таким образом, с использованием методов фракционирования сульфатом аммония, гель-фильтрации на сефадексе G-25 и хроматографии на ДЭАЭ-целлюлозе удалось получить очищенный ферментный препарат ГР, который был использован для оценки регуляторных свойств фермента в условиях воздействия ДГХ на

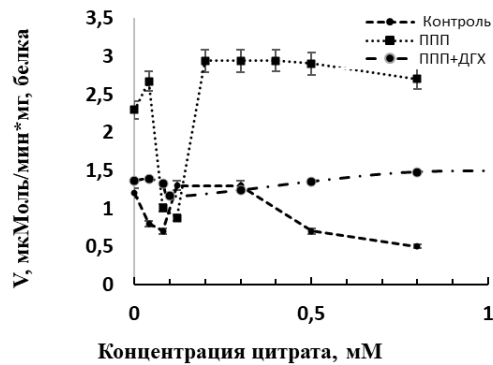


Рис. 6. Воздействие цитрата на активность глутатионредуктазы из печени контрольных крыс (Контроль), животных с парацетамол-индуцированным поражением печени (ППП) и животных, которым на фоне развития патологии вводили 6-гидрокси-2,2,4-триметил-1,2-дигидрохинолин в дозе 50 мг/кг (ППП+ДГХ).

Fig. 6. The effect of citrate on the activity of glutathione reductase from the liver of rats of the control group (Control), animals with paracetamol-induced liver damage (PLD) and rats who had a pathology and were administered 6-hydroxy-2,2,4-trimethyl-1,2-dihydroquinoline at a dose of 50 mg/kg (PPP + DHQ).

фоне ППП. Полученные данные показали, что ДГХ изменяет ряд каталитических и регуляторных параметров ГР, что сопровождается сдвигами соответствующих значений в направлении показателей контрольной группы. Выявленные изменения, судя по всему, были связаны с нормализацией оксидативного статуса, обусловленного нейтрализацией свободных радикалов под действием тестируемого соединения, и снижением степени мобилизации ГР в данных условиях.

Заключение

В результате проведенных исследований удалось получить ферментный препарат ГР из печени экспериментальных животных с 32-кратной степенью очистки с применением методов фракционирования сульфатом аммония, гель-фильтрации на сефадексе G-25 и ионообменной хроматографии на ДЭАЭ-целлюлозе. Показано, что введение ДГХ крысам с ППП способствовало изменению

Список литературы/References

1. Fontana R.D. Acute liver failure including acetaminophen overdose. *North Am Medical Center*. 2008; 92: 761-94.
2. Newsome P.N., Plevris J.N., Nelson L.J., Hayes P.C. Animal models of fulminant

Км ГР по отношению к НАДФН в сторону контрольных значений. Отмечено, что у ГР из печени крыс, которым вводили ДГХ на фоне патологии, при добавлении в реакционную среду цитрата, ИЦ и Г6Ф, наблюдались изменения регуляторных свойств в направлении контрольных значений. Изменения свойств ГР могут быть связаны с нормализацией редокс-статуса в условиях проявления ДГХ антиоксидантной активности и снижением степени мобилизации ферментов глутатионовой антиоксидантной системы.

Конфликт интересов

Авторы заявляют, что у них нет известных финансовых конфликтов интересов или личных отношений, которые могли бы повлиять на работу, представленную в этой статье.

hepatic failure: a critical evaluation. *Liver Transpl.* 2000; 6: 21-31. <https://doi.org/10.1002/lt.500060110>

3. Paz V., Morán M. L., Alcántara N. L., Freixo C., Andrade R.J., Lucena M.I., Cubero F.J. Oxidative Stress in Drug-In-



duced Liver Injury (DILI): From Mechanisms to Biomarkers for Use in Clinical Practice. *Antioxidants*, 2021; 3: 390. <https://doi.org/10.3390/antiox10030390>

4. Hwang K.A., Hwang Y., Hwang H.J., Park N.Y. Hepatoprotective Effects of Radish (*Raphanus sativus* L.) on Acetaminophen-Induced Liver Damage via Inhibiting Oxidative Stress and Apoptosis. *Nutrients*, 2022; 23: 5082. <https://doi.org/10.3390/nu14235082>

5. Bailey C.A., Srinivasan L.J., McGeachin R.B. The effect of ethoxyquin on tissue peroxidation and immune status of single comb White Leghorn cockerels. *Poultry Science*. 1996; 75 (9): 1109-1112. <https://doi.org/10.3382/ps.0751109>

6. Yassir F. B. Y., Sert Y., Kandri R. Synthesis, crystal structure, spectroscopic characterization, Hirshfeld surface analysis, molecular docking studies and DFT calculations, and antioxidant activity of 2-oxo-1,2-dihydroquinoline-4-carboxylate derivatives. *Journal of Molecular Structure*, 2019; 1188: 255-268. <https://doi.org/10.1016/j.molstruc.2019.03.103>

7. Takahashi H., Bekkali Y., Capolino A.J., Gilmore T., Goldrick S.E., Nelson R.M., Thomson D. Discovery and SAR study of novel dihydroquinoline containing glucocorticoid receptor ligands. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*. 2006; 6: 1549-1552. <https://doi.org/10.1016/j.bmcl.2005.12.043>

8. Mitchel J.R., Jallow D.G., Potter W.Z. Acetaminophen-induced hepatic necrosis. Protective role of glutathione. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 2003; 187: 211-217. <https://doi.org/10.3390/antiox8090395>

9. Popov S.S., Agarkov A.A., Kryl'skiy E.D., Shul'gin K.K., Popova T.N., Safonova O.A. The activity of glutathione reductase under liver pathologies and enzyme purification by ion-exchange chromatography for

the catalytic properties study. *Sorbtsionnye i Khromatograficheskie Protsessy*. 2017; 17(1): 168-175. <https://doi.org/10.17308/sorpchrom.2017.17/367> (In Russ.)

10. Carlberg I, Bengt M. Glutathione reductase. *Methods in enzymology. Academic press*. 1985; 113: 484-490.

11. Ancizu, Saioa et al. New quinoxaline derivatives as potential MT₁ and MT₂ receptor ligands. *Molecules (Basel, Switzerland) vol.* 2012; 17(7): 7737-57. <https://doi.org/10.3390/molecules17077737>

12. Kasaikina O.T., Lobanova T.V., Fentsov D.V., Ivanov Yu.A. Paths of conversion of the tetrahydroquinoline series upon interaction with peroxy radical. *News of the Academy of Sciences of the USSR. Chemistry series*. 1983; 32 (10): 2002-2006. <https://doi.org/10.1007/bf00955758>

13. Orhan Püsküllü, et al. Recent studies of antioxidant quinoline derivatives. *Mini reviews in medicinal chemistry*. 2013; 13(3): 365-72. <https://doi.org/10.2174/138955713804999793>

14. Panteleon, Vassiliki et al. Synthesis of some new spiropyranquinolines and evaluation of their free radical scavenging activity. *Chemical & pharmaceutical bulletin*. 2009; 57(5): 446-52. <https://doi.org/10.1248/cpb.57.446>

15. Sankaran, Mathan et al. Synthesis, antioxidant and toxicological study of novel pyrimido quinoline derivatives from 4-hydroxy-3-acyl quinolin-2-one. *Bioorganic & medicinal chemistry letters*. 2010; 20(23): 7147-51. <https://doi.org/10.1016/j.bmcl.2010.09.018>

16. Jaeschke, Hartmut et al. Acetaminophen-induced Liver Injury: from Animal Models to Humans. *Journal of clinical and translational hepatology*. 2014; 2(3): 153-61. <https://doi.org/10.14218/JCTH.2014.00014>

Информация об авторах / Information about the authors

С.Е. Кравцова – аспирант кафедры медицинской биохимии, молекулярной и клеточной биологии, Воронежский государственный университет, Воронеж, Россия

S.E. Kravtsova – post-graduate student, department of medical biochemistry, molecular and cell biology, Voronezh State University, Voronezh, Russia, e-mail: vip.sveta.popova@mail.ru



Т.Н. Попова – декан медико-биологического факультета, д.б.н., Воронежский государственный университет, Воронеж, Россия

Е.Д. Крыльский – доцент кафедры медицинской биохимии, молекулярной и клеточной биологии, к.б.н., Воронежский государственный университет, Воронеж, Россия

А.А. Агарков – доцент кафедры медицинской биохимии, молекулярной и клеточной биологии, к.б.н., Воронежский государственный университет, Воронеж, Россия.

Х.С. Шихалиев – заведующий кафедрой органической химии, д.х.н., Воронежский государственный университет, Воронеж, Россия

С.М. Медведева – доцент кафедры органической химии, к.б.н., Воронежский государственный университет, Воронеж, Россия

С.А. Олейник – аспирант кафедры медицинской биохимии, молекулярной и клеточной биологии, Воронежский государственный университет, Воронеж, Россия

А.И. Лаврушев – студент кафедры медицинской биохимии, молекулярной и клеточной биологии, Воронежский государственный университет, Воронеж, Россия

T.N. Popova – Dean of the Faculty of Biomedical Sciences, grand Ph.D (biology), Voronezh State University, Voronezh, Russia

E.D. Kryl'skii – docent, department of medical biochemistry, molecular and cell biology, Ph.D (biology), Voronezh State University, Voronezh, Russia

A.A. Agarkov – docent, department of medical biochemistry, molecular and cell biology, Ph.D (biology), Voronezh State University, Voronezh, Russia

Kh.S. Shikhaliev – Head of the department of Organic Chemistry, grand Ph.D (chemistry), Voronezh State University, Voronezh, Russia

S.M. Medvedeva – docent, department of organic chemistry, Ph.D (chemistry), Voronezh State University, Voronezh, Russia

S.A. Oleynik – post-graduate student, department of medical biochemistry, molecular and cell biology, Voronezh State University, Voronezh, Russia

A.I. Lavrushev – student, department of medical biochemistry, molecular and cell biology, Voronezh State University, Voronezh, Russia

Статья поступила в редакцию 07.08.2023; одобрена после рецензирования 19.12.2023; принята к публикации 20.12.2023.

The article was submitted 07.08.2023; approved after reviewing 19.12.2023; accepted for publication 20.12.2023.