

UDC 577.112.3:616.33-006

## Глутатіонтрансферазна активність і вміст відновленого глутатіону в цитозолі клітин слизової оболонки шлунка щурів після впливу канцерогену N-метил-N'-нітро-N-нітрозогуанідину

М. О. Тимошенко, О. О. Кравченко, Л. М. Гайда, О. В. Линчак,  
Н. І. Ружицька, Л. І. Остапченко

Навчально-Науковий Центр «Інститут біології», Київський національний університет імені Тараса Шевченка  
Вул. Володимирська, 64/13, Київ, Україна, 01601

maria.bulavka@gmail.com

**Мета.** Визначити глутатіонтрансферазну (ГТ) активність і вміст відновленого глутатіону (GSH) у цитозолі клітин слизової оболонки шлунка за умов експериментального гастроканцерогенезу. **Методи.** ГТ-активність визначали спектрофотометричним методом, вміст GSH – методом спектрофлуориметрії. Гастроканцерогенез ініціювали 10-тижневою заміною питної води на 0,01 %-й розчин канцерогену N-метил-N'-нітро-N-нітрозогуанідину з одночасним переведенням щурів на корм, який містить 5 % NaCl. **Результати.** По закінченні 4- і 6-тижневого споживання щурами канцерогену і NaCl ГТ-активність зростала відповідно на 26 і 94 %, тоді як вміст GSH – на 135 і 85 %. Через 12 тижнів спостерігали зниження активності ГТ на 50 % і максимальне зменшення концентрації GSH на 69 %. Після 18 і 24 тижнів зафіксовано зростання ГТ-активності на 44 і 47 % та зниження вмісту GSH на 55 і 52 %. **Висновки.** Зміни ГТ-активності і концентрації GSH свідчать про порушення глутатіонового гомеостазу, що може призводити як до затримки, так і ініціації розвитку патології. Встановлено зниження вмісту GSH на ранніх стадіях формування пухлин.

*Ключові слова:* глутатіонтрансфераза, відновлений глутатіон, рак шлунка.

**Вступ.** Унікальну роль у формуванні резистентності організму до різноманітних хімічних і фізичних факторів відіграє система глутатіону. Це найважливіший захисний механізм клітини, залучений до біотрансформації екзогенних чужорідних та низки ендогенних сполук, наприклад, гідропероксидів поліненасичених жирних кислот, лінолевої та арахідонової; продуктів пероксидного окиснення ліпідів – 4-гідроксіалк-2-еналю, холестерин- $\alpha$ -оксиду та інших. Ця система здійснює антиоксидантні функції, підтримує редокс-гомеостаз, до її складу входять глутатіонзалежні ферменти (глутатіонтрансфераза і глутатіонпероксидаза) та ферменти знешкодження альдегідів (гліоксалаза I, формальдегід-

дегідрогеназа). Однак найрізноманітнішими та найважливішими є функції глутатіонтрансфераз (ГТ) [1] та відновленого глутатіону (GSH), які прямо чи опосередковано стосуються всіх етапів детоксикації як у позамікросомальному, так і в мікросомальному середовищах [2]. При цьому ГТ здатні відновлювати деякі дисульфіди подібно до тіолтрансфераз [1], демонструвати виражену глутатіонпероксидазну активність при відновленні органічних гідропероксидів [2]. Більш того, деякі ізоферменти ГТ проявляють вищу, ніж глутатіонпероксидази, активність по відношенню до пероксидів тиміну та ДНК [3].

ГТ (КФ 2.5.1.18) – це група ізоферментів другої фази детоксикації, які метаболізують більшість екзогенних та ендогенних гідрофобних електрофільних сполук за рахунок кон'югації з глутатіоном, що

призводить до підвищення їхньої розчинності у воді та полегшення виведення з клітини спеціальними АТФ-залежними транспортними системами [5]. Відомо, що ГТ знешкоджують більше 3000 органічних сполук майже всіх класів: алкени, ацени, аралкени, галогенові та оксигенвмісні сполуки, похідні сірки, азоту, фосфору, які є токсичними речовинами, канцерогенами, мутагенами, цитостатиками, пестицидами, барвниками, ліками та ін. Окрім біотрансформації ксенобіотиків, ГТ виконують важливі функції в ендogenous метаболізмі лейкотрієнів та простагландинів [1]. В організмі ГТ зв'язують такі несубстратні ліганди, як білірубін, жовчні та жирні кислоти, стероїди, похідні гемі [1, 6], тиреоїдні гормони [7]. ГТ класів  $\mu$  та  $\pi$  є регуляторами МАР-кіназного каскаду, які причетні до сигналізації виживання і загибелі клітин [7].

Трипептид глутатіон завдяки наявності реактивної сульфгідрильної групи бере участь у численних реакціях метаболізму [4]. Зокрема, він підтримує функціональну активність мембран, залучений до синтезу білка як запасальна і транспортна форми цистеїну, до транспептидації амінокислот, синтезу попередників ДНК (реакція відновлення рибонуклеозиддифосфатів у дезоксирибонуклеозиддифосфати), до модулювання конформації білкових молекул, регуляції активності ферментів [2]. Він є головним редокс-буфером клітини [4]. Дуже важлива функція GSH полягає у знешкодженні пероксидних сполук за дії глутатіонпероксидаз і детоксикації ксенобіотиків та органічних пероксидів, що реалізується ГТ.

Підвищення активності [1] та експресії ГТ [7] (особливо певних її ізоформ) у більшості випадків злякисного росту, а також нещодавно відкрита властивість ГТ деяких класів модулювати роботу сигнальних шляхів, причетних до апоптозу і клітинної проліферації [7, 8], спонукає до вивчення цього ферменту у канцерогенезі, зокрема гастроанцерогенезі.

Рак шлунка в структурі онкологічної захворюваності і смертності посідає друге місце після раку легень [9, 10]. Частота визначення ранніх форм раку шлунка не перевищує 10–20 %, а у 83 % хворих при первинно виявленому раку вже існують регіонарні метастази [11]. У той же час основою не лише розуміння патогенезу, але й, перш за все, покращення

результатів лікування хворих на рак шлунка може бути вивчення ранніх стадій патології.

З огляду на вищевикладене і з урахуванням того, що окисний стрес пропонується як ключовий фактор у патогенезі раку шлунка [10, 12], нами досліджено активність ГТ і вміст основного низькомолекулярного тіолу – GSH у цитозолі клітин слизової оболонки шлунка за умов експериментального гастроанцерогенезу.

**Матеріали і методи.** Досліди виконували на білих щурах-самцях ( $n = 80$ ) з початковою масою тіла  $100 \pm 20$  г.

Гастроанцерогенез ініціювали 10-тижневою заміною питної води на 0,01 % розчин канцерогену N-метил-N'-нітро-N-нітрозоганідину (МННГ) з одночасним переведенням тварин на корм, збагачений хлоридом натрію (5 % NaCl від сухої маси). Після закінчення цього терміну тварин утримували на стандартному раціоні віварію до кінця 24-го тижня [13]. Далі їх забивали методом дислокації шийних хребців. Вирізані шлунки вивертали слизовою оболонкою назовні та фіксували в нейтральному 10 %-му розчині формаліну для гістологічних досліджень, з інших шлунків виділяли клітини слизової оболонки для біохімічного аналізу. Забір дослідного матеріалу проводили по закінченні 4, 6, 8, 10, 12, 18 і 24 тижнів.

Контрольну групу тварин утримували на стандартному раціоні.

Розвиток досліджуваної патології діагностували візуально та гістологічно. Видалений шлунок фіксували у 10 %-му нейтральному забуференому формаліні, а після стандартної гістологічної обробки заливали парафіном. Зрізи товщиною 5–7 мкм забарвлювали гематоксиліном Бьомера з дофарбуванням еозином і оранжем G [14]. Отримані препарати аналізували на світлооптичному рівні за допомогою мікроскопа Olympus BX-41 («Olympus Europe GmbH», Японія), мікрофотографії отримували, використовуючи цифрову фотокамеру Olympus C-5050 Zoom («Olympus Europe GmbH»), морфометрію проводили із застосуванням комп'ютерної програми WCIF ImageJ.

Клітини слизової оболонки шлунка виділяли за методикою, заснованою на ферментативній дезагрегації клітин з використанням пронази [15, 16].

Дана методика передбачає вивернення за допомогою лігатур ізольованих шлунків слизовою оболонкою назовні, наповнення їх розчином пронази (1 мг/мл), інкубацію (30 хв, 37 °С) при інтенсивному перемішуванні в середовищі, насиченому 95 % O<sub>2</sub> і 5 % CO<sub>2</sub> та збирання дезінтегрованих клітин. Для отримання цитозолу виділені клітини гомогенізували на льоду в малому тефлоновому гомогенізаторі Поттера-Ельвельгема. Гомогенат центрифугували при 20000 g протягом 15 хв (4 °С) на центрифугі «Sigma» (США). У супернатанті виявляли ГТ-активність і вміст GSH. В останньому разі додатково в гомогенат додавали 0,01 М мурашиної кислоти (1:1) для осадження білків [17].

Активність ГТ визначали за оптичною густиною S-(2,4-динітрофеніл)-глутатіону (продукт кон'югації глутатіону з 1-хлор-2,4-динітробензолом), який характеризується максимумом поглинання при  $\lambda = 346$  нм [18]. Реакційна суміш містила 1,5 мл 0,1 М фосфатного буфера (рН 6,5), 0,2 мл 10 мМ GSH, 0,1 мл супернатанту. Реакцію починали додаванням 0,02 мл 0,1 М 1-хлор-2,4-динітробензолу. Приріст оптичної густини реєстрували протягом 4 хв при  $\lambda = 346$  нм і виражали в наномолях кон'югата на 1 мг білка цитозолу за 1 хв.

Вміст GSH реєстрували за допомогою ортофталевого альдегіду, у результаті взаємодії якого з GSH утворюються високофлуоресцентні продукти ( $\lambda_{\text{ex}} = 350$  нм,  $\lambda_{\text{em}} = 420$  нм) [17]. Кінцева суміш для аналізу містила 100 мкл супернатанту, розведеного в 10 разів 0,1 М фосфатним буфером з 5 мМ ЕДТА (рН 8,0), 1,8 мл буфера фосфат-ЕДТА і 100 мкл ортофталевого альдегіду (1 мг/мл у метанолі). Після 15-хв інкубації за кімнатної температури вимірювали інтенсивність флуоресценції при 420 нм за активації 350 нм. Для визначення концентрації GSH будували калібрувальну криву.

Концентрацію білка реєстрували методом Бредфорд [19]. Вимірювання проводили на спектрофотометрі Ultrospec 1100 pro («Amersham Biosciences») та спектрофлуориметрі RF-510 («Shimadzu»).

Експериментальні дані обробляли за загальноприйнятими методами варіаційної статистики з 10 повторами. Достовірність відмінностей між двома вибірками визначали за допомогою критерію Ст'юдента. Результати наведено в значеннях середнього

арифметичного та середньої квадратичної похибки,  $M \pm m$  [20].

Дослідження відповідають основним вимогам щодо утримання і роботи з лабораторними тваринами згідно з правилами Європейської конвенції стосовно захисту хребетних тварин, які використовують в експериментальних дослідженнях та інших наукових цілях (Страсбург, 1986 р.), а також згідно з етичними нормами у відповідності до українського законодавства.

**Результати і обговорення.** Для індукування експериментального гастроантропогенезу використано канцероген МННГ, який у щурів спричиняє утворення пухлин, морфологічно та гістологічно схожих з такими, що діагностуються у людей [21].

Однією з причин вибору даного канцерогену як індуктора злоякісної трансформації було те, що люди піддаються впливу подібних до МННГ канцерогенних речовин при внутрішньошлунковому нітрозилуванні нітритами їжі таких природних гуанідинових сполук, як L-аргінін і креатинін за присутності соляної кислоти [22]. Висока концентрація солі порушує в шлунку слизовий бар'єр, призводить до запалення, дифузної ерозії та деградації. Є досить переконливим те, що споживання великої кількості солі підвищує ризик виникнення раку шлунка у людей [21].

Споживання 0,01 %-го розчину МННГ протягом 4 тижнів дослідники використовують для створення експериментальної моделі передракових змін шлунка [23]. У результаті встановлено, що по закінченні 4 і 6 тижнів споживання розчину МННГ ГТ-активність зростає на 26 і 94 % порівняно з контролем (рис. 1). Такі зміни можна пояснити інтенсифікацією метаболічної інактивації канцерогену клітинами слизової оболонки шлунка за рахунок кон'югації ксенобіотика з GSH, рівень якого також достовірно підвищувався (на 135 і 85 %) у ці ж терміни дослідження (рис. 2). Останнє підтверджує дані літератури, за якими ГТ є індукційними ферментами. Активність таких ферментів значно зростає при введенні різних ксенобіотиків, серед яких є речовини канцерогенної природи [1].

ГТ знешкоджують ксенобіотики, інактивуючи їх хімічно і фізично. Фізична інактивація полягає у зв'язуванні молекул ксенобіотиків лігандин-сайта-

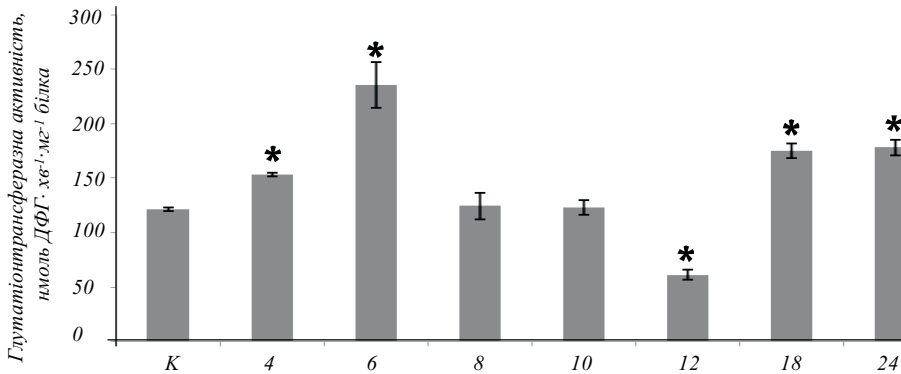


Рис. 1. Глутатіонтрансферазна активність у цитозолі клітин слизової оболонки шлунка. \*ДФГ – S-(2,4-динітрофеніл)-глутатіон; \*\*p < 0,05 (достовірність різниці порівняно з показниками контрольної групи тварин). По осі абсцис – термін спостереження (тижні) дії МННГ

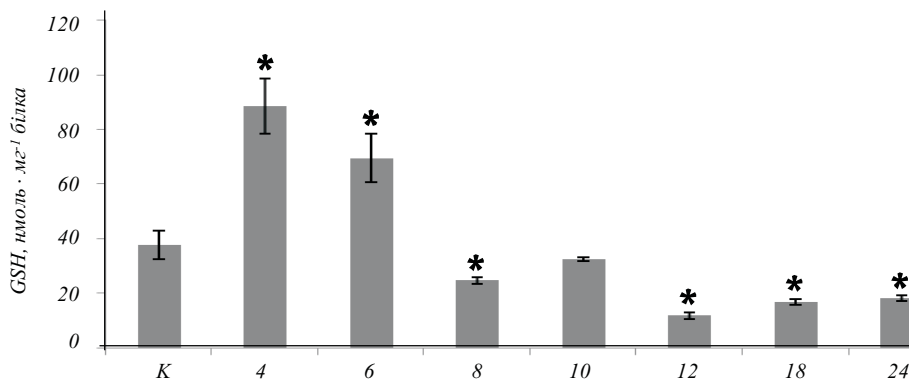


Рис. 2. Вміст відновленого глутатіону (GSH) у цитозолі клітин слизової оболонки шлунка. \*p < 0,05 (достовірність різниці порівняно з показниками контрольної групи тварин). По осі абсцис – термін спостереження (тижні) дії МННГ

ми ГТ, що призводить до тимчасового зниження їхньої концентрації у клітині.

Припускають, що ГТ транспортують ксенобіотики та передають їх ферментам першої фази детоксикації – цитохрому Р450, монооксигеназам, а окиснений продукт використовують у трансферазній реакції. Хімічна інактивація реалізується через каталіз реакцій двох типів: нуклеофільного приєднання тіольної групи GSH до електрофільного центра субстрату та нуклеофільного заміщення на глутатіон за електрофільним атомом вуглецю, азоту, сірки або фосфору [8].

Отже, ГТ зв'язують численні гідрофобні речовини, але хімічно знешкоджують лише ті, які мають електрофільний центр [1]. У більшості реакцій, що каталізуються ГТ, утворюються тіоефіри, які є кон'югатами глутатіону, при цьому GSH втрачається незворотно. У подальшому тіоефіри транспортуються кровотоком у печінку, де перетворюються на цистеїнові кон'югати. Останні N-ацетилуються та трансформуються у нетоксичні меркаптурові кислоти, які виводяться з організму із сечею [24].

Логічно припустити, що індукція ГТ за умов надходження МННГ є захисним механізмом організму. Проте для ГТ зафіксовано явище метаболічної активації деяких ксенобіотиків, перетворення їх на сильні алкілятори, здатні пошкоджувати ДНК. Прикладом таких сполук є алкілнітрозогуанідини [1], до яких за структурою можна віднести і МННГ. У такому разі стимульований ефект МННГ у патогенезі хімічно індукованого раку шлунка обумовлений активацією цієї сполуки глутатіонтрансферазою.

Враховуючи викладене вище, важко встановити роль активації ГТ у розвитку досліджуваної патології, оскільки вона може бути як пригнічувальна (через інтенсифікацію нівелювання канцерогену), так і стимульовальна внаслідок метаболічної активації останнього.

У кислому середовищі шлунка МННГ перетворюється на N-метил-N'-нітрогуанідин з вивільненням азотистої кислоти. Така активна форма канцерогену здатна алкілювати пуринові основи ДНК і РНК епітеліальних клітин з утворенням 7-метилгуа-

Figures to article by Tymoshenko M. O. et al.

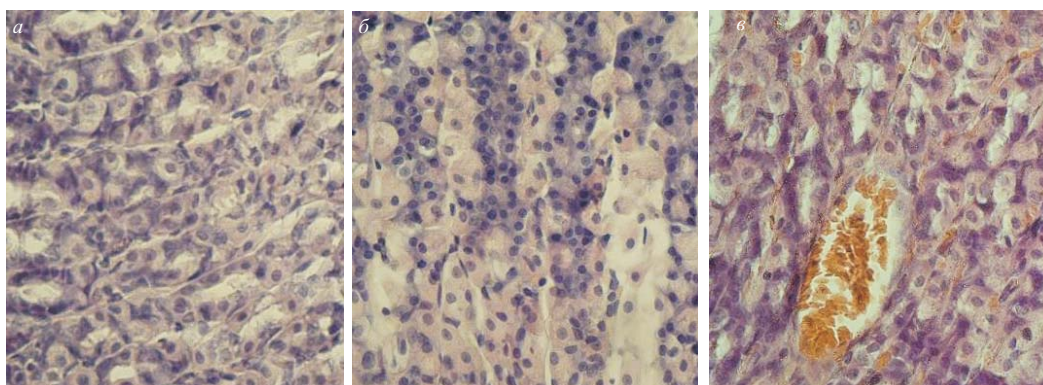


Рис. 3. Мікрофотографії зрізів слизової оболонки шлунка за умов експериментального гастроканцерогенезу: *a* – контроль; *б* – 4-й тиждень; *в* – 6-й тиждень. Забарвлення гематоксиліном та еозином;  $\times 600$

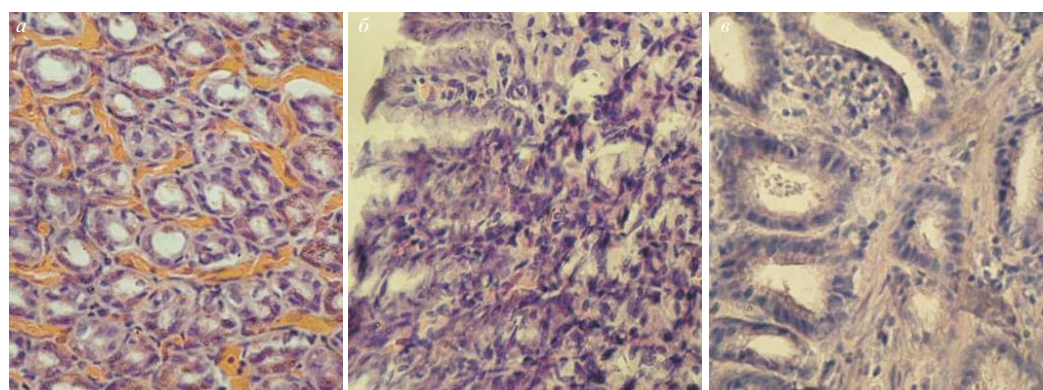


Рис. 4. Мікрофотографії зрізів слизової оболонки шлунка за умов експериментального гастроканцерогенезу: *a* – шлункові ямки (8-й тиждень); *б* – метапластичні зміни (10-й тиждень); *в* – аденома (12-й тиждень). Забарвлення гематоксиліном та еозином;  $\times 600$



Рис. 5. Макроскопічні зміни слизової оболонки шлунка через 18 тижнів експериментального гастроканцерогенезу: *a* – контроль; *б* – 18-й тиждень гастроканцерогенезу (*I* – пухлина)

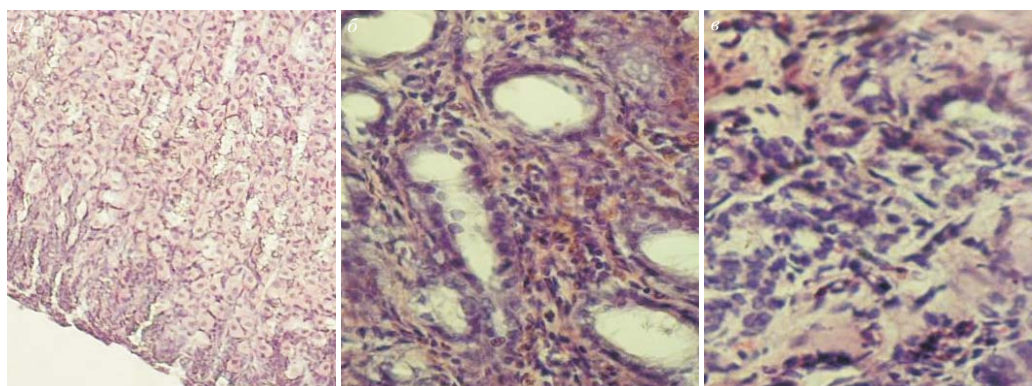


Рис. 6. Мікрофотографії зрізів слизової оболонки шлунка за умов експериментального гастроканцерогенезу: *a* – контроль; *б* – аденома (18-й тиждень); *в* – аденокарцинома (18-й тиждень). Забарвлення гематоксиліном та еозином;  $\times 600$

ніну та 3-метиладеніну [25], призводячи до мутацій [26], а також викликати метилювання білків [23] і генерацію активних форм кисню [27].

Після впливу МННГ протягом 4 тижнів виявлено зменшення товщини слизової оболонки та глибини кишкових крипт. У той же час площа парієтальних і головних клітин та їхніх ядер збільшується на 20–30 % (рис. 3, б, див. уклею). Останнє може свідчити про зростання функціональної активності клітин, основною функцією яких, як відомо, є секретія соляної кислоти у просвіт шлунка і продукування слизу, ймовірно, направлене на захист від пошкоджуючого фактора. Наприкінці 6-го тижня впливу МННГ відзначено зміни морфофункціонального стану слизової оболонки шлунка, про що свідчить розширення просвіту залоз, розширення і повнокрів'я судин, десквамація епітеліальних клітин, збільшення продукування слизу (рис. 3, в, див. уклею).

На етапі 8 і 10 тижнів дослідження експериментального гастроканцерогенезу рівень ГТ-активності відповідав такому у контрольних тварин.

Зниження ГТ-активності до контрольних показників порівняно з попередніми термінами може бути пов'язане з достовірним зменшенням на 8-му тижні вмісту GSH (на 34 %). При цьому може порушуватися участь ГТ у процесах хімічної детоксикації. Однак вірогідне і фізичне знешкодження, яке полягає у нековалентному зв'язуванні з лігандин-сайтами ферменту гідрофобних речовин, у тому числі нітрозосполук [1, 2].

Деяким представникам ГТ (наприклад ГТР1-1 родини  $\pi$ ) за окисного стресу притаманний механізм «самозахисту». У разі виснаження глутатіонового пулу нітрозильований глутатіон нітрозилує залишки Cys47 і Cys110 однієї із субодиниць ГТ. Через негативну кооперативність реакційно активний залишок Cys47 другої субодиниці маскується від нітрозилування та зберігає здатність до типової трансферазної реакції [8], що, можливо, і забезпечує утримання ГТ-активності на 8-му тижні у межах контрольних значень.

Після впливу МННГ протягом 8 тижнів у слизовій оболонці шлунка спостерігається розширення просвіту залоз, розширення та повнокрів'я судин, виявлено також ознаки запалення, атрофічні зміни

поверхневого епітелію (рис. 4, а, див. уклею). У декількох препаратах знайдено ерозії та виразки шлунка. Споживання тваринами МННГ протягом 8 тижнів спричиняє достовірне зменшення товщини слизової оболонки та глибини шлункових ямок.

На наступній стадії дослідження моделі (10-й тиждень) внутрішньоклітинний вміст GSH відповідав контрольним показникам. За фізіологічних значень вмісту GSH нітрозильований глутатіон перетворюється на динітрозилдиглутатіоніл заліза (ДНДГЗ), до якого ГТ виявляють надзвичайно високу спорідненість, при цьому каталітична активність субодиниці, причетної до комплексоутворення, втрачається. За цих умов конформація другої субодиниці змінюється таким чином, що її афінність до ДНДГЗ знижується, але це не перешкоджає прояву її трансферазної активності через залучення вищезгаданого механізму «самозахисту» [8]. Наприкінці 10-го тижня впливу МННГ спостерігаються значні морфофункціональні зміни слизової оболонки шлунка, виявлено збільшення її товщини, розширення просвіту залоз, запалення, метапластичні та атрофічні зміни поверхневого епітелію (рис. 4, б, див. уклею). Є ділянки з гіперпластичними змінами, зустрічаються клітини з атипією і гіпертрофічними модифікаціями. Через 12 тижнів відмічено зниження ГТ-активності на 50 % у порівнянні з контрольними значеннями та максимальне зниження концентрації GSH на 69 %. Виявлене зниження ферментативної активності може бути пов'язане з утворенням кон'югатів, здатних інгібувати ГТ [1].

За умов тривалого дефіциту GSH у повній мірі може реалізуватися третя функція ГТ – ковалентне зв'язування сильних електрофілів, активних метаболітів канцерогену. Такий перехват алкіляторів інактивує фермент, але є додатковим захисним механізмом клітини. Ця властивість ферменту забезпечується його високою спорідненістю до гідрофобних речовин та великою кількістю в клітині [2, 8].

Зазначимо, що на гістологічних препаратах слизової оболонки шлунка ознаки злоякісної трансформації почали спостерігатися вже з 12-го тижня експериментального гастроканцерогенезу (рис. 4, в, див. уклею). Наприкінці 12-го тижня слизова оболонка шлунка зазнає виражених змін: спостерігаються розширення просвіту залоз, ознаки запалення

ня, атрофічні та метапластичні модифікації, є ділянками з гіперпластичними порушеннями, зустрічаються клітини з атипією. У деяких щурів виявлено ерозії та виразки шлунка. У частини тварин знайдено аденоми та одну аденокарциному.

Наприкінці 18-го і 24-го тижнів експериментального гастроканцерогенезу концентрація GSH у клітинах слизової оболонки шлунка знижується на 55 і 52 % відповідно. У ці ж терміни дослідження моделі зафіксовано зростання активності ГТ на 44 і 47 % відносно контролю. Встановлено підвищення може бути спричинене зростанням кількості ендогенних субстратів, оскільки стимуляцію канцерогеном-ксенобіотиком було припинено на 10-му тижні. Це, ймовірно, пов'язано з індукцією ферменту продуктами пероксидного окиснення ліпідів. У реакціях відновлення глутатіонтрансферазами органічних пероксидів до спиртів утворюється окиснений глутатіон, який в подальшому здатний відновлюватися глутатіонредуктазою.

Починаючи з 18-го тижня у пілоричному відділі шлунка у 70 % тварин спостерігали новоутворення, які мали вигляд локальних потовщень слизової оболонки блюдцеподібної форми із заглибиною в центрі (рис. 5, див. уклейку) та за гістологічними дослідженнями відповідали аденомі і аденокарциномі (рис. 6, б, в, див. уклейку). На зрізах слизової оболонки шлунка візуалізувалися деформовані залози, диспластичні зміни, клітинна атипія, також регенеративна гіперплазія з ерозіями і виразками.

З огляду на складний процес регуляції активності ГТ, впливу на неї ксенобіотика МННГ та його метаболічних похідних однозначно встановити значення даного ферменту на кожному з етапів МННГ-стимульованого гастроканцерогенезу складно. Однак не виникає сумнівів, що ГТ і система, в якій вони реалізують свої функції, відіграє важливу роль у переродженні клітин не лише внаслідок захисту від вільних радикалів, деградації та виведення з організму екзо- і ендогенних електрофільних сполук, але й може бути залучена до його стимулювання через генерацію додаткових метаболічно агресивних похідних канцерогену.

**Висновки.** Зміни глутатіонтрансферазної активності і концентрації відновленого глутатіону свідчать про порушення глутатіонового гомеоста-

зу, що може бути причетним як до затримки, так і ініціації розвитку патології. Встановлено зниження вмісту GSH на ранніх стадіях формування пухлин.

*M. O. Tymoshenko, O. O. Kravchenko, L. M. Gaida, O. V. Lynchak, N. I. Ruzhytska, L. I. Ostapchenko*

Glutathione transferase activity and reduce glutathione content in the cytosol of rat gastric mucosa cells under carcinogen N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine treatment

Educational and Scientific Centre «Institute of Biology»

Taras Shevchenko National University of Kyiv

64/13, Volodymyrska Str., Kyiv, Ukraine, 01601

Summary

**Aim.** To determine the activity of glutathione transferase (GT) and the content of reduced glutathione (GSH) in the cytosol of the gastric mucosa cells in experimental gastrocarcinogenesis. **Methods.** The activity of GT was determined spectrophotometrically, the content of GSH was measured spectrofluorimetrically. Gastrocarcinogenesis was initiated by 10-week replacement of drinking water by 0.01 % solution of carcinogen N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine, at the same time the rats were given a diet containing 5 % NaCl. **Results.** It was established that at the end of the 4<sup>th</sup> and 6<sup>th</sup> weeks of consumption of carcinogen and NaCl, the activity of GT increased by 26 and 94 %, whereas the content of GSH increased by 135 and 85 %, respectively. After 12 weeks there was a decrease in the activity of GT by 50 % and the maximum decrease in the GSH concentration by 69 %. At the end of the 18<sup>th</sup> and 24<sup>th</sup> weeks it was recorded the increase in the activity of GT by 44 and 47 % and the decrease in the GSH content by 55 and 52 %. **Conclusions.** The changes in the activity of GT and GSH-content are evidence of the violation of glutathione homeostasis, which may cause the delay as well as initiation of development of the pathology. The reduction of GSH is established at the early stages of tumors formation.

**Keywords:** glutathione transferase, reduced glutathione, gastric cancer.

*M. A. Тимошенко, О. А. Кравченко, Л. Н. Гайда, О. В. Линчак, Н. И. Рузжицкая, Л. И. Остапченко*

Глутатионтрансферазная активность и содержание восстановленного глутатиона в цитозоле клеток слизистой оболочки желудка крыс после воздействия канцерогена N-метил-N'-нитро-N-нитрозогуанидина

Резюме

**Цель.** Определить глутатионтрансферазную (ГТ) активность и содержание восстановленного глутатиона (GSH) в цитозоле клеток слизистой оболочки желудка в условиях экспериментального гастроканцерогенеза. **Методы.** ГТ-активность определяли спектрофотометрическим методом, содержание GSH – методом спектрофлуориметрии. Гастроканцерогенез инициировали 10-недельной заменой питьевой воды на 0,01 %-й раствор канцерогена N-метил-N'-нитро-N-нитрозогуанидина с одновременным переводением крыс на корм, содержащий 5 % NaCl. **Результаты.** По окончании 4 и 6 недель потребления крысами канцерогена и NaCl ГТ-активность увеличилась соответственно на 26 и 94 %, тогда как содержание GSH – на 135 и 85 %. Через 12 недель наблюдали снижение ГТ-активности на 50 % и максимальное умень-

шение концентрации GSH на 69 %. Спустя 18 и 24 недели зафиксировано возрастание активности ГТ на 44 и 47 %, а также снижение содержания GSH на 55 и 52 %. **Выводы.** Изменения ГТ-активности и концентрации GSH свидетельствуют о нарушении гомеостаза глутатиона, что может вызывать как задержку, так и инициацию развития патологии. Установлено снижение содержания GSH на ранних стадиях формирования опухолей.

**Ключевые слова:** глутатионтрансфераза, восстановленный глутатион, рак желудка.

## REFERENCES

1. *Kolesnichenko L., Kulinsky V.* Glutathione transferases // *Adv. Curr. Biol.*–1989.–**107**, N 2.–P. 179–194.
2. *Korzhov V., Zhadan V., Korzhov M.* The role of glutathione system in the processes of detoxication and antioxidant protection // *J. Natl Acad. Med. Sci. Ukraine.*–2007.–**13**, N 1.–P. 3–19.
3. *Kulinsky V., Kolesnichenko L.* The structure, properties, biological role and regulation of glutathione peroxidase // *Adv. Curr. Biol.*–1993.–**113**, N 1.–P. 107–122.
4. *Oktyabrsky O., Smirnova G.* Redox regulation of cellular functions // *Biochemistry (Mosc.)*–2007.–**72**, N 2.–P. 158–174.
5. *Moskow J. A., Fairchild C. R., Madden M. J., Ransom D. T., Wientand H. S., O'Brien E. E., Poplack D. G., Cossman J., Myers C. E., Cowan K. H.* Expression of anionic glutathione-S-transferase and P-glycoprotein genes in human tissues and tumors // *Cancer Res.*–1989.–**49**, N 6.–P. 1422–1428.
6. *Hayes P., May L., Hayes J. D., Harrison D. J.* Glutathione-S-transferases in human liver cancer // *Gut.*–1991.–**32**, N 12.–P. 1546–1549.
7. *Townsend D. M., Tew K. D.* The role of glutathione-S-transferase in anti-cancer drug resistance // *Oncogene.*–2003.–**22**, N 47.–P. 7369–7375.
8. *Slonchak A. M., Obolonska M. Yu.* Structure and functions of glutathione S-transferase P1-1 // *Ukr. Biochim. Zh.*–2009.–**81**, N 1.–P. 5–13.
9. *Imyanitov E. N.* Epidemiology and biology of gastric cancer // *Practicheskaya onkologiya.*–2009.–**10**, N 1.–P. 1–7.
10. *Mahmoud L., Yousef E. S.* Free radicals and gastric cancer // *Gastric carcinoma – Mol. Aspects and Curr. Adv. / Ed. L. Mahmoud.*– Intech, 2011.–P. 160–184.
11. *Simonov N. N., Myaukina L. M., Filin A. V., Rybalkin Yu. I.* The problems of diagnosis and rational treatment of early gastric cancer (T1N0M0 and T1N0M0) // *Practicheskaya onkologiya.*–2001.–**3**, N 7.–P. 25–30.
12. *Tandon R., Khanna H. D., Dorababu M., Goel R. K.* Oxidative stress and antioxidants status in peptic ulcer and gastric carcinoma // *Indian J. Physiol. Pharmacol.*–2004.–**48**, N 1.–P. 115–118.
13. *Kuroiwa Y., Ishii Y., Umemura T., Kanki K., Mitsumori K., Nishikawa A., Nakazawa H., Hirose M.* Combined treatment with green tea catechins and sodium nitrite selectively promotes rat forestomach carcinogenesis after initiation with N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine // *Cancer Sci.*–2007.–**98**, N 7.–P. 949–957.
14. *Goralsky L.* Fundamentals of histological techniques and morphofunctional research methods in health and disease.–Zhitoimir: Polissya, 2005.–288 p.
15. *Roediger W. E., Truelove S. C.* Method of preparing isolated colonic epithelial cells (colonocytes) for metabolic studies // *Gut.*–1979.–**20**, N 6.–P. 484–488.
16. *Tairov M. M., Bersimbaev R. I., Argutinskaya S. V., Salgany R. I.* Cellular localization of adenylyl cyclases, activated by histamine and prostaglandin E2 in rat gastric mucosa and their role in regulation of gastric secretion // *Biokhimiia.*–1983.–**48**, N 6.–P. 1035–1041.
17. *Hissin P., Hilf R.* A fluorometric method for determination of oxidized and reduced glutathione in tissues // *Anal. Biochem.*–1976.–**74**, N 1.–P. 214–226.
18. *Vlasova S. N., Shabunina E. I., Pereslegina I. A.* The activity of the glutathione-dependent enzymes of erythrocytes in chronic liver diseases in children // *Lab. Delo.*–1990.–**8**.–P. 19–22.
19. *Bradford M. M.* A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding // *Anal. Biochem.*–1976.–**72**.–P. 248–254.
20. *Brandt Z.* Statistical methods of analysis of observations.–M.: Mir, 1975.–312 p.
21. *Mirvish S. S.* Formation of N-nitroso compounds: chemistry, kinetics and *in vivo* occurrence // *Toxicol. Appl. Pharmacol.*–1975.–**31**, N 3.–P. 325–351.
22. *Arivazhagan S., Balasenthil S., Nagini S.* Modulatory effects of garlic and neem leaf extracts on N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine (MNNG)-induced oxidative stress in Wistar rats // *Cell Biochem. Funct.*–2000.–**18**, N 1.–P. 17–21.
23. *Campbell-Thompson M., Lauwers G. Y., Reyher K. K., Cromwell J., Shiverick K. T.* 17 $\beta$ -Estradiol modulates gastroduodenal preneoplastic alterations in rats exposed to the carcinogen N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine // *Endocrinology.*–1999.–**140**, N 10.–P. 4886–4894.
24. *Hayes J. D., Strange R. C.* Glutathione-S-transferase polymorphisms and their biological consequences // *Pharmacology.*–2000.–**61**, N 3.–P. 154–166.
25. *Sugimura T., Fujimura S., Baba T.* Tumor production in the glandular stomach and alimentary tract of the rat by N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine // *Cancer Res.*–1970.–**30**, N 2.–P. 455–465.
26. *Fox J.* Review article: *Helicobacter* species and *in vivo* models of gastrointestinal cancer // *Aliment Pharmacol. Ther.*–1998.–**12**, Suppl. 1.–P. 37–60.
27. *Gunassekaran G. R., Gayathri R., Priya D. K. D., Murugan S., Sakithsekaran D.* Protective role of gossypol against N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine induced gastric carcinogenesis in experimental rats // *Int. J. Med. Med. Sci.*–2010.–**2**, N 4.–P. 121–127.

Received 05.05.12