

АКТИВНІСТЬ ЕНЗИМАТИЧНИХ СИСТЕМ ДЕТОКСИКАЦІЇ В ПЕЧІНЦІ МИШЕЙ В УМОВАХ РІЗНОЇ ЗАБЕЗПЕЧЕНОСТІ РЕТИНОЇДАМИ

© М. М. МАРЧЕНКО, Г. П. КОПИЛЬЧУК, І. О. ШМАРАКОВ,
І. М. БУЧКОВСЬКА

Чернівецький національний університет імені Юрія Федьковича, Україна;
e-mail: ivannabuchkovska@mail.ru

У роботі досліджували активність компонентів системи детоксикації печінки в умовах різної забезпеченості ретиноїдами. Показано, що в мікросомній фракції печінки А-дефіцитних тварин відбувається зниження *n*-гідроксилазної та *N*-деметилазної активності цитохрому Р-450 з одночасним зниженням глутатіон-*S*-трансферазної активності. Водночас відсутність запасів ретиноїдів у печінці нокаутних тварин є визначальною лише в разі *n*-гідроксилазної активності системи цитохрому Р-450. Зміни ензиматичної активності глутатіон-*S*-трансферази в групі вітамін А-дефіцитних мишей в мікросомній та постмікросомній фракціях печінки неоднозначні. У постмікросомній фракції печінки мишей, що знаходилися на вітамін А-дефіцитній дієті спостерігається підвищення глутатіонтрансферазної активності, в той час як її показники в групі нокаутних тварин не виявляли вірогідних відмінностей відносно контролю.

Ключові слова: вітамін А, ретиноїди, печінка, клітинна система детоксикації.

Внутрішньоклітинна біотрансформація ксенобіотиків і ендогенних токсичних метаболітів – один із ключових факторів у підтриманні повноцінного метаболізму, який визначає резистентність клітин і тканин організму до розвитку патологічних станів [1]. Ензиматичні системи клітинної детоксикації представлені неспецифічними монооксигеназами (1.14.14.1) ендоплазматичного ретикулула, численними ізоформами цитохрому Р-450 (СYP) та ензимами біокон'югації, серед яких провідна роль належить глутатіонтрансферазам (GST; 2.5.1.18) [1, 2].

Активність ензимів клітинної біотрансформації, як конститутивних, так й індукцибельних ізоформ [1], залежить від тканинної доступності та забезпеченості організму визначеними есенціальними факторами. В аспекті потенційного регулюючого впливу на зазначені ензиматичні системи особливої уваги заслуговують ретиноїди – вітамін А та його метаболіти, які, функціонуючи як транскрипційні регулятори експресії більше ніж 500 генів [3, 4] та як антиоксиданти [3] є необхідними факторами для нормального росту, розвитку та диференціації [3, 5]. Ретиноева кислота, взаємодіючи зі специфічними ядерними рецепторами (retinoic acid receptor – RAR та retinoid X receptor – RXR) і рецепторами проліфераторів пероксисом (PPAR), здатна

безпосередньо індукувати експресію окремих ізоформ цитохрому Р-450 (родини СYP1А, СYP3А, СYP4А, СYP1В, СYP2С, СYP2S) [6, 7] та глутатіонтрансфераз [8, 9]. Зазначені вище ензими біотрансформації задіяні в процесах окислення ретинолу [10] та гідроксилювання й ізомеризації ретиноевої кислоти [10, 11].

Значна частина ретиноїдів організму ссавців (до 60%) зберігається в ліпідних краплях стелатних клітин печінки у формі ретинілефірів. Ретинол, утворений під час гідролізу, транспортується до гепатоцитів, де шляхом ензиматичного окислення перетворюється у ретиноеву кислоту або транспортується до периферійних тканин [5]. Унікальна тканоспецифічна локалізація значної кількості ретиноїдів у високоспеціалізованих клітинах печінки об'єктивно свідчить про їхню виключну роль у метаболізмі цього органа. Водночас відомо, що низький рівень ретинілефірів у печінці асоціюється з численними патологічними станами, серед яких гепатити, стеатоз, фіброз і гепатоклітинний рак [3, 4]. За вивчення молекулярних механізмів перебігу цих захворювань виявляється низький рівень ретиноїдів у клітинах печінки, який не залежить від їх надходження в організм.

Мета роботи – дослідити активність ензиматичних систем детоксикації в печінці ми-

шей в умовах різної забезпеченості організму ретиноїдами.

Матеріали і методи

Дослідження проводили на мишах лінії C57 з масою тіла 25–30 г, віком 2,5–3,0 місяці. Утримання тварин і маніпуляції з ними проводили згідно з положеннями «Європейської конвенції про захист хребетних тварин, що використовуються для дослідних та наукових цілей» (Страсбург, 1986) та «Загальних етичних принципів експериментів на тваринах», ухвалених Першим національним конгресом з біоетики (Київ, 2001).

У роботі використано два методичні підходи, які полягали в аліментарній депривації надходження вітаміну А та нокауті ключового ензиму синтезу ретинілефірів лецитин:ретинол ацилтрансферази (LRAT, 2.3.1.135), що призводить до браку ретиноїдів у печінці.

Дослідних тварин було поділено на групи:

I група (контрольна, К) – тварини, яких утримували на напівсинтетичному раціоні, збалансованому за всіма нутрієнтами (в тому числі 30 МО вітаміну А у формі ретинілацетату);

II група (А-дефіцитна, А) – тварини, які протягом 6 тижнів до початку експерименту одержували напівсинтетичний раціон, збалансований за всіма нутрієнтами, але позбавлений вітаміну А (у формі ретинілацетату) [12]. Наявність маргінального авітамінозу А у тварин цієї групи визначали раніше описаними морфологічними та біохімічними параметрами [13];

III група – тварини, яких утримували на напівсинтетичному раціоні, збалансованому за всіма нутрієнтами (в тому числі 30 МО вітаміну А у формі ретинілацетату), які в умовах збереження нормального надходження ретинолу до організму, але не здатні синтезувати ретинілефіри в печінці внаслідок нокаута гену ензиму лецитин:ретинол ацилтрансферази (LRAT, 2.3.1.135) і тому повністю позбавлені запасів ретиноїдів (група мишей *Lrat^{-/-}*).

Кожна тварина знаходилась окремо в пластмасовій клітці з піщаною підстилкою, вода була доступна *ad libitum*. Нормування добового раціону дослідних груп проводили на основі рівня споживання дієти тваринами контрольної групи (з урахуванням принципу парного харчування).

Евтаназію тварин здійснювали під легким ефірним наркозом.

Активність компонентів клітинної системи детоксикації визначали в мікросомній

(*n*-гідроксилазна та N-деметилазна активність цитохрому P-450; глутатіон-S-трансферазна активність) та цитозольній (постмікросомній) (глутатіон-S-трансферазна активність) фракціях клітин печінки, які отримували за раніше описаним методом [14]. Ступінь забрудненості мікросомної фракції мембранами інших клітинних структур контролювали шляхом порівняльного визначення 5'-нуклеотидазної активності як специфічного маркера плазматичних мембран та сукцинатдегідрогеназної активності як маркера внутрішньої мембрани мітохондрій.

Показники ензиматичної активності системи цитохрому P-450 в мікросомній фракції печінки мишей оцінювали за швидкістю деметилювання диметиланіліну (N-деметилазна активність) та гідроксилювання аніліну (*n*-гідроксилазна активність) за кількістю утвореного формальдегіду і *n*-амінофенолу, що визначали з урахуванням коефіцієнтів молярного поглинання 1,5 та 13,3 мМ⁻¹·см⁻¹ та виражали в нмоль/хв·мг протеїну [15].

Глутатіон-S-трансферазну активність (GST) у мікросомній та постмікросомній фракціях клітин печінки реєстрували за швидкістю ензиматичного утворення глутатіон-S-2,4-динітробензолу в реакції відновленого глутатіону з 1-хлор-2,4-динітробензолом (ХДНБ) і виражали в мкмоль продукту за 1 хв на 1 мг протеїну [16].

Вміст відновленого глутатіону (GSH) в постмікросомній фракції печінки мишей визначали за реакцією з 5,5'-дитіо-біс-2-нітробензойною кислотою (ДТНБ) та виражали в мкмоль/мг протеїну [17].

Концентрацію протеїну визначали за методом Lowry et al. [18].

Статистичну обробку експериментальних результатів проводили з використанням пакета аналізу даних у Microsoft Excel. Для визначення вірогідних відмінностей між середніми величинами використовували *t*-критерій Стьюдента. Різниця вважали вірогідними при $P \leq 0,05$.

Результати та обговорення

Результати проведених досліджень показали, що в мікросомній фракції печінки тварин, які знаходилися на вітамін А-дефіцитній дієті, відбувається зниження ензиматичної активності системи цитохрому P-450. У тварин цієї групи показники *n*-гідроксилазної та N-деметилазної активності виявилися нижчими відносно контролю в 2 та 1,5 раза відповідно (рис. 1).

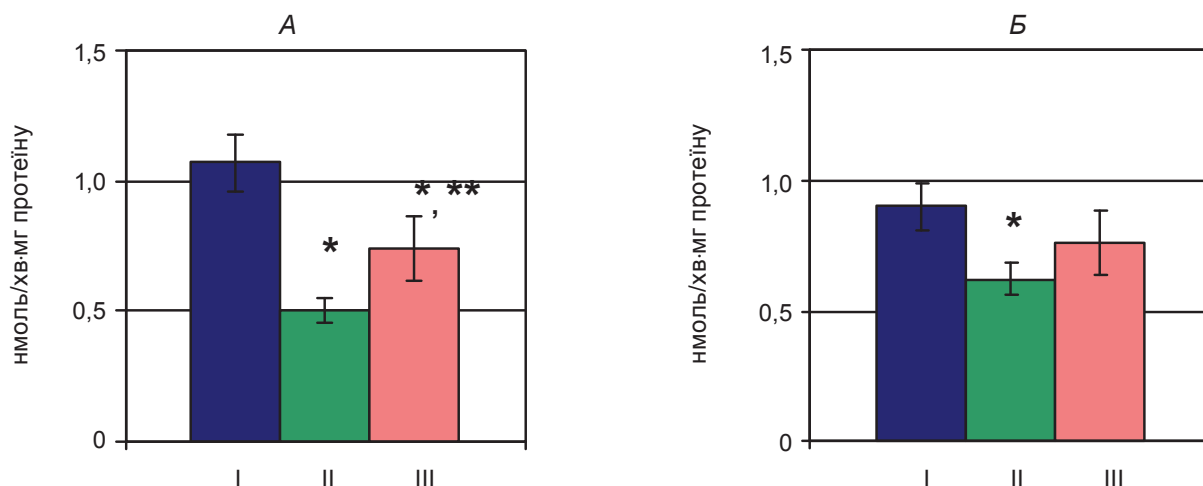


Рис. 1. *n*-Гідроксилазна (А) та *N*-деметилазна (Б) активність цитохрому *P*-450 мікросомної фракції клітин печінки мишей за відсутності в них вітаміну А ($M \pm m$, $n = 10$); I – контроль; II – вітамін А-дефіцитні тварини; III – миші, нокаутні за геном *Lrat*^{-/-}. * Статистично вірогідна різниця порівняно з показниками контролю, $P \leq 0,05$; # статистично вірогідна різниця порівняно з показниками групи тварин, які знаходилися на вітамін А-дефіцитному раціоні

Встановлені зміни свідчать про залежність активності мікросомних монооксигеназ від рівня вітаміну А в організмі та узгоджуються з даними літератури про необхідність ретиноїдів для експресії окремих ізоформ цитохромів [4, 6]. Ретиноева кислота як ліганд специфічних ядерних рецепторів (RAR, RXR) здатна прямо впливати на експресію окремих представників родин цитохромів 1A, 3A, 4A, 1B, 2C, 2S, задіяних у процесах метаболізму ретиноїдів, стероїдів, арахідонатів та ксенобіотиків [6, 7].

Проте під час проведення досліджень із використанням експериментальних дієт досить важко розмежувати прямий вплив відсутності запасів ретиноїдів у печінці від неспецифічних наслідків їх аліментарної депривації. Наприклад, відсутність надходження вітаміну А в організм здатна посилювати прооксидантні процеси в тканинах [19].

З метою нівелювання можливого впливу на досліджувані показники неспецифічних реакцій, в тому числі і прооксидантних, спричинених вживанням вітамін А-дефіцитного раціону в експериментальних тварин, нами використано трансгенних мишей, нокаутних за геном *Lrat* [20]. Продуктом цього гену є ензим етерифікації ретинолу ацильними залишками [5]. Миші *Lrat*^{-/-} за збереження нормального фенотипу нездатні синтезувати ретинілефіри в печінці, а тому повністю позбавлені запасів ретиноїдів.

Дослідження активності системи цитохрому *P*-450 клітин печінки мишей *Lrat*^{-/-} по-

казало зниження лише *n*-гідроксилазної активності (в 1,4 раза, $P = 0,02$) (рис. 1, А, в той час як між показниками *N*-деметилазної активності в цих тварин і групи контролю не виявлено статистично вірогідних відмінностей (рис. 2, Б). Відсутність відмінностей показників *N*-деметилазної активності між тваринами контрольної групи і нокаутними цілком закономірне, враховуючи переважання саме гідроксильюючих монооксигеназ серед ретиноїдзалежних цитохромів *P*-450 (родини CYP1A, CYP3A, CYP4A, CYP1B, CYP2C, CYP2S) [6, 7].

Таким чином, використання трансгенних мишей дозволило встановити взаємозв'язок рівня запасів ретиноїдів у печінці з величиною активності мікросомних монооксигеназ лише у разі *n*-гідроксилазної активності, значення якої хоча і виявлялися зниженими відносно контролю (в 1,5 раза), проте вірогідно ($P = 0,04$) переважали показники гідроксильювання в мікросомній фракції клітин печінки вітамін А-дефіцитних тварин (рис. 1, А).

Встановлена тенденція є цілком закономірною, враховуючи необхідність таких метаболічних форм ретиноїдів як повністю *транс*-ретиноева кислота і 9-*цис*-ретиноева кислота для підтримки експресії визначених ізоформ цитохрому *P*-450 [6, 7].

Мікросомні монооксигенази належать до ензимів так званої I фази системи детоксикації, які каталізують реакції із включенням одного атома кисню в ліпофільний субстрат [1]. У подальшому утворені метаболіти слугують суб-

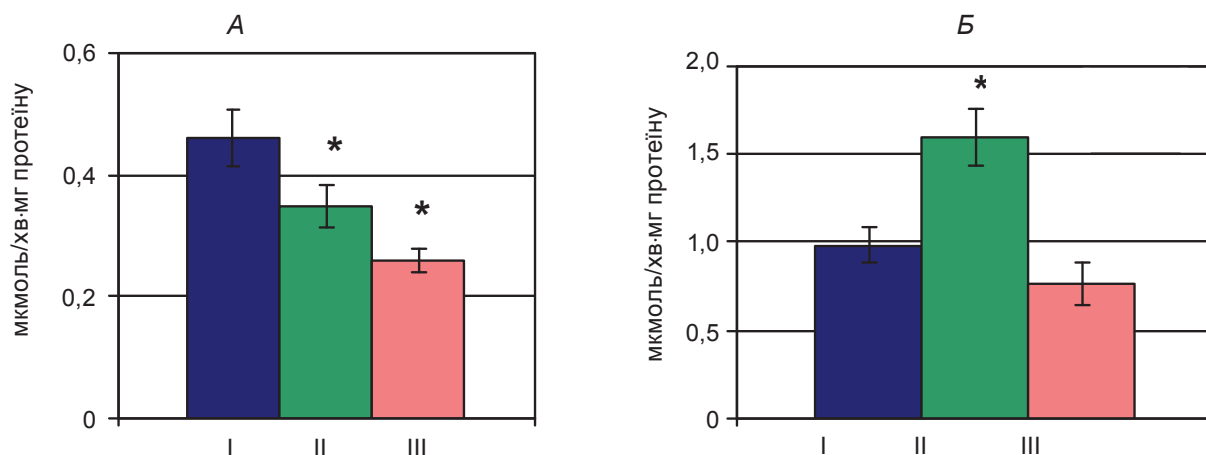


Рис. 2. Глутатіон-S-трансферазна активність у мікросомній (А) та постмікросомній (Б) фракціях клітин печінки мишей за відсутності в них вітаміну А ($M \pm m$, $n = 10$); I – контроль; II – вітамін А-дефіцитні тварини; III – миші, нокаутні за геном *Lrat*^{-/-}. *Статистично вірогідна різниця порівняно з показниками контролю, $P \leq 0,05$

стравами для ензимів II фази біотрансформації, зокрема глутатіон-S-трансфераз [2].

Мембранозв'язані глутатіон-S-трансферази безпосередньо отримують гідроксильований субстрат від мікросомних монооксигеназ. Показано, що в мікросомній фракції печінки нокаутних мишей та тварин, які перебували на вітамін А-дефіцитному раціоні, спостерігається зниження глутатіон-S-трансферазної активності (рис. 2, А). Водночас у постмікросомній фракції печінки вітамін А-дефіцитних тварин відбувається зростання глутатіон-S-трансферазної активності в 1,6 раза, в той час як у печінці мишей *Lrat*^{-/-} не виявлено вірогідних відмінностей відносно контрольних показників (рис. 2, Б) досліджуваної активності.

Результати вивчення рівня глутатіону в постмікросомній фракції печінки засвідчують зростання цього показника на 64% у групі вітамін А-дефіцитних тварин і відсутність статистичних відмінностей у групі мишей *Lrat*^{-/-} порівняно з показниками контролю (рис. 3).

Активация глутатіон-S-трансферази та підвищення рівня глутатіону, очевидно, є компенсаторним процесом, спрямованим на інактивацию реакційних метаболітів ендогенної природи, швидкість утворення яких в умовах нестачі ретиноїдів може збільшуватися [2, 21].

Однак використання моделі нокаутних мишей *Lrat*^{-/-} дозволяє оцінити дію неспецифічних реакцій, зумовлених аліментарною депривацією надходження вітаміну А, і вказує на те, що в постмікросомній фракції печінки активність глутатіон-S-трансферази та рівень

відновленого глутатіону не залежить від запасів вітаміну А.

Отже, в мікросомній фракції печінки вітамін А-дефіцитних мишей відбувається зниження *n*-гідроксилазної та N-деметилазної активності цитохрому P-450 з одночасним підвищенням активності глутатіон-S-трансферази в цитозолі; використання трансгенного підходу в моделюванні відсутності запасів ретиноїдів показали, що їх редукція

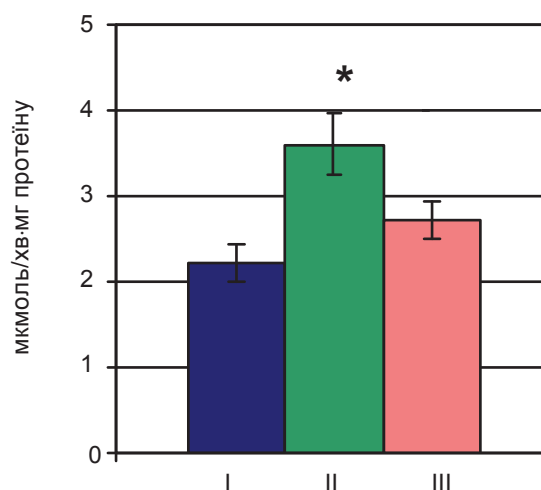


Рис. 3. Вміст відновленого глутатіону в постмікросомній фракції клітин печінки мишей за відсутності в них вітаміну А ($M \pm m$, $n = 10$); I – контроль; II – вітамін А-дефіцитні тварини; III – миші, нокаутні за геном *Lrat*^{-/-}. *Статистично вірогідна різниця порівняно з показниками контролю, $P \leq 0,05$

в клітинах печінки зумовлює зниження лише *p*-гідроксилазної та глутатіон-S-трансферазної активності в мікросомній фракції і не впливає на активність GST в постмікросомній фракції печінки мишей.

Автори висловлюють щире подяку професору Бленеру В.С. (Колумбійський університет, США) за люб'язно надані лінії трансгенних мишей для проведення досліджень.

**АКТИВНОСТЬ
ЭНЗИМАТИЧЕСКИХ СИСТЕМ
ДЕТОКСИКАЦИИ В ПЕЧЕНИ
МЫШЕЙ ПРИ РАЗЛИЧНОЙ
ОБЕСПЕЧЕННОСТИ РЕТИНОИДАМИ**

*М. М. Марченко, Г. П. Копыльчук,
И. А. Шмарак, И. М. Бучковская*

Черновицкий национальный университет
имени Юрия Федьковича, Украина;
e-mail: ivannabuchkovska@mail.ru

В работе исследовали активность компонентов системы детоксикации в печени в условиях отсутствия запасов витамина А. Показано, что в микросомной фракции печени витамин А-дефицитных животных наблюдается снижение *p*-гидроксилазной и N-деметилазной активности цитохрома P-450 с одновременным снижением глутатион-S-трансферазной активности. Наряду с этим, отсутствие запасов ретиноидов в печени нокаутных животных являлось определяющим только в случае *p*-гидроксилазной активности системы цитохрома P-450. Изменения энзиматической активности глутатион-S-трансферазы в группе витамин А-дефицитных мышей в микросомной и постмикросомной фракциях печени имеют неоднозначный характер. В постмикросомной фракции печени мышей, находящихся на витамин А-дефицитной диете, наблюдалось повышение глутатионтрансферазной активности, в то время как ее показатели в группе нокаутных животных достоверно не отличались от контрольных величин.

Ключевые слова: витамин А, ретиноиды, печень, клеточная система детоксикации.

**ACTIVITY OF ENZYMATIC
DETOXIFICATION SYSTEMS
IN THE MICE LIVER UNDER
CONDITIONS OF DIFFERENT
RETINOID PROVISION**

*M. M. Marchenko, G. P. Kopylchuk,
I. O. Shmarakov, I. M. Buchkovska*

Yuriy Fedkovych Chernivtsi National
University, Ukraine;
e-mail: ivannabuchkovska@mail.ru

S u m m a r y

The activity of cellular components of liver detoxification system was studied under the conditions of the absence of vitamin A stores. It is shown that a decrease of *p*-hydroxylase and N-demethylase activity of cytochrome P-450 simultaneously with a decrease of glutathione-S-transferase activity takes place in the liver microsomal fraction of vitamin A-deficient animals. At the same time the absence of retinoid stores in knock-out animals influences the decrease of only *p*-hydroxylase activity of cytochrome P-450 system. The increase in glutathione-S-transferase activity is observed in the liver postmicrosomal fraction in mice, kept on vitamin A-deficient diet, while its parameters in knock-out group animals were not statistically different compared to the control.

Key words: vitamin A, retinoids, liver, cellular detoxication system.

1. Warrington J., Von Moltke L., Harmatz J. et al. // Drug Metab. Dispos. – 2003. – 31, N 11. – P. 11306–11309.
2. Кулинский В. И., Колесниченко Л. С. // Биомед. химия. – 2009. – 55, № 3. – С. 255–277.
3. Leo M. A., Lieber C. S. // J. Clin. Nutr. – 1999. – 69. – P. 1071–1085.
4. Shirakami Y., Lee S., Clugston R., Blaner W. // Biochim. Biophys. Acta. – 2011. – 1811, N 11. – P. 505–517.
5. Wongsiriroj N., Piantedosi R., Palczewski K. et al. // J. Biol. Chem. – 2008. – 283, N 20. – P. 13510–13519.
6. Murray M., Sefton M., Croft D. // Brit. J. Pharmacol. – 2001. – 134. – P. 1487–1497.

7. Choudhary D., Jansson I., Stoilov M. et al. // Drug Metab. Dispos. – 2004. – **32**, N 8. – P. 840–847.
8. Dai G., Chou N., He L. et al. // Mol. Pharmacol. – 2005. – **68**, N 6. – P. 1590–1596.
9. Wu Y., Zhang X., Bardag-Gorce F., Robel R. et al. // Ibid. – 2004. – **65**. – P. 550–557.
10. Lutz J., Dixit V., Yeung C. et al. // Biochem. Pharmacol. – 2009. – **77**, N 2. – P. 258–268.
11. Chen H., Juchau M. // Biochem. J. – 1998. – **336**. – P. 223–226.
12. Reeves P., Nielsen F., Fahey G. // J. Nutr. – 1993. – **123**, N 11. – P. 1939–1951.
13. Марченко М. М., Шмараков І. О., Пасайлюк М. В. // Укр. біохім. журн. – 2009. – **81**, № 1. – С. 89–98.
14. Марченко М. М., Копильчук Г. П., Кеца О. В., Шмараков І. О. // Там само. – 2006. – **78**, № 6. – С. 66–72.
15. Marchenko M. M., Kopylchuk G. P., Ketsa O. V. // Biochemistry (Moscow) Sup. Ser B: Biomed. Chem. – 2009. – **3**, N 4. – P. 377–381.
16. Власова С. Н., Шабуніна Е. І., Переслєгіна І. А. // Лаб. дело. – 1990. – № 8. – С. 19–21.
17. Карпищенко А. І. Медицинские лабораторные технологии. Справочник в 2-х томах. – Санкт-Петербург: Интермедика, 2002. – 600 с.
18. Lowry O. H., Rosenbrough M. J., Farr A. L. et al. // J. Biol. Chem. – 1951. – **193**, N 1. – P. 265–275.
19. Пентюк А. А., Дурнев А. Д., Матвийчук Н. В. и др. // Вестн. РАМН. – 1995. – **1**. – С. 3–9.
20. O'Byrne S. M., Wongsirirot N., Libien J. et al. // J. Biol. Chem. – 2005. – **280**, N 42. – P. 35647–35657.
21. Raza H. // FEBS J. – 2011. – **278**. – P. 4243–4251.

Отримано 15.09.2011