



УДК 577.152.2:591.436

© 2012

М. М. Марченко, Г. П. Копильчук, І. О. Шмараков,
І. М. Бучковська

Глутатіон S-трансферазна активність клітин печінки мишей за умов відсутності запасів ретиноїдів

(Представлено членом-кореспондентом НАН України С. О. Костеріним)

Досліджено глутатіон S-трансферазну активність у клітинах печінки мишей за умов відсутності запасів ретиноїдів. Показано, що в мікросомній фракції печінки тварин при дефіциті вітаміну А, викликаному аліментарною депривацією надходження цього есенціального фактора, спостерігається зниження ензиматичної активності глутатіон S-трансферази. Аналогічна тенденція відзначається в мікросомній фракції нокаутних мишей. У постмікросомній фракції клітин печінки тварин, які перебували на вітамін А-дефіцитній дієті, відбувається підвищення глутатіон S-трансферазної активності та вмісту відновленого глутатіону. Водночас, при використанні трансгенного підходу у моделюванні відсутності запасів ретиноїдів, показники ензиматичної активності глутатіон S-трансферази та вмісту відновленого глутатіону в групі нокаутних тварин не виявляли достовірних відмінностей відносно контролю.

Глутатіон S-трансферази (GST, EC 2.5.1.18) — родина ензимів, які каталізують нуклеофільне приєднання непротеїнового тіолу глутатіону до електрофільних молекул ксенобіотиків [1, 2]. Утворення глутатіонових кон'югатів призводить до зниження токсичності чужорідних сполук і полегшує виведення їх з клітини за допомогою спеціальних АТР-залежних транспортних систем [2, 3].

Останнім часом [4, 5] широко обговорюються питання про здатність ретиноїдів змінювати експресію генів ключових ензимів другої фази детоксикації ксенобіотиків у печінці — GST, які беруть участь у зв'язуванні й транспорті гідрофобних молекул [1, 2], модуляції внутрішньоклітинної передачі сигналу шляхом взаємодії ензиму з кіназами й адапторними протеїнами сигнальних шляхів [6] та каталізі ізомеризації 13-цис-ретиноєвої кислоти в *транс*-ретиноєву [4, 5]; за допомогою відновленого глутатіону здійснюють регенерацію ліпопероксидів у мембранах без попереднього фосфоліпазного гідролізу, знижуючи наслідки оксидативного стресу й ендогенної інтоксикації [2, 3].

Мета даної роботи — дослідити рівень глутатіон S-трансферазної активності, вміст відновленого глутатіону в мікросомній і постмікросомній фракціях клітин печінки нокаутних

мишей ($Lrat^{-/-}$) та за умов класичної моделі аліментарної депривації з використанням напівсинтетичної дієти з різною насиченістю ретиноїдами.

Матеріали та методи дослідження. Дослідження проводили на мишах лінії C57 масою 25–30 г, віком 2,5–3,0 міс. 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), “Загальних етичних принципів експериментів на тваринах”, ухвалених Першим національним конгресом з біоетики (Київ, 2001).

Для створення стану відсутності запасів ретиноїдів в організмі при вивченні GST активності було використано два методичні підходи, які полягали в аліментарній депривації надходження вітаміну А та нокауті ключового ензиму, що призводить до відсутності запасів ретиноїдів у печінці.

У ході досліду тварини були поділені на три групи:

I — контрольна — тварини, які утримувалися на напівсинтетичному раціоні, збалансованому за всіма нутрієнтами (в тому числі 30 м. о. (міжнародна одиниця) вітаміну А у формі ретинілацетату).

II — А-дефіцитна (вітамін А) — тварини, які впродовж 6 тижнів до початку експерименту отримували напівсинтетичний раціон, збалансований за всіма нутрієнтами, але позбавлений вітаміну А [7]. Наявність маргінального авітамінозу за вітаміном А у тварин цієї групи визначали за морфологічними та біохімічними параметрами [8].

III — нокаут ($Lrat^{-/-}$) — тварини, які утримувалися на напівсинтетичному раціоні, збалансованому за всіма нутрієнтами (в тому числі 30 м. о. вітаміну А у формі ретинілацетату), які при збереженні нормальної секреції ретинолу до екстрагепатичних тканин нездатні синтезувати ретинілефіри в печінці внаслідок відсутності гена ензиму лецитин-ретинол-ацилтрансферази (LRAT, EC 2.3.1.135) і тому повністю позбавлені запасів ретиноїдів.

Експериментальні тварини знаходились по одній у пластмасових клітках із піщаною підстилкою, вода та їжа були доступні *ad libitum*. Нормування добового раціону розраховували з урахуванням принципу парного харчування. Евтаназію тварин здійснювали під легким ефірним наркозом.

Мікросомну фракцію клітин печінки отримували методом, описаним в публікації [9]. Ступінь забрудненості мікросомної фракції мембранами інших клітинних компартментів контролювали шляхом порівняльного визначення 5'-нуклеотидазної активності як специфічного маркера плазматичних мембран та сукцинатдегідрогеназної активності як маркера внутрішньої мембрани мітохондрій.

GST активність реєстрували під час ензиматичного утворення глутатіон S-2,4-динітробензолу в реакції відновленого глутатіону з 1-хлор-2,4-динітробензолом та виражали в мікромолях продукту за 1 хвилину на 1 міліграм протеїну [10].

Вміст відновленого глутатіону (GSH) визначали за перебігом реакції з 5,5'-дитіо-біс-2-нітробензойною кислотою та виражали в мікромолях на міліграм протеїну [11]. Концентрацію протеїну встановлювали методом Lowry (1951).

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

Результати та їх обговорення. Нами встановлено, що в мікросомній фракції клітин печінки мишей, яких утримували на раціоні, дефіцитному за вітаміном А, спостерігається зниження GST активності порівняно з показником контрольної групи тварин (рис. 1, а).

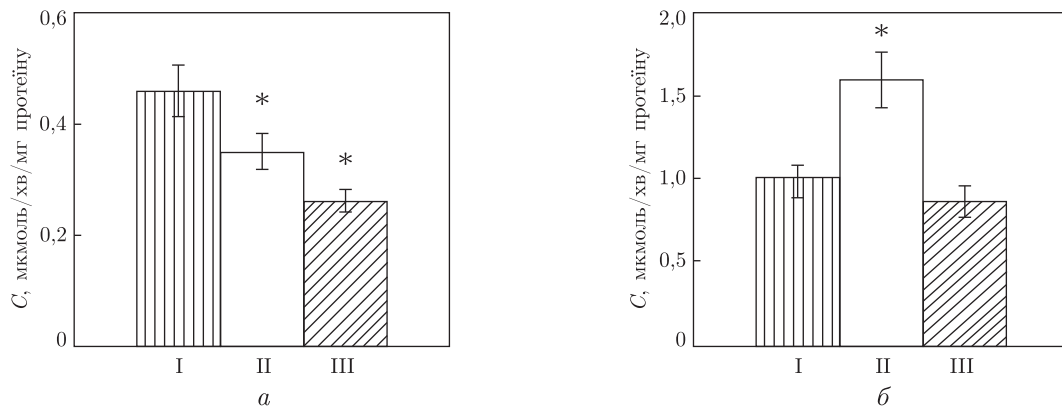


Рис. 1. Глутатіон-S-трансферазна активність у мікросомній (а) і постмікросомній (б) фракціях клітин печінки мишей за умов дефіциту вітаміну А ($M \pm m$, $n = 10$).

Тут і на рис. 2: I — контроль; II — вітамін А-дефіцитні тварини; III — миші, нокаутні за геном *Lrat*^{-/-}.

* — Статистично вірогідна різниця порівняно з показниками контролю, $p \leq 0,05$

При проведенні дослідів з використанням експериментальних дієт досить важко розмежувати прямий вплив відсутності ретиноїдів у печінці від неспецифічних наслідків їх аліментарної депривації. Наприклад, через відсутність вітаміну А у тканинах організму як антиоксиданта посилюються прооксидантні процеси.

З цим припущенням узгоджуються результати попередніх дослідів, в яких автори обґрунтовують зниження активності мікросомних монооксигеназ як наслідок пероксидного окиснення компонент ліпідного оточення цитохрому Р-450, переходом його в неактивну форму при окисненні білкових груп ензиму [12], а не з позицій механізмів впливу вітаміну А на досліджувані активності.

Цілком вірогідно, що зниження ензиматичної активності GST за умов А авітамінозу, відбувається за рахунок зниження активності компонентів I групи клітинної системи детоксикації печінки, оскільки мембранозв'язані GST безпосередньо отримують гідроксильований субстрат від монооксигеназ ендоплазматичного ретикулуму.

З метою нівелювання можливого впливу неспецифічних реакцій на досліджувані показники, в тому числі і прооксидантних, викликаних споживанням вітамін А-дефіцитного раціону в експериментальних тварин, нами були використані трансгенні миші, що нокаутні за геном *Lrat*. Білковий продукт цього гена є ензимом етерифікації ретинолу ацильними залишками, які походять з положення sn-1 фосфатидилхолінів. Вказані тварини при збереженні нормального фенотипу позбавлені здатності синтезувати ретинілефіри в печінці, і тому повністю позбавлені запасів ретиноїдів в даному органі. Показано, що у мікросомній фракції клітин печінки нокаутних мишей спостерігається аналогічна тенденція до зниження GST активності.

Наступним бар'єром, який перешкоджає взаємодії реакційноздатних метаболітів із найважливішими системами клітини, є цитозольні GST, які забезпечують найповнішу детоксикацію метаболітів [1, 2]. Крім того, узгоджена дія компонентів глутатіонової системи сприяє встановленню оптимального рівня пероксидних сполук і збереженню антиоксидантного гомеостазу.

Нами відзначено, що в постмікросомній фракції клітин печінки мишей (рис. 1, б), які знаходилися на А-дефіцитній дієті, спостерігається протилежна тенденція, дослідні значен-

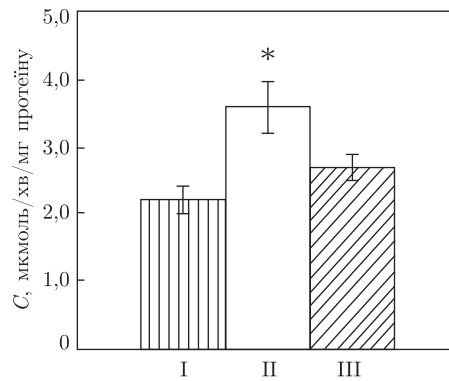


Рис. 2. Вміст відновленого глутатіону в постмітросомній фракції клітин печінки мишей за умов дефіциту вітаміну А

ня в 1,6 раза перевищують показники контрольної групи тварин. Підвищення ензиматичної активності GST може свідчити про активацію процесів знешкодження продуктів пероксидного окиснення ліпідів та є компенсаторним процесом, спрямованим на інактивацію реакційних метаболітів ендогенної природи [2, 13], швидкість утворення яких за умов нестачі ретиноїдів може збільшуватися.

Глутатіонтрансфераза, використовуючи GSH, який запобігає токсичній дії радикальних форм кисню та електрофільних метаболітів [2, 3], забезпечує значну частину реакцій кон'югації.

В організмі мишей, які перебували на вітамін А-дефіцитній дієті, спостерігається збільшення вмісту GSH в цитозольній фракції (рис. 2) клітин печінки, що в 1,3 раза перевищує показники контролю. З одного боку, збільшення його вмісту може бути наслідком зростання швидкості утворення глутатіону в γ -глутаміновому циклі, а з іншого — зниженням його утилізації. Підвищення вмісту GSH, ймовірно, зумовлене зниженням інтенсивності процесів, у яких GSH самостійно або як кофактор низки ензимів виступає відновником ліпопероксидів і перехоплювачем ОН-радикалів [1, 3].

У клітинах печінки нокаутних мишей показники вмісту GSH не виявляли достовірних відмінностей порівняно зі значеннями контролю. Імовірно, даний факт пояснюється тим, що рівень GSH у клітинах печінки підтримується як синтезом *de novo*, так і відновленням його окисненої форми в спряженій системі NADPH-глутатіонредуктази [2, 6], зниження вмісту якого інгібує цитохром P-450 і швидкість продукції метаболітів у першому типі, підтримуючи його на рівні другого типу біотрансформації [14].

Отже, за умов відсутності запасів ретиноїдів у мітросомній фракції клітин печінки нокаутних мишей спостерігається зниження GST активності, в той час коли показники вмісту відновленого глутатіону не виявляли достовірних відмінностей порівняно з контролем.

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

1. Кулинский В. И., Колесниченко Л. С. Система глутатиона: Синтез, транспорт, глутатионтрансферазы, глутатионпероксидазы // Биомед. химия. – 2009. – **55**, № 3. – С. 255–277.
2. Sherratt Ph., Hayes J. 9 Glutathione S-transferases // Enzymol. Syst. Metabol. Drugs and Other Xenobiot. – 2002. – P. 319–352.
3. Коржов В. И., Жадан В. Н., Коржов М. В. Роль системы глутатиона в процессах детоксикации и антиоксидантной защиты // Журн. АМН України. – 2007. – **13**, № 1. – С. 3–19.

4. Dai G., Chou N., He L. et al. Retinoid X Receptor α Regulates the Expression of Glutathione S-transferase Genes and Modulates Acetaminophen-Glutathione Conjugation in Mouse Liver // Mol. Pharmacol. – 2005. – **68**, No 6. – P. 1590–1596.
5. Wu Y., Zhang X., Bardag-Gorce F. et al. Retinoid X receptor α regulates glutathione homeostasis and xenobiotic detoxification processes in mouse liver // Ibid. – 2004. – **65**. – P. 550–557.
6. Yang Y., Noh K., Han C., Kim S. Transactivation of Genes Encoding for Phase II Enzymes and Phase III Transporters by Phytochemical Antioxidants // Molecules. – 2010. – **15**. – P. 6332–6348.
7. Reeves P., Nielsen F., Fahey G. AIN-93 Purified Diets for Laboratory Rodents: Final Report of the American Institute of Nutrition Ad Hoc Writing Committee on the Reformulation of the AIN – 76A Rodent Diet // J. Nutr. – 1993. – **123**, No 11. – P. 1939. – 1951.
8. Марченко М. М., Шмараков І. О., Пасайлюк М. В. Особливості фракційного складу глікопротеїнів сироватки крові щурів під час росту карциноми Герена за різного забезпечення організму вітаміном А // Укр. біохім. журн. – 2009. – **81**, № 1. – С. 89–98.
9. Марченко М. М., Копильчук Г. П., Кеца О. В., Шмараков І. О. Вплив ліпосомного протипухлинного препарату гідробромід 5-(5',6'-бензкумароїл-3') метиламіноурацилу на цитохром Р-450 у мікросомній фракції печінки щурів-пухлиноносіїв // Там само. – 2006. – **78**, № 6. – С. 66–72.
10. Власова С. Н., Шабуріна Е. И., Персlegина И. А. Активность глутатионзависимых ферментов эритроцитов при хронических заболеваниях печени у детей // Лаб. дело. – 1990. – № 8. – С. 19–22.
11. Медицинские лабораторные технологии. Справочник в 2-х томах / Под ред. А. И. Карпищенко. – Санкт-Петербург: Интермедика, 2002. – 600 с.
12. Пентюк А. А., Дурнев А. Д., Матвийчук Н. В. и др. Витамин А и ферментные системы метаболической активации генотоксических соединений // Вестн. РАМН. – 1995. – № 1. – С. 3–9.
13. Гайда Л. М., Дробинська О. В., Тимошенко М. О., Остапченко Л. І. Активність глутатионзалежних ферментів парієнтальних клітин та гепатоцитів за умов розвитку експериментального атрофічного гастриту // Фізика живого. – 2008. – **16**. – С. 144–148.
14. Park E., Cho I., Kim G. Transactivation of the PPAR-Responsive Enhancer Module in Chemopreventive Glutathione S-Transferase Gene by the Peroxisome Proliferator-Activated Receptor – α and Retinoid X Receptor Heterodimer // Cancer Res. – 2004. – **64**. – P. 3701–3713.

Чернівецький національний університет
ім. Юрія Федьковича

Надійшло до редакції 15.09.2011

М. М. Марченко, Г. П. Копильчук, И. А. Шмараков, И. М. Бучковская

Глутатион S-трансферазная активность в клетках печени мышей при отсутствии запасов ретиноидов

Исследовали глутатион S-трансферазную активность в клетках печени мышей в условиях отсутствия запасов ретиноидов. Показано, что в микросомальной фракции печени животных при дефиците витамина А, вызванном алиментарной депривацией поступления этого эссенциального фактора, наблюдается снижение энзиматической активности глутатион S-трансферазы. Аналогичная тенденция наблюдается в микросомальной фракции нокаутных мышей. В постмикросомальной фракции клеток печени животных, находящихся на витамин А-дефицитной диете, происходит повышение глутатион S-трансферазной активности и содержания восстановленного глутатиона. Одновременно, при использовании трансгенного подхода в моделировании отсутствия запасов ретиноидов, показатели энзиматической активности глутатион S-трансферазы и содержания восстановленного глутатиона в группе нокаутных животных достоверно не отличались от контрольных величин.

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

Glutathione S-transferase activity of liver cells under condition of the absence of retinoid stores

The paper deals with the glutathione S-transferase activity studied in mouse liver cells under conditions of retinoid stores deprivation. The decrease of glutathione S-transferase activity is shown in the liver microsomal fraction of animals nutritionally deprived with vitamin A and knockout animals as well. In the postmicrosomal fraction of liver cells of animals kept on vitamin A deficient diet, the increase of the glutathione S-transferase activity and the level of reduced glutathione is observed. At the same time, using a transgenic approach, no differences in the glutathione S-transferase activities and the levels of reduced glutathione as compared to those in the control group are shown.