

ОРДЕНА ЛЕНИНА И ОРДЕНА ДРУЖБЫ НАРОДОВ
АКАДЕМИЯ НАУК УКРАИНЫ
ОРДЕНА ТРУДОВОГО КРАСНОГО ЗНАМЕНИ ИНСТИТУТ БИОХИМИИ
им. А. В. ПАЛЛАДИНА

На правах рукописи

ЛЫЧИК Галина Зиновьевна

ИССЛЕДОВАНИЕ ВОЗДЕЙСТВИЯ РИБОФЛАВИНА НА
БИОТРАНСФОРМАЦИЮ КОСМОВОИТОКОВ В ЭКСПЕРИМЕНТЕ

03.00.04 - биохимия

14.00.26 - фармакология

А в т о р а ф е р а т
диссертации на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Киев - 1991

Работа выполнена в Винницком медицинском институте им. Н. И. Пирогова

Научные руководители: доктор медицинских наук,
доцент А. А. ПЕНТЮК

доктор медицинских наук,
профессор Н. Б. ЛУЦОК

Официальные оппоненты: доктор медицинских наук,
профессор Ю. В. ХМЕЛЕВОКИЙ

доктор медицинских наук,
профессор Ю. И. ГУБСКИЙ

Ведущее учреждение: Киевский государственный университет
им. Т. Г. Шевченко

Защита состоится " _____ " _____ 1991 г. в 14³⁰
на заседании специализированного совета К 016.07.01 в Институте
Биохимии им. А. В. Палладина АН Украины
Адрес: 252030, г. Киев, ул. Леонтовича, 9, конференц-зал

О диссертацией можно ознакомиться в библиотеке Института
Биохимии им. А. В. Палладина АН Украины

Автореферат разослан " _____ " _____ 1991 г.

Ученый секретарь
специализированного совета,
кандидат биологических наук

Вирсан

О. В. Кириенко

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность проблемы. Интенсивные научные исследования последних лет привели к накоплению обширного материала о биологической роли рибофлавина. Однако вопросы участия рибофлавина в регуляции внутриклеточного метаболизма окончательно не выяснены. Наиболее изученной оказалась коферментная функция этого витамина в составе флавинмононуклеотида (ФМН) и флавинадениндинуклеотида (ФАД), универсальных коферментов, переносящих водород от субстрата к цитохромам или непосредственно на кислород и являющихся промежуточным акцептором-донором водорода при окислении аминокислот, глюкозы, альдегидов, NADPH и NADH, гипоксантина и других веществ.

В последнее время внимание исследователей обращено на участие рибофлавина в метаболизме коенобиотиков. Наиболее известными ферментами метаболизма чужеродных веществ, коферментами которых являются производные рибофлавина, считаются следующие: альдегид- и ксантиноксидаза, оксидаза D-аминокислот, моноаминоксидазы, NADPH-цитохром P-450-редуктаза, NADH-цитохром b₅-редуктаза, флавинсодержащая монооксигеназа (Strittmatter 1966; 1968; Messer, 1973; Masters, Okita, Tsubo; Bray, 1981; Chandoga, Krizko, 1983; Williams, 1984; Kuwada и соавт., 1985; Watanabe и соавт., 1989; Hlavica и соавт., 1990 и др.). В тесной связи с активностью NADPH- и NADH-редуктаз находятся процессы микросомального деалкилирования и гидроксилирования коенобиотиков, осуществляемые цитохромом P-450.

Данные литературы о взаимосвязи между обеспеченностью организмов рибофлавином и активностью ферментов метаболизма коенобиотиков касаются в основном микросомальных ферментов, да и то лишь на фоне дефицита данного витамина (Shargel, Mazel, 1973; Patel, Pawar, 1973; Taniguchi, Nara, 1982). Мало изучено влияние недоо-

таточности рибофлавина на активность немикросомальных ферментов. Практически нет работ по влиянию дополнительного введения как рибофлавина, так и его коферментов на активность ферментов метаболизма ксенобиотиков. Не изучено влияние обеспеченности организма рибофлавином на биотрансформацию ксенобиотиков в целостном организме, а, между тем, биоконверсия чужеродных веществ может привести не только к уменьшению их биологической активности, но и к образованию реакционноспособных метаболитов, как это имеет место в отношении канцерогенов, мутагенов, аллергенов.

Проблема изучения взаимоотношения рибофлавина с ксенобиотиками актуальна еще и потому, что в настоящее время расширяется сфера использования витаминов и коферментов в терапии различных заболеваний. Препараты рибофлавина часто назначаются совместно с другими лекарственными средствами без учета возможной фармакологической интерференции, в результате которой могут ослабляться или, наоборот, усиливаться фармакологический эффект или токсичность лекарственных препаратов.

Еще одна причина актуальности изучения проблемы взаимодействия рибофлавина с ксенобиотиками - это широкое распространение недостаточности многих витаминов, в том числе и рибофлавина, среди населения и особенно среди больных людей (В.Б.Спиричев и соавт., 1987).

Интенсивная химизация современного производства и быта приводит к попаданию ксенобиотиков во внутреннюю среду организма, где они могут оказывать неблагоприятное воздействие, нарушая гомеостаз, способствуя появлению новых или усугублению уже существующих патологических состояний. Витамины, в том числе и рибофлавин, используются для уменьшения отрицательного действия ксенобиотиков (А.С.Скоропостижная и соавт., 1975; В.Л.Виссарионова и соавт.,

1978; А.И. Борзенко, 1983; *Bhide* и соавт., 1984; Р.И. Скворцова, Л.А. Харламова, 1988 и др.). Однако применение рибофлавина как антиоксидантного агента было скорее эмпирическим, а не основано на знании механизма взаимодействия рибофлавина с ксенобиотиками.

Для дальнейшего познания биологической роли рибофлавина, обоснованного его использования в клинической практике, для расширения и совершенствования научных основ его профилактического применения требуется выяснение механизмов его действия на активность ферментов метаболизма чужеродных веществ, биотрансформацию ксенобиотиков в целостном организме, их фармакологическую активность и токсичность.

Настоящее исследование осуществлялось в соответствии с Государственной НИР Винницкого медицинского института СН 15.02.0001.86; № госрегистрации - 01.86.0.033151 "Разработать способы целенаправленной коррекции витаминами и коферментами активности ферментов метаболизма ксенобиотиков, фармакологического и токсического эффектов лекарственных препаратов и химических соединений".

Цель работы заключалась в изучении воздействия рибофлавина при его недостаточности или дополнительном введении витамина и его коферментных форм на активность микросомальных и немикросомальных ферментов метаболизма ксенобиотиков, биотрансформацию, фармакологический эффект и токсичность некоторых ксенобиотиков.

Задачи исследования:

1. Изучить активность ферментов метаболизма ксенобиотиков при различной обеспеченности организма крысы рибофлавином (оптимум, дефицит, дополнительное введение рибофлавина и ФМН).
2. Исследовать эффект фенобарбитала на активность ферментов метаболизма чужеродных веществ при различной обеспеченности организма витамином В.

3. Изучать биотрансформацию модельных тест-препаратов, отражающих основные пути метаболизма ксенобиотиков (амидопирина, бензойной кислоты и ацетанилида) в условиях недостаточности рибофлавина, а также дополнительного введения рибофлавина и ФМН.

4. Выявлять особенности проявления токсичности и фармакологического эффекта ксенобиотиков, как утрачивающих в процессе биотрансформации биологическую активность (ортофен, парацетамол) так и образующих реакционноспособные метаболиты (циклофосфамид, нитроводиметиламин), в условиях различной обеспеченности организма рибофлавином.

Научная новизна работы. Проведено всестороннее изучение влияния рибофлавинового статуса на метаболизм ксенобиотиков, включенное исследование активности ферментов, биотрансформации тест-препаратов, фармакологического эффекта и токсичности ксенобиотиков, что послужило научно-теоретическим обоснованием положений о системном влиянии рибофлавина на указанные процессы.

Установлено, что дополнительно введенные рибофлавин и ФМН стимулируют гидроксилазную, деметилазную и редуктазную активности, а также интенсивность процессов перекисного окисления липидов.

Изучена биотрансформация тест-препаратов (бензойной кислоты, амидопирина и ацетанилида) при различной обеспеченности организма рибофлавином. Показано, что при недостаточности рибофлавина снижается, а в условиях дополнительного введения витамина В₂ увеличивается скорость биотрансформации амидопирина и ацетанилида за счет соответствующего уменьшения или активации цитохром Р-450-зависимых процессов гидроксилирования и деметилирования, а также реакций гидролиза и конъюгации с глюкуроновой кислотой, сульфатом и глутатионом. В то же время различный рибофлавиновый статус не оказывает влияния на биоконверсию бензойной кислоты.

Установлено, что рибофлавин равнонаправленно действует на ксенобиотики в зависимости от путей их биотрансформации. Дополнительно введенные рибофлавин и ФМН ослабляют, а на фоне дефицита рибофлавина усиливаются фармакологический эффект и токсичность тех ксенобиотиков, биотрансформация которых приводит к образованию биологически неактивных метаболитов (ортозон и парацетамол). Если же биоконверсия сопровождается образованием реакционноспособных метаболитов (циклофосамид и нитрозодиметиламин), насыщение организма рибофлавином и ФМН приводит к усилению токсичности и фармакологического эффекта этих веществ.

Научно-практическая ценность работы. Полученные данные теоретически и экспериментально обосновывают вывод о возможности совместного применения препаратов рибофлавина с лекарственными средствами для оптимизации лекарственной терапии, а также при лечении отравлений ксенобиотиками.

Так, может быть рекомендовано применение препаратов рибофлавина для коррекции побочных эффектов парацетамола и лечения отравлений этим лекарственным средством, так как выявлено, что рибофлавин существенно уменьшает метгемоглобинообразующее действие парацетамола и гибель животных, отравленных этим веществом. Фармакологическая активность парацетамола на фоне дополнительно введенного витамина B_2 снижается незначительно.

Препараты рибофлавина могут быть использованы при лечении отравлений ортозоном, а также для коррекции его побочного действия на слизистую желудочно-кишечного тракта.

Нецелесообразно сочетание препаратов рибофлавина с циклофосамидом, поскольку это приводит к существенному усилению токсичности цитостатика, несмотря на то, что при этом несколько повышается иммунодепрессивное действие препарата. Нежелательно применение рибо-

на с препаратами, способными к нитрозированию из-за усиления
количности нитросоединений.

Разработаны способы совместного определения амидопирина и
4-аминоантипирина в биологических жидкостях, основанные на перок-
сидазной реакции (положительные решения Госкомитета по изобре-
тениям и открытиям при ГКНТ от 15.05.90 г. - № 4760330/30-14
/138907/ и 4760331/30-14 /138908/), позволяющие повысить специфич-
ность определения амидопирина и его метаболитов.

Апробация работы. Результаты исследования были доложены на У
Украинском биохимическом съезде в г.Ивано-Франковске (1987), на
II Всесоюзном симпозиуме по экологической онкологии "Образование
канцерогенных N-нитросоединений в экосистемах" в г.Львове (1990),
на итоговых научно-практических конференциях Винницкого ордена
"Знак Почета" медицинского института им.Н.И.Пирогова по внедрению
НИР в практику (1985,1989,1990), на заседаниях Винницкого област-
ного отделения Украинского биохимического общества (1987,1990).

Публикации. По теме диссертация опубликовано 12 печатных ра-
бот в центральных и республиканских журналах и сборниках.

Объем и структура работы. Диссертация изложена на 158 страни-
цах машинописного текста, состоит из введения, обзора литературы,
четырех глав собственных исследований, обсуждения полученных ре-
зультатов, выводов и указателя литературы. Список литературы со-
держит 79 отечественных и 247 иностранных источников. Работа иллю-
стрирована 26 таблицами и 5 рисунками.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

Опыты проведены на крысах-самцах популяции Вистар. Длительность опыта животных содержали на полусинтетической грахмальной диете, сбалансированной по всем ингредиентам в соответствии с рекомендациями, изложенными в руководстве "Экспериментальная витаминология" под редакцией Ю.М. Островского (1979).

Для создания модели дефицита рибофлавина крысята-отъемыши массой тела 55 - 80 г содержались в течение 7 недель на арибофлавинной диете. В связи со снижением поедаемости корма при дефиците рибофлавина животные были разделены на 2 группы: контроль пияния *ad libitum* и парно питающиеся. За 7 дней до окончания опыта части животных перорально вводили раствор рибофлавина по 2 мг/кг массы животного, 1 раз в сутки (восстановительный период). В связи с тем, что показатели двух контрольных групп особо не отличались, в автореферате приведены только показатели контрольной группы *ad libitum*.

Для построения модели избытка витамина B₂ одной части контрольных животных вводили рибофлавин по 2 мг/кг, другой ФМН по 4 мг/кг массы (эквивалентное количество).

Обеспеченность организма крыс рибофлавином оценивали по динамике прироста массы тела, экскреции рибофлавина с мочой, степени активации глутатионредуктазы эритроцитов под влиянием ФАД - ФАД-эффект (Л.Г. Гвоздова, А.Н. Смирнова, 1984).

Части животных вводили фенобарбитал в дозе 70 мг/кг 1 раз в день внутривенно в течение 5 дней.

В опытах *in vitro* субклеточные фракции печени контрольных и рибофлавиндефицитных крыс инкубировали при 25°C 20 минут с различными концентрациями (5,75, 28,75 и 57,5 нмоль/мл) флавиновых ко-

тгов - ФМН и ФАД и использов. и для определения активности тгов.

Адьювантный артрит получали введением субплантарно 0,1 мл водного адьюванта "рейда. Порог болевой чувствительности и объем пораженной конечности измеряли, как описано Ф.П. Гринуэ (1975). Ортофен крысам вводили в течение 6 дней (1 раз в день по 4 мг/кг внутривнутрибрюшинно) Ульцерогенное действие ортофена изучали на модели адьювантного артрита, оценивая визуально состояние слизистой желудочно-кишечного тракта.

Гипертермию вызывали введением 25 мг/кг 2,4-динитрофенола внутримышечно в один прием. Жаропонижающее действие парацетамола оценивали после внутривнутрибрюшинного введения препарата в дозе 100 мг/кг, измеряя температуру в прямой кишке контактным термометром.

Иммунизацию крыс осуществляли 5% взвесью эритроцитов барана (0,1 мл на 100 г массы тела), введенной внутривнутрибрюшинно дважды с интервалом в один день. В сыворотке крови на 6-ой день после первой иммунизации определяли титры агглютининов и гемолизина. Циклофосфамид вводили 5 дней в дозе 40 мг/кг.

Определяли скорость N-деметилирования диметиланилина, p-гидроксилирования анилина, а также активность NADPH-цитохром P-450-редуктазы (КФ I.6.2.4) и NADH-цитохром b₅-редуктазы (КФ I.6.2.2) по методу И.И. Карузиной и А.И. Арчакова (1977) в микросомной фракции печени крыс.

Концентрация м-ионового диальдегида (продукты, реагирующие с тиобарбитуровой кислотой - ТБК) и увеличение его количества после стимуляции перекисного окисления липидов (ПОЛ) аскорбиновой кислотой (аскорбат-зависимое ПОЛ) или NADPH (NADPH-зависимое ПОЛ) определяли в микросомах по методу Ю.В. Владимирова и А.А. Арчакова (1972).

Концентрацию белка во всех фракциях определяли микробиуретовым

методом (Г.Д.Кочетов, 1980, фосфодиэстераза по методу Stewart (1980) в модификации А.А.Пентюка и соавт. (1987).

В гомогенате определяли активность оксидазы D-аминокислот (КФ I.4.3.3) по методу Д.В.Самнер, Г.Ф.Сомерс (1948), каталазы (КФ I.11.1.6) (А.Н.Вах, В.К.Зубкова, 1969) и гамма-глутамил-трансферазы (КФ 2.3.2.2) по методу Sericotti и соавт. (1972-1973).

В постмитохондриальной фракции печени определяли активность альдегидоксидазы (КФ I.2.3.1), альдегиддегидрогеназы (КФ I.2.1.3) и квантиноксидазы (Т.В.Холмина, В.Б.Горкина, 1979), активность алкогольдегидрогеназы (КФ I.1.1.1) (Г.А.Кочетов, 1980), активность ферментов гидролиза сложных эфиров: алилэстеразы (КФ 3.1.1.1) и арилэстеразы (КФ 3.1.1.2) в реакции Кестрина (А.А.Покровский, А.И.Арчаков, 1968), ариламидазы (карбоксилэстераза, КФ 3.1.1.1) (Neuman, Mentlin, 1981), активность ГЛН-гатион-S-трансферазы (КФ 2.5.1.18) (Nabig, Jacoby, 1981) и формальдегиддегидрогеназы (Goodman, Terply, 1971).

Исследовали биотрансформацию бензойной кислоты, амидопирин и ацетанилида при различной обеспеченности организма животных рибофлавином. В моче определяли содержание основных продуктов биопревращений соответствующих тест-препаратов: гиппуровую кислоту (Ogata и соавт., 1981), 4-аминоацетипирин (Т.А.Попова, С.В.Лесенко, 1977), общее количество анилидных и аминокето-альдегидных метаболитов. (И.М.Коренман, 1975; С.Сиги, Т.Ханна, 1983).

Для изучения концентрации ортофена в плазме крови крыс на фоне различной обеспеченности животных рибофлавином после внутрижелудочного введения препарата в дозе 30 мг/кг оценивали по реакции ортофена с феррицианидом калия и с пероксидом водорода (А.А.Пентюк и соавт., 1989). Неизмененную форму ортофена отделяли методом тонкослойной хроматографии.

Токсичность лекарственных препаратов оценивали по числу животных, выживших через 10 дней после введения им доз, близких к летальным. Крысам вводили внутривенно парацетамол (3 г/кг, 1 раз в сутки, 5 дней), ортофен (30 мг/кг, 1 раз, 5 дней), смесь видоламина и нитрата натрия (50 мг/кг, 1 раз в сутки, 5 дней), внутривенно однократно циклофосфамид (230 мг/кг). Токсичность коензиотиков определяли по методу Фишера.

Цифровые результаты проведенных биохимических исследований выражали в системе СИ и обрабатывали статистически с применением t -критерия Стьюдента.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

I. Активность ферментов метаболизма коензиотиков при различной обеспеченности организма крыс рибофлавином.

Дефицит рибофлавина проявлялся у животных потерей аппетита, отставанием в весе по сравнению с контрольными животными, воспалительными процессами слизистых оболочек, дерматитами. После 40-дневного нахождения на диете, лишенной рибофлавина, экскреция рибофлавина снизилась по сравнению с контрольными животными более чем в 10 раз. У животных с дефицитом рибофлавина отмечено заметное снижение активности глутатионредуктазы эритроцитов и значительное увеличение ФАД-эффекта ($41,8 \pm 6,08$ при $7,33 \pm 1,77\%$ активации глутатионредуктазы после добавления ФАД).

Результаты изучения активности микросомальных ферментов метаболизма коензиотиков и процессов перекисного окисления липидов в условиях недостаточности рибофлавина и дополнительного введения рибофлавина и ФАД представлены в таблице I. В условиях недостаточности рибофлавина наблюдается снижение активности практически всех определяемых нами ферментов в микросомальной фракции печени крыс, уменьшение содержания ТБК-реагирующих продуктов, падение

Таблица I

Активность микросомальных ферментов метаболизма ксенобиотиков и процессов перекисного окисления липидов при различной обеспеченности организма крив рыбодиамином ($M \pm m$, $n=6$)

Показатели	Контроль	Недостаточность	Дополнительно введенные	
	рибофлавина	рибофлавина	ФМН	
1. Гидроксилазная активность	$0,58 \pm 0,033$	$0,41 \pm 0,015^x$	$0,71 \pm 0,028^x$	$0,74 \pm 0,029^x$
2. Дегидрогеназная активность	$5,00 \pm 0,31$	$3,68 \pm 0,20^x$	$6,09 \pm 0,31^x$	$6,21 \pm 0,27^x$
3. NADH-редуктаза неогетерозоля	$46,6 \pm 1,9$	$34,8 \pm 1,44^x$	$53,2 \pm 1,7^x$	$56,2 \pm 2,6^x$
4. NADPH-редуктаза НГ	$10,8 \pm 0,65$	$8,44 \pm 0,38^x$	$12,3 \pm 0,56^x$	$13,6 \pm 0,96^x$
5. NADH-редуктаза дигидрофенол-яндофенола (ДХФ)	$75,5 \pm 3,9$	$47,7 \pm 2,0^x$	$95,6 \pm 3,0^x$	$94,3 \pm 4,7^x$
6. NADPH-редуктаза ДХФ	$48,0 \pm 2,4$	$35,4 \pm 2,6^x$	$59,5 \pm 2,8$	$66,1 \pm 3,8^x$
7. Преобразованный мальоновый диальдегид, нмоль/мг белка	$11,2 \pm 0,54$	$9,96 \pm 0,36^x$	$11,1 \pm 0,75$	$13,0 \pm 0,7$
8. Аскорбат-зависимое ПОД, нмоль/мг белка за 30 мин.	$21,7 \pm 1,10$	$17,8 \pm 0,65^x$	$24,3 \pm 0,93^x$	$27,8 \pm 1,51^x$
9. NADPH-зависимое ПОД, нмоль/мг белка за 30 мин.	$24,1 \pm 1,06$	$19,5 \pm 0,70^x$	$26,6 \pm 1,35^x$	$30,7 \pm 1,17^x$

Примечание: 1. Знаком "x" в этой и последующих таблицах обозначены достоверные различия по сравнению с контролем (1/0,05)
2. Активность ферментов (1-6) выражали в нмоль/мин. на 1 мг белка.

активности аскорбат- и надин-зависимого ПОД. В то же время при насыщении организма животных рибофлавином, и в большей степени ФМН, повышается активность ферментов микросомального окисления ксенобиотиков, активируются процессы ПОД и практически не изменяется лишь концентрация малонового диальдегида (ТБК-реагирующие продукты).

При алиментарной недостаточности рибофлавина изменяется и активность немикросомальных ферментов метаболизма ксенобиотиков (табл. 2), наблюдается снижение активности практически всех исследованных ферментов, за исключением гамма-глутамилтрансферазы. При этом наиболее зависимыми от рибофлавина оказались оксидаза D-аминокислот и глутатионредуктаза. Отмечено также значительное падение активности ферментов гидролиза сложных эфиров, особенно ариламидазы, тогда как активность формальдегиддегидрогеназы, а также альдегид- и алкогольдегидрогеназы снижалась в меньшей степени.

Дополнительное насыщение крыс рибофлавином и ФМН стимулировало активность ряда ферментов, таких как: оксидаза D-аминокислот, альдегидоксидаза и альдегиддегидрогеназа, глутатионредуктаза, али- и арилестеразы, ариламидаза, глутатион-S-трансфераза. При этом активность алкогольдегидрогеназы увеличивалась незначительно, а активность формальдегиддегидрогеназы и гамма-глутамилтрансферазы практически не изменилась.

Нами также была изучена индукция ферментов метаболизма ксенобиотиков, вызванная фенобарбиталом, в условиях различного рибофлавинового статуса. Полученные данные показали неоднозначный характер изменения этого показателя. Так, при дефиците рибофлавина усиливается индуцирующий эффект фенобарбитала по отношению к глутатионредуктазе, процессам ПОД, но снижается активность алиэстера-

Таблица 2

Активность немикросомальных ферментов метаболитами ксенобиотиков при раздельной обеспеченности организма крас. рабоблавином (Мг/ш; n =)

Активность ферментов, наслед/мгн. на 1 мг белка	Контроль	Недостаточность рабоблавины	Дополнительно введенные рабоблавины	СМН
Оксидоза D-аминокислот	1,03 ± 0,03	0,70 ± 0,045 ^x	1,19 ± 0,01 ^x	1,25 ± 0,02 ^x
Ксантиноксидаза	0,116 ± 0,006	0,086 ± 0,006 ^x	0,12 ± 0,005	0,128 ± 0,008
Альдегидоксидаза	0,65 ± 0,029	0,51 ± 0,026 ^x	0,77 ± 0,03 ^x	0,72 ± 0,069 ^x
Формальдегиддегидрогеназа	3,95 ± 0,25	3,48 ± 0,14 ^x	3,99 ± 0,23	3,92 ± 0,32
Альдегиддегидрогеназа	3,73 ± 0,18	3,04 ± 0,24 ^x	4,85 ± 0,22 ^x	5,37 ± 0,53 ^x
Алкогольдегидрогеназа	3,65 ± 0,14	2,57 ± 0,09 ^x	3,84 ± 0,19	3,94 ± 0,21
Аллостераза	373 ± 18	270 ± 17 ^x	469 ± 20 ^x	511 ± 26 ^x
Арилэстераза	1210 ± 55	1039 ± 39 ^x	1354 ± 40 ^x	1499 ± 95 ^x
Ариламидаза	197 ± 10	104 ± 9,5 ^x	220 ± 17	244 ± 16 ^x
Глутатионредуктаза	74,0 ± 2,6	47,0 ± 1,8 ^x	89,6 ± 3,9 ^x	91,6 ± 4,8 ^x
Глутатион-S-трансфераза (нитроимидерин)	20,6 ± 1,0	20,5 ± 0,66	24,5 ± 0,84 ^x	23,8 ± 1,4 ^x
Глутатион-S-трансфераза (ХДН)	268 ± 12,7	235 ± 11 ^x	342 ± 15,8	371 ± 14,4 ^x
Гамма-глутамилтрансфераза	1,33 ± 0,70	1,21 ± 0,065	1,34 ± 0,091	1,29 ± 0,015
Лактаза, мкмоль/мгн. на 1 мг белка	620 ± 29	405 ± 16 ^x	720 ± 25 ^x	735 ± 40 ^x

зи и альдегиддегидрогеназы и эффективность воздействия фенобарбитала на реакции гидроксилирования и деметилирования. Дополнительно введенные рибофлавин и ФМН ослабляют действие фенобарбитала на активность микросомальных ферментов метаболизма ксенобиотиков, но оказывают незначительный эффект на индукцию эстераз и глутатион-S-трансферазы. Однако, несмотря на то, что процент повышения активности гидроксилазы, деметилазы и редуктаз под влиянием фенобарбитала у животных, дополнительно обеспеченных витамином В₂, был в целом ниже, чем у контрольных животных, абсолютная величина их ферментативной активности была максимально высокой из-за суммирования эффектов фенобарбитала и рибофлавина или ФМН. Аналогичный вывод можно сделать и в отношении эстераз. Такие ферменты как оксидаза D-аминокислот, алкоголь-, альдегид- и формальдегиддегидрогеназа, ксантинооксидаза, глутатионредуктаза и каталаза оказались в условиях данного эксперимента неиндуцируемыми.

Введение фенобарбитала сопровождалось нарушением обмена рибофлавина, с чем свидетельствуют данные о возрастании заличины ФАД-эффекта как у дефицитных по рибофлавину животных; так и у крыс с длительно введенным витамином В₂.

2. Исследование возможных механизмов изменения активности ферментов метаболизма чужеродных веществ при различной обеспеченности организма крыс рибофлавином

Изученные нами данные свидетельствуют о зависимости активности ферментов метаболизма ксенобиотиков от уровня обеспеченности организма витамином В₂. Каков же предположительный механизм действия рибофлавина на активность ферментов?

Ответ на этот вопрос более очевиден в отношении флавиновых ферментов таких как: оксидаза D-аминокислот, ксантин- и альдегид-оксидаза, NADPH - , NADH - и глутатионредуктаза. По-видимому, дефицит

рибофлавина приводит к снижению концентрации коферментных форм в составе активных центров этих ферментов. В пользу этого предположения свидетельствуют данные опытов *in vitro*. Добавление коферментов ФМН и ФАД к субцелочным фракциям печени дефицитных по рибофлавину животных приводило к более значительной стимуляции активности исследуемых ферментов (оксидазы D-аминокислот, альдегидоксидазы и редуктаз) по сравнению с животными, получавшими с кормом оптимальное количество рибофлавина. Дополнительным подтверждением высказанного выше предположения служат и полученные в восстановительном периоде данные о нормализации активности всех ферментов нарушенной при содержании животных на рибофлавиновом рационе. Доказательства такого рода механизма действия витамина B₂ имеются и в литературе. Так, Нага, Taniguchi (1982; 1985) выделили из печени дефицитных по рибофлавину крыс аномальную NADPH-редуктазу, в составе которой было меньше ФАД, больше ФМН по сравнению с контрольными животными и даже обнаруживался свободный рибофлавин. Добавление рибофлавина как в опытах *in vitro*, так и *in vivo* нормализовало активность данного фермента, что также свидетельствует о недостаточном насыщении кофактором флавиновых ферментов у рибофлаavin-дефицитных животных.

Хотя деметилазная и гидроксилазная активности митохондриями непосредственно не осуществляются флавиновыми ферментами и являются функцией цитохром P-450-зависимого монооксигеназного комплекса, их тесная связь с рибофлавиновым статусом организма вполне объяснима, поскольку флавинозависимые редуктазы (NADPH- и NADH-) обеспечивают восстановительным эквивалентом P-450-зависимые монооксигеназы (А.И.Арчаков, 1975). Известно, что цитохром P-450-зависимые монооксигеназы являются липидсвязанными ферментами. Поскольку дефицит рибофлавина приводит к изменению липидного обмена (нарушение мито-

хондриального окисления жирных кислот, изменение жирнокислотного состава фосфатидилхолина микросом и митохондрий), то следствием этих изменений может быть и нарушение процессов гидроксигирования и деметилирования.

Дополнительное введение рибофлавина и ФМН сопровождается повышением активности микросомальных монооксигеназ и редуктаз. Механизмы этой активации, по-видимому, следующие: 1) быстрое насыщение фермента кофактором в процессе биосинтеза из-за повышенной доступности флавиновых коферментов; 2) флавиновые коферменты, обладая высоким ред-окс потенциалом, сами могут выполнять роль дополнительного переносчика электронов и тем самым активировать монооксигеназные и редуктазные реакции; 3) флавины неферментативным путем участвуют в реакциях одноэлектронного переноса (Hoge и соавт., 1982), быстро реагируют с молекулярным кислородом с образованием гидроперекисей (Д.Мецлер, 1980), обладающих гидроксилирующими свойствами. Косвенным свидетельством такого пути реализации активирующего действия флавинов являются и данные об активации ПОД при насыщении организма витамином В₂, поскольку процессы ПОД тесно связаны с микросомальными электронотранспортными цепями.

3. Биотрансформация некоторых ксенобиотиков в организме крысы при различных уровнях обеспеченности рибофлавином

Полученные нами данные об изменении активности ферментов метаболизма ксенобиотиков в зависимости от рибофлавинового статуса послужили предпосылкой для определения направления следующего этапа работы - изучения биотрансформации тест-препаратов. В качестве исследуемых препаратов использованы бензойная кислота, амидопирин и ацетанилид.

Лишь биотрансформация бензойной кислоты оказалась независимой от рибофлавина, поскольку в биоконверсии этого соединения участву-

ят только ферменты конъюгации, осуществляющие присоединение глицина и глюкуроновои кислоты к бензоату (Thabrew и соавт., 1982).

Амидопирин при биотрансформации вначале деметируется с участием цитохрома Р-450, а затем образовавшийся 4-аминоантипирин (4-ААП) ацетируется, образуя *N*-ацетиламиноантипирин (Volz, Kallner, 1980).

При дефиците рибофлавина угнетается, а при дополнительном введении рибофлавина и ФМН интенсифицируется биотрансформация амидопиринa за счет изменения скорости его деметилирования, что согласуется с полученными нами ранее изменениями деметилирующей способности микросом на фоне различной обеспеченности организма крие рибофлавином. В то же время реакция ацетилирования 4-ААП от рибофлавинового статуса существенно не зависела.

Ацетанилид подвергается в организме многочисленными ферментативными превращениями: С- и N-гидроксилированию, гидролизу, конъюгированию с глюкуронатом, сульфатом и глутатионом (табл. 1 и 2).

Дефицит рибофлавина сопровождается снижением, а дополнительное насыщение организма витамином В₂ - повышением скорости биотрансформации ацетанилида в основном за счет реакции образования амидо-ферольных метаболитов (табл. 3). Ранее нами были получены данные о зависимости реакции гидроксилирования от рибофлавинового статуса.

Дефицит рибофлавина приводит к снижению, а дополнительное введение рибофлавина и ФМН - к стимулированию скорости гидролиза ацетанилида по амидной связи, что сопровождается изменением соотношения свободных и связанных амидидных производных. Эти данные совместно со сведениями об изменении активности эстераз у млекопитающих с различной обеспеченностью организма витамином В₂ свидетельствуют о тесной связи этих ферментов с рибофлавиновым статусом.

N-окисление ацетанилида приводит к образованию реакционноспособ-

Таблица 3

Суточная экскреция метаболитов ацетанилида после его внутримышечного введения в дозе 74 мг/кг/100 г массы тела при различной обеспеченности рибофлавина (м ± ш, n = 6)

Метаболиты	ГРУППЫ ЖИВОТНЫХ				
	Контроль	Действие риб-	Контроль	Дополнительно введенные	
в мг/кг/100 г массы	обеспечения	обеспечения	рибофлавина	ОМН	
Метаболиты:	60,8±1,0	53,3±1,14 ^x	55,3±2,50	62,5±0,70 ^x	66,2±2,30 ^x
аминобензойные;	45,3±1,3	37,7±0,8 ^x	41,2±2,10	54,0±1,66 ^x	51,0±2,10 ^x
англицины	15,0±0,8	15,6±0,6	14,1±1,06	15,6±1,20	15,2±0,99
Свободные ангидриды	8,92±0,48	6,33±0,40 ^x	7,64±0,35	8,04±0,25	11,9±1,27 ^x
Свободные ангидриды к общим ангидридам	59,5±3,8	40,3±1,9 ^x	54,2±4,8	51,4±4,4	78,3±6,5 ^x
Свободный p-аминобензол	0,50±0,057	0,28±0,025 ^x	0,55±0,041	0,53±0,066	0,62±0,038
Свободный парацетамол	2,19±0,12	1,80±0,050 ^x	2,47±0,13	3,16±0,060 ^x	3,38±0,082 ^x
Свободный парацетамол, % ко всем аминобензолам	94,1±0,38	94,2±0,36	92,1±0,33	93,1±0,34	92,1±0,28
Свободный сульфат	12,9±1,17	10,8±0,48	14,2±1,08	21,0±1,73 ^x	17,0±0,97 ^x
Связанный сульфат	17,0±0,76	12,0±0,45 ^x	13,5±0,50	19,0±0,90 ^x	18,1±0,57 ^x
Свободная глюкоуроновая кислота	80,0±4,5	73,4±3,4 ^x	71,9±3,00	112,3±4,00 ^x	112,2±3,10 ^x
Связанные глюкоурониды	32,8±1,37	23,6±0,61 ^x	25,1±1,13	37,0±0,86 ^x	33,9±1,31 ^x
Меркаптуроновые кислоты	1,94±0,05	1,38±0,05 ^x	1,90±0,078	2,43±0,095 ^x	2,37±0,080 ^x

собных метаболитов: N-гидроксиацетиламинофенол и N-ацетилбензохинонинин, обладающих оксидативным и арилирующим действием и обезвреживающихся с участием глутатиона. Дегградация глутатионовых конъюгатов приводит к образованию меркаптуровых кислот, концентрация которых на фоне дефицита рибофлавина уменьшается и повышается при дополнительном введении витамина B₂, что свидетельствует о зависимости метаболических путей биотрансформации ацетанилида, приводящих к образованию реакционноспособных метаболитов, от рибофлавинового статуса (наряду с путями, ведущими к образованию неактивных дериватов).

4. Фармакологический эффект и токсичность некоторых ксенобиотиков, в зависимости от рибофлавинового статуса организма

Анализ полученных данных о влиянии рибофлавинового статуса на реакции биотрансформации ксенобиотиков дал основания для решения вопроса о том, распространяется ли действие этого витамина и на такие сложные биологические реакции как фармакологический эффект и токсичность, в реализацию которых вовлекаются многие функциональные системы. С этой целью предприняты следующие исследования: изучить зависимость от рибофлавинового статуса фармакологического эффекта и токсичности ксенобиотиков, к которым относятся при биотрансформации биологическую активность (ортофен, парацетамол), так и образующих реакционноспособные метаболиты (циклофосфамид и нитрозодиметиламин)

Дефицит рибофлавина сопровождается усилением, а дополнительное введение витамина B₂ - ослаблением как противовоспалительного и анальгетического действия ортофена, так и его язворагенного эффекта и токсичности. Полученные результаты дали возможность предположить, что дополнительное насыщение организма рибофлавином способствует быстрейшему выведению препарата, тогда как дефицит рибофлавина, напротив, его более длительному нахождению в плазме крови, что и было подтверждено изучением фармакокинетики ортофена.

Метаболизм парацетамола, как правило, приводит к образованию нетоксических метаболитов и только 8% его вследствие N-окисления превращается в обладающие электрофильными свойствами производные. Дополнительно введенные рибофлавин и ФМН оказывают защитное действие, повышая выживаемость животных после введения им токсической дозы парацетамола. Одним из ранних проявлений токсичности парацетамола является накопление в крови метгемоглобина, концентрация которого в группах животных, насыщенных витамином В₂, была более низкой по сравнению с контролем. Однако снижение токсичности парацетамола сопряжено с некоторым уменьшением его фармакологического (антипиретического) действия. Эти данные позволяют сделать вывод о том, что снижение как токсичности, так и фармакологического эффекта парацетамола обусловлено усилением его метаболизма под влиянием рибофлавина и ФМН.

Циклофосфамид в организме практически полностью трансформируется в реакционноспособные метаболиты. Дополнительное введение рибофлавина и ФМН приводит к усилению токсичности препарата. После введения токсической дозы циклофосфамида средняя продолжительность жизни животных в группе с дополнительно введенным ФМН в 2 раза меньше, чем в контроле. В то же время усиление токсичности циклофосфамида на фоне дополнительного введения витамина В₂ до некоторой степени компенсируется повышением его иммунодепрессивного эффекта. Можно полагать, что насыщение организма витамином В₂ приводит к активации цитохром Р-450-зависимых монооксигеназ и, как следствие этого, к усилению биотрансформации циклофосфамида с образованием токсических метаболитов.

Нитродиметламин обладает значительным гепато- и генотоксическим действием, обусловленным его превращением в электрофильные метаболиты при участии системы цитохрома Р-450 и других фермент

ных систем (Pegg, 1980). Дополнительно введенные рибофлавин и ФМН уменьшают выживаемость животных после введения им предшественников нитроводиметиламина (амидопирин и нитрит натрия), очевидно, из-за активации цитохром Р-450-зависимых процессов, что сопровождается образованием реакционноспособных метаболитов.

Таким образом, полученные нами данные показали существенную роль и высокую биологическую эффективность рибофлавина в метаболизме ксенобиотиков.

Нами установлено, что при дефиците рибофлавина снижается, а при дополнительном введении рибофлавина и ФМН активируется целый ряд ферментов метаболизма ксенобиотиков. Данные, полученные на субклеточном уровне, оказались оправданными и в отношении биотрансформации ксенобиотиков в целостном организме, а также в проявлении токсичности и фармакологического эффекта ксенобиотиков. Установлено, что на фоне дефицита рибофлавина усиливаются фармакологический эффект и токсичность тех ксенобиотиков, биотрансформация которых приводит к образованию биологически мало активных метаболитов. В то же время при дополнительном введении витамина В₂ эти реакции ослабляются. Если же биотрансформация приводит к образованию реакционноспособных метаболитов, то на фоне дополнительного введения рибофлавина и ФМН токсичность и фармакологический эффект таких соединений усиливаются.

Следовательно, полученные нами результаты расширяют современные научно-теоретические представления о механизме биологического действия и роли витамина В₂ во внутриклеточной регуляции, а, в частности, в проявлении фармакологического эффекта и биотрансформации биологически активных низкомолекулярных экзогенных факторов (ксенобиотиков), а с другой стороны, позволяют обосновать возможность и необходимость практического применения препаратов рибофла-

количество практического применения препаратов рибофлавина в клинической практике.

ВЫВОДЫ

1. На фоне алиментарной недостаточности рибофлавина снижаются, а в условиях дополнительного введения рибофлавина и ФМН животным, находящимся на рационе с оптимальным количеством витамина B_2 , стимулируется активность ферментов микросомальной фракции печени (гидроксилазная, деметилазная и редуказная), а также процессов перекисного окисления липидов.

2. Установлено снижение в условиях рибофлавиновой недостаточности активности ряда немикросомальных ферментов метаболизма ксенобиотиков таких как: оксидаза D-аминокислот, альдегид- и ксантиноксидаза, али- и арилэстераза, ариламидаза, альдегид-, формальдегид- и алкогольдегидрогеназа, каталаза, глутатионредуктаза и глутатион-S-трансфераза и, напротив, повышение активности большинства из этих ферментов при дополнительном введении рибофлавина и ФМН.

3. Обнаружена модификация эффекта фенбарбитала на активность ферментов метаболизма ксенобиотиков при различной обеспеченности организма рибофлавином. При дефиците рибофлавина усиливается индуцирующий эффект фенбарбитала на активность NADH-редуктазы, альдегид- и ксантиноксидазы, оксидазы D-аминокислот, гамма-глутамилтрансферазы и уровень процессов перекисного окисления липидов, снижается степень индукции гидроксилазной и деметилазной активности. При дополнительном введении рибофлавина и ФМН снижается процесс индукции всех исследованных редуказ, гидроксилазной и деметилазной активности, а также активности альдегидоксидазы, али- и арилэстеразы, гамма-глутамилтрансферазы, но активируются процессы перекисного окисления липидов.

4. Показано, что при дефиците рибофлавина замедляется ско -

рость биотрансформации амидопирина и ацетанилида, что коррелируется со снижением активности реакций гидроксилирования, метилирования, гидролиза и конъюгации, тогда как дополнительное введение рибофлавина и ФМН приводит к усилению биотрансформации этих тест-препаратов. В то же время различная обеспеченность организма рибофлавином не отражается на биотрансформации бензойной кислоты, так как данный витамин на процесс ее конъюгации с глицином и ацетил-КоА не влияет.

5. При дополнительном введении рибофлавина и ФМН ослабевают, а при дефиците усиливаются фармакологический эффект и токсичность тех коенобиотиков, биотрансформация которых приводит к образованию биологически неактивных метаболитов (ортофен, парацетамол).

6. На фоне дополнительного обеспечения организма рибофлавином и ФМН усиливаются токсичность и фармакологическая активность тех коенобиотиков (циклофосамид и нитроэдиметилламин), биоконверсия которых сопровождается образованием биологически активных реакционноспособных метаболитов.

Список работ, опубликованных по теме диссертации

1. Г.З.Лычик. Экскреция гиппуровой кислоты и 4-аминоантипирина у крыс на фоне различной обеспеченности организма витамином В₂// Итог. науч. конф. ин-та по законченным НИР. - Винница, 1985, 26 апр. - С.12.

2. Г.З.Лычик, Н.Б.Луцок, А.А.Пентюк. Влияние рибофлавина и флавинонуклеотида на биотрансформацию чужеродных веществ у животных// Рац.питание:Ресл.межвед.сб.-Киев.-1986.-вып.21.-С.84-86.

3. А.А.Пентюк, В.И.Гуцол, О.А.Яковлева, Н.Б.Луцок, А.К.Откаленко, А.П.Лычко, Г.З.Лычик и др. Определение фосфолипидов в биологическом материале по образованию гидрофобного комплекса с ферроцианиоаном аммония// Лаб.дело.- 1987.- №6.-С.457-460.

4. Г.З.Лычик, А.А.Пентюк, Н.Б.Луцок. Влияние различной обеспеченности организма крыс витамином В₂ на активность ферментов, участвующих

щих в метаболизме чужеродных веществ // Укр. биохим. журнал. - 1987. - Т. 59, № 6. - С. 55-60.

5. Н.А. Станиславчук, А.А. Пентюк, Г.З. Лычик и др. Влияние индукторов и ингибиторов ферментов метаболизма ксенобиотиков, коферментных форм витаминов В₁ и В₂ на противовоспалительный эффект вольтарена // Фармак. и токсик. - 1988. - № 2. - С. 69-71.

6. М.Б. Луцк, О.О. Пентюк, В.И. Гуцол, О.О. Яковлева, А.П. Личко, Г.З. Лычик. Вітаміни й коферменти як модулятори активності ферментів метаболізму ксенобіотиків // Укр. біох. з'їзд: тез. доп. - Ів. - Франківськ, 1987. - ч. I. - С. 97-98.

7. О.О. Пентюк, А.П. Личко, Г.З. Лычик, А.А. Станиславчук. Влияние ризної забезпеченості організму щурів вітамінами В₁, В₂ та В₆ на біотрансформацію деяких ксенобіотиків // Там же. - Ч. II. - С. 145-146.

8. А.П. Личко, Г.З. Лычик. Метаболизм ксенобиотиков у експериментальних живих тварин в умовах різної забезпеченості організму тиамином и рибофлавином // Рац. питание. - Киев, 1988. - С. 85-87.

9. О.А. Яковлева, А.А. Пентюк, Г.З. Лычик, В.М. Истошин. Витамини А и В₂ как модуляторы активности ферментов метаболизма ксенобиотиков // Укр. науч. конф.: тез. докл. - Винница, апрель 1989. - С. 86-87.

10. А.А. Пентюк, Б.А. Борисенко, Г.З. Лычик. Влияние витаминов и коферментов на токсичность и иммунодепрессивное действие циклофосфамида // Укр. науч. конф.: тез. докл. - Винница, 1990. - С. 58.

11. А.А. Пентюк, Г.З. Лычик, В.М. Истошин, Е.И. Штгетко. Влияние витаминов и коферментов на токсичность нитрозодиметиламин для крыс // II Всесоюз. симпозиум по экологич. онкол. "Образование канцерогенных и нитрозосоединений в экосистемах". : тез. докл. - Киев, 1990. - С. 48-49.

12. А.А. Пентюк, М.Б. Луцк, В.И. Гуцол, Г.З. Лычик, Р. Хадур и др. Ацетанилид как модельный препарат для изучения процессов метаболизма чужеродных веществ // Вспр. мед. химии. - Днепро. в. ВИНТИ 07.06.1990, № 3165-1390 - II с.