

С.О. Качула<sup>1</sup>, С.А. Бондар<sup>1</sup>, О.О. Качула<sup>2</sup>  
 ВІННИЦЬКИЙ НАЦІОНАЛЬНИЙ МЕДИЧНИЙ УНІВЕРСИТЕТ ІМЕНІ М.І. ПИРОГОВА<sup>1</sup>  
 ВІЙСЬКОВО-МЕДИЧНИЙ КЛІНІЧНИЙ ЦЕНТР ЦЕНТРАЛЬНОГО РЕГОНУ<sup>2</sup>, ВІННИЦЯ

## ВПЛИВ ГІПЕРКЕТОНЕМІЇ НА АКТИВНІСТЬ ФЕРМЕНТІВ КОН'ЮГАЦІЇ КСЕНОБІОТИКІВ ТА ГЕПАТОТОКСИЧНІСТЬ БРОМБЕНЗОЛУ

*Вивчено вплив гіперкетонемії на активність деяких ферментів кон'югації ксенобіотиків та гепатотоксичність бромбензолу. Гіперкетонемія, яка виникає після введення ацетону або голодування, знижує активність УДФ-глюкуронілтрансферази, фенолсульфотрансферази та глутатіон-S-трансферази в печінці щурів. Фенобарбітал підвищує активність зазначених ферментів. Ацетон, голодування та фенобарбітал збільшують гепатотоксичність бромбензолу.*

**КЛЮЧОВІ СЛОВА:** гіперкетонемія, ксенобіотики, кон'югація, біотрансформація, ацетон, фенобарбітал, УДФ-глюкуронілтрансфераза, фенолсульфотрансфераза, глутатіон-S-трансфераза, бромбензол.

**ВСТУП.** Синдром гіперкетонемії є одним з поширених порушень обміну речовин, що негативно впливає на організм, може спричинити пригнічення процесів кон'югації в печінці, зокрема з глутатіоном [6, 9]. Гіперкетонемія виникає при голодуванні, цукровому діабеті, підвищеному вмісті жирів у дієті та інших станах [8]. Дані літератури свідчать про можливість порушення процесів кон'югації з глюкуроною кислотою та сульфатом у тварин, що голодують. Зокрема, було показано, що 48-годинне голодування мишей знижує кон'югацію пара-нітрофенолу ізольованими гепатоцитами майже на 80 % [5]. Можна припустити, що за умов гіперкетонемії змінюється токсичність лікарських речовин, однак загалом це питання вивчено недостатньо.

Метою дослідження було вивчення впливу гіперкетонемії на ферменти кон'югації ксенобіотиків та гепатотоксичну дію речовини, метаболіти якої підлягають процесам кон'югації. На ізольованих гепатоцитах щурів порівнювали вплив гіперкетонемії, індукованої введенням ацетону або голодуванням, на вираження гепатотоксичної дії бромбензолу, з ефектом класичного індуктора – фенобарбіталу.

**МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ.** Досліди проведені на 56 білих нелінійних щурах-самцях масою 145–205 г. Ацетон вводили в шлунок тварин у дозі 1000 мг/кг 1 раз на добу протягом 3-х днів. Для введення використовували 32 %

© С.О. Качула, С.А. Бондар, О.О. Качула, 2011.

розчин (за об'ємом) ацетону, приготовлений на 0,9 % розчині натрію хлориду, і цей розчин вводили в об'ємі 2 мл/кг. Модель голодування відтворювали шляхом позбавлення тварин їжі протягом 2-х діб, зберігаючи вільний доступ до води. Фенобарбітал вводили внутрішньочеревно в дозі 70 мг/кг 1 раз на день протягом 5 діб. Тварин брали в дослід через 2 доби після останнього введення фенобарбіталу та ацетону. Досліди виконували згідно з правилами гуманного ставлення до експериментальних тварин, затвердженими комітетом з біоетики Вінницького національного медичного університету імені М.І. Пирогова.

У печінці визначали активність УДФ-глюкуронілтрансферази (УДФ-ГТ, КФ 2.4.1.17), фенолсульфотрансферази (ФСТ, КФ 2.8.2.1) та глутатіон-S-трансферази (субстрат етакринова кислота) (ГТФ, КФ 2.5.1.18), як описано раніше [2]. Гепатоцити одержували колагеназним методом Сеглена [4]. Життєздатність клітин оцінювали за їх профарбовуванням трипановим синім, виходом лактатдегідрогенази в позаклітинну рідину при інкубації гепатоцитів з 0,6 мМ бромбензолом протягом 120 хв. Кількість клітин, що поглинули трипановий синій, підраховували в камері Горяєва. Активність лактатдегідрогенази (КФ 1.1.1.27) оцінювали за зниженням поглинання NADH [3].

**РЕЗУЛЬТАТИ Й ОБГОВОРЕННЯ.** На першому етапі роботи було оцінено вплив ацетону, голодування та фенобарбіталу на активність

ферментів кон'югації ксенобіотиків. Встановлено, що введення ацетону, фенобарбіталу та голодування викликають суттєві зміни активності ферментів, що беруть участь в кон'югації ксенобіотиків (табл. 1). Внаслідок перорального введення щурам ацетону в дозі 1000 мг/кг пригнічувалась активність ферментів кон'югації. Спостерігалась тенденція до зменшення активності УДФ-ГТ, вірогідно знижувалась активність ФСТ та ГТФ (субстрат етакринова кислота) – на 28 і 38 % відповідно. Подібний до ацетону вплив на активність ферментів мало позбавлення тварин їжі. На 3-й день голодування активність УДФ-ГТ, ФСТ та ГТФ (субстрат етакринова кислота) в печінці щурів була нижчою на 21, 23 і 41 % відповідно.

Фенобарбітал підвищував зазначену активність ферментів на 58, 28 та 47 % відповідно. Таким чином, дія ацетону та голодування на ферментні системи кон'югації значно відрізняється від дії фенобарбіталу.

На другому етапі дослідження ми вивчали токсичну дію бромбензолу на ізольовані гепатоцити, отримані від щурів, яким вводили ацетон, фенобарбітал або які голодували. За контроль слугували проби, в яких гепатоцити

інкубували без бромбензолу. Виявлено (табл. 2), що через 2 год інкубації навіть інтактні гепатоцити втрачають життєздатність. Однак найбільше зниження життєздатності гепатоцитів мало місце при їх інкубації з гепатотоксиком. Порівняно з інтактними щурами кількість гепатоцитів, що профарбувались трипановим синім в процесі інкубації з бромбензолом, у тварин, які голодували, виявилась більшою на 26 %. За цих умов активність позаклітинної лактатдегідрогенази була вищою на 24 %.

Попереднє введення щурам ацетону ще більше, ніж голодування, підсилювало токсичну дію бромбензолу. На відміну від тварин контрольної групи кількість гепатоцитів, що профарбувались трипановим синім в процесі інкубації з бромбензолом, у щурів, які отримували ацетон, була більшою на 69 %, а активність лактатдегідрогенази, яка вийшла з гепатоцитів у позаклітинне середовище, – вищою на 35 %. Близьким за здатністю підсилювати токсичну дію ксенобіотиків був фенобарбітал. Введення його щурам приводило до збільшення частки профарбованих гепатоцитів на 58 % при інкубації клітин з бромбензолом. Індукція тварин фенобарбіталом

Таблиця 1 – Вплив ацетону, голодування, фенобарбіталу на активність УДФ-глюкуронілтрансферази, фенолсульфотрансферази та глутатіон-S-трансферази етакринової кислоти в мікросомній фракції печінки щурів ( $M \pm m$ ,  $n=9-10$ )

Активність ферментів, нмоль/хв на 1 мг білка	Контроль	Ацетон	Голодування	Фенобарбітал
УДФ-глюкуронілтрансфераза	2,94±0,23	2,59±0,21	2,33±0,15*	5,02±0,30*
Фенолсульфотрансфераза	0,36±0,02	0,26±0,02*	0,27±0,02*	0,46±0,03*
Глутатіон-S-трансфераза (етакринова кислота)	26,6±1,78	20,9±1,69*	15,9±1,13*	39,1±2,73*

Примітка. Тут і в таблиці 2: \* – різниця з контролем вірогідна ( $p < 0,05$ ).

Таблиця 2 – Вплив ацетону, голодування та фенобарбіталу на токсичність бромбензолу щодо ізольованих гепатоцитів ( $M \pm m$ ,  $n=5$ )

Умови досліджу	Контроль	Ацетон	Голодування	Фенобарбітал
Кількість клітин, профарбованих трипановим синім, %				
До інкубації	9,0±0,9	12,0±1,9	9,6±1,3	11,6±1,7
Через 120 хв від початку інкубації				
Інтактні клітини	19,6±1,5	31,6±2,4	26,0±2,8	29,8±1,7
Бромбензол, 0,6 мМ	38,7±2,7 100 %	65,4±4,3* 169 %	48,9±3,6* 126 %	61,0±3,9* 158 %
Вихід лактатдегідрогенази в інкубаційне середовище, %				
До інкубації	100	100	100	100
Через 120 хв від початку інкубації				
Інтактні клітини	138±3,2	150±7,9	140±6,4	147±5,2
Бромбензол	202±9,4 100 %	272±15* 135 %	250±12* 124 %	243±11* 120 %

посилювала також вихід з гепатоцитів лактат-дегідрогенази на 20 %.

Таким чином, токсичні ефекти бромбензолу тісно асоційовані з процесами кон'югації його токсичних інтермедіатів. Наявність тісного зв'язку між токсичним ефектом бромбензолу та активністю ферментів кон'югації вказує на те, що в цілісному організмі кінцева токсичність ксенобіотика буде, очевидно, визначатись співвідношенням між швидкістю утворення токсичних метаболітів і здатністю організму ефективно їх елімінувати. Ацетон, як і голодування, знижує активність ферментів кон'югації, чим і можна пояснити підвищення токсичності бромбензолу. Фенобарбітал, хоч і збільшує активність ферментів кон'югації, але він є сильним індуктором ферментів I фази біотрансформації ксенобіотиків, зокрема ізофор-

ми 2В цитохрому P450 [1], яка, за даними літератури [7], причетна до утворення реакційно-здатних метаболітів бромбензолу. Тому зрозуміло, що і на тлі введення фенобарбіталу зростає токсичність бромбензолу. В клінічній практиці треба враховувати ймовірні зміни гепатотоксичної дії ксенобіотиків під впливом гіперкетонемії.

**ВИСНОВКИ.** 1. Введення ацетону, як і голодування, знижує активність УДФ-глюкуронілтрансферази, фенолсульфотрансферази та глутатіон-S-трансферази в печінці. Фенобарбітал посилює зазначену активність ферментів кон'югації.

2. Ацетон, голодування та фенобарбітал підвищують гепатотоксичність бромбензолу.

#### СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. Влияние гиперкетонемии на маркерные активности изоформ цитохрома P-450 и гепатотоксичность тетрахлорметана, парацетамола и гидразина / А. А. Пентюк, А. П. Андреев, Г. И. Блажиевская [и др.] // Ліки. – 1999. – № 2. – С. 72–75.

2. Изучение взаимосвязи гепатотоксического действия бромбензола и маркерных активностей цитохрома, цитохрома P-450 и ферментов конъюгации / С. А. Качула, А. А. Пентюк, Е. В. Тертышная [и др.] // Современ. пробл. токсикол. – 2002. – № 2. – С. 40–44.

3. Кочетов Г. А. Практическое руководство по энзимологии / Г. А. Кочетов. – М.: Высшая школа, 1980. – 374 с.

4. Стимуляция синтеза ДНК в гепатоцитах фракциями сыворотки крови гепатэктомированных крыс / Л. А. Осипова, Ю. Д. Иващенко, Н. И. Немлий [и др.] // Биополимеры и клетка. – 1986. – № 3. – С. 141–146.

5. Accumulation of phenols and catechols in isolated mouse hepatocytes in starv ation or after pretreatment

with acetone / G. Banhegyi, T. Garzo, F. Antoni [et al.] // Biochem. Pharmacol. – 1988. – **37**, № 21. – P. 4157–4162.

6. Chronic acetonemia alters liver oxidative balance and lipid content in rats. A model of nash / B. B. Almeida, M. G. Mathias, G. V. Portari, A. A. Jordao // Exp. Clin. Endocrinol. Diabetes. – 2010. – **118**, № 1. – P. 61–63.

7. Harauchi T. Effect of P-450 inducers on glutathione (GSH) depletion by bromobenzene in primary cultures of dog hepatocytes / T. Harauchi M. Hirata // Biol. Pharm. Bull. – 1994. – **17**, № 5. – P. 658–661.

8. Lipid peroxidation and antioxidant system in rats acutely treated with acetone / M. G. Mathias, B. B. Almeida, J. E. Bueno [et al.] // Exp. Clin. Endocrinol. Diabetes. – 2010. – **118**, № 6. – P. 368–370.

9. Sadovnichy V. Effect of prostaglandin F2 alpha on free radical generation, glutathione content and microsomal oxidase activities in rat liver microsomes induced either by ethanol or acetone / V. Sadovnichy, D. Muller, V. Buko // Pol. J. Pharmacol. – 1997. – **49**, № 6. – P. 431–437.

**С.А. Качула<sup>1</sup>, С.А. Бондарь<sup>1</sup>, О.А. Качула<sup>2</sup>**

**ВИННИЦКИЙ НАЦИОНАЛЬНЫЙ МЕДИЦИНСКИЙ УНИВЕРСИТЕТ ИМЕНИ Н.И. ПИРОГОВА<sup>1</sup>  
ВОЕННО-МЕДИЦИНСКИЙ КЛИНИЧЕСКИЙ ЦЕНТР ЦЕНТРАЛЬНОГО РЕГИОНА<sup>2</sup>, ВИННИЦА**

## **ВЛИЯНИЕ ГИПЕРКЕТОНЕМИИ НА АКТИВНОСТЬ ФЕРМЕНТОВ КОНЬЮГАЦИИ КСЕНОБИОТИКОВ И ГЕПАТОТОКСИЧНОСТЬ БРОМБЕНЗОЛА**

### **Резюме**

*Изучено влияние гиперкетонемии на активность некоторых ферментов конъюгации ксенобіотиков и гепатотоксичность бромбензола. Гиперкетонемия, возникающая после введения ацетона или голодания,*

снижает активность УДФ-глюкуронилтрансферазы, фенолсульфотрансферазы и глутатион-S-трансферазы в печени крыс. Фенобарбитал повышает активность указанных ферментов. Ацетон, голодание и фенобарбитал увеличивают гепатотоксичность бромбензола.

**КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА:** гиперкетонемия, ксенобиотики, конъюгация, биотрансформация, ацетон, фенобарбитал, УДФ-глюкуронилтрансфераза, фенолсульфотрансфераза, глутатион-S-трансфераза, бромбензол.

**S.O. Kachula<sup>1</sup>, S.A. Bondar<sup>1</sup>, O.O. Kachula<sup>2</sup>**  
M.I. PYROHOV VINNYTSIA NATIONAL MEDICAL UNIVERSITY<sup>1</sup>  
MILITARY-MEDICAL CLINICAL CENTER OF CENTRAL REGION<sup>2</sup>, VINNYTSIA

## **EFFECT OF HYPERKETONEMIA ON THE ACTIVITY OF ENZYMES CONJUGATION OF XENOBIOTICS AND BROMBENZENE HEPATOTOXICITY**

### **Summary**

*Influence of hyperketonemia on activity of some enzymes and conjugation of xenobiotics and brombenzene hepatotoxicity was studied. Hyperketonemia that occurs after the introduction of acetone or starvation, reduces the activity of the UDP-glucuronosyltransferases, phenolsulfotransferases and glutathione-S-transferase in rats' liver. Phenobarbital increases the activity of these enzymes. Acetone, starvation and phenobarbital increase brombenzene hepatotoxicity.*

**KEY WORDS:** hyperketonemia, xenobiotics, conjugation, acetone, phenobarbital, UDP-glucuronosyltransferase, phenolsulfotransferase, glutathione-S-transferase, brombenzene.

Отримано 03.12.10

**Адреса для листування:** С.О. Качула, Вінницький національний медичний університет імені М.І. Пирогова, вул. Пирогова, 56, Вінниця, 21018, Україна.