УДК:615.015.4:577.15:612.391:591.5

ВПЛИВ ГОЛОДУВАННЯ ЩУРІВ ТА АЦЕТОНУ НА ФЕРМЕНТНІ СИСТЕМИ БІОТРАНСФОРМАЦІЇ ТА ТОКСИЧНІСТЬ КСЕНОБІОТИКІВ–СУБСТРАТІВ CYP2E1

С. О. КАЧУЛА, О. О. ПЕНТЮК

Вінницький національний медичний університет ім. М. І. Пирогова, Україна;
e-mail: vjar@vsmu.vinnica.ua

Установлено, что двух-трехдневное голодание крыс и пероральное введение им ацетона (250 и 1000 мг/кг маси тела) значительно усиливают в печени, почках и легких анилин- и п-нитрофенолгидроксилазную активность, зависимую от CYP2E1, а также эритромицин-N-деметилазную активность, зависимую от CYP2E1. При этом наблюдается снижение в печени ферментативной активности, зависимой от CYP2D, CYP1A2 и CYP2C, как и UDP-глюкуронозилтрансферазы, сульфотрансферазы и глутатионтрансферазы. Голодание животных вызывает накопление в печени коэнзима А и увеличение активности N-ацетилтрансферазы. Индуцированные при этом изменения в активности ферментов, которые в значительной мере имитируются введением крысам ацетона, коррелируют с усилением процессов липолиза, гликогенолиза и глюконеогенеза, особенно кетогенеза. Голодание совместно с введением им ацетона усиливают метаболизм ацетанилида и бромбензола, что увеличивает образование токсичных метаболитов последнего, повышающих его гепато-, нефро- и пульмотоксичность. Голодание ослабляет элиминацию индометацина из плазмы крови, но усиливает конъюгацию сульфадимезина с уксусной кислотой.

К л ю ч е в ы е с л о в а: голодание, ацетон, цитохром Р-450, монооксигеназа, ферменты конъюгации, сульфадимезин, ацетанилид, толуол, бромбензол, токсичность.

Голодування є одним із поширених фізіологічних станів організму, яке супроводжує багато захворювань, а також застосовується як метод лікування. Виявилось, що воно може суттєво змінити реакцію тварин та людини на дію багатьох ліків і токсичних сполук. Навіть нетривале голодування здатне спричинити важке ураження печінки терапевтичними дозами парацетамолу [1]. Не виключено, що зміна чутливості організму до дії токсинів під час голодування є наслідком перебудови систем, які метаболізують ксенобіотики. Голодування супроводжується активацією цитохрому *P*-4502E1 (CYP2E1), який бере участь у перетворенні ацетону на молочну кислоту [2], чим сприяє поновленню запасів глюкози у процесі глюконеогенезу. CYP2E1 активно метаболізує також ксенобіотики (етанол, парацетамол, тетрахлорметан, бензол), утворюючи при цьому токсичні метаболіти [2]. Тому посилення токсичності деяких ксенобіотиків під час голодування можна пояснити індукцією CYP2E1. Однак, загалом, механізми змін токсичності ксенобіотиків за таких умов не з'ясовано, тим більше що не завжди спостерігається підвищення їхньої токсичності, а часто реєструється навіть її зниження, зокрема амфотерицину [3]. Проте комплексні дослідження впливу голодування на метаболізм ксенобіотиків, які б охоплювали як фазу їхнього окислення, так і кон'югації, майже не проводяться. Не з'ясовано також, які саме метаболічні процеси є вирішальними у формуванні в період голодування змін чутливості організму до ксенобіотиків.

Метою роботи було вивчення зв'язку між метаболічним статусом тварин під час голодування і активністю ферментів першої та другої фази метаболізму ксенобіотиків, а також дослідження сумісного впливу голодування і ацетону та UDP-глюкози на біотрансформацію модельних препаратів ацетаніліду, толуолу і бромбензолу та токсичності останнього для щурів.

Матеріали і методи

Дослідження проведено на 205 щурах-самцях популяції Вістар. Всі щури перед дослідом протягом тижня отримували повноцінний крохмально-казеїновий раціон [4]. Потім частину тварин на 2–3 дні позбавляли їжі, залишаючи вільним доступ до води. Одні щури після трьох днів голодування отримували протягом дня повноцінний раціон, а іншим внутрішньоочеревинно вводили UDP-глюкозу в дозі 300 мг/кг маси тіла за 3 і 6 год до початку досліду. Щурам, яких не годували перорально один раз на добу протягом трьох днів вводили 30%-й розчин ацетону в дозі 1000 мг/кг маси тіла.

Тварин декапітували під ефірним наркозом, після чого виділяли субклітинні фракції печінки, нирок і легень. В мікросомах визначали рівень неспецифічної монооксигенази – цитохрому *P*-450 (КФ 1.14.14.1) – та активність його ізоформ за використання специфічних субстратів. Анілінгідроксилазну і *п*-нітрофенолгідроксилазну активність CYP2E1 оцінювали за утворенням *п*-амінофенолу та *п*-нітрокатехолу відповідно, ацетанілідгідроксилазну активність CYP1A2 – за вмістом парацетамолу, метопролол-О-деметилазну (CYP2D), індометацин-О-деметилазну (CYP2C) та еритроміцин-N-деметилазну (CYP3A) – за рівнем формальдегіду, UDP-глюкуронозилтрансферазину (КФ 2.4.1.17) – швидкістю кон'югації *п*-нітрофенолу, глюкозо-6-фосфатазну (КФ 3.1.3.9) – за вивільненням неорганічного фосфату. В постмітохондріальній фракції визначали активність арилсульфотрансферази (КФ 2.8.2.1.) та N-ариламін-ацетилтрансферази (КФ 2.3.1.5) за утворенням сульфоефіру β-нафтолу і ацетилюванням *п*-амінобензойної кислоти відповідно, вміст відновленого глутатіону (GSH) – в глутатіонтрансферазній реакції, глюкуронідів – за реакцією з карбазолом, сульфатів – турбідиметричним методом. Посилання на використані в експериментах методи наведено в попередніх роботах [5, 6]. Для визначення активності глутатіонтрансферази (КФ 2.5.1.18) застосовували такі субстрати як 1-хлор-2,4-динітробензол (ХДНБ, форми α, μ, π), етакринова кислота (форма π) та нітрогліцерил (форма μ) [7]. Вміст коензиму А (КоА-SH та ацетил-КоА) визначали за ацетилюванням *п*-амінобензойної кислоти [4], кетонових тіл у крові – дифузійним методом із саліциловим альдегідом [8], глюкози – *о*-толуїдиновим методом, вільних жирних кислот – за вмістом мідних солей [9], глікогену (печінка) – антроновим методом [8].

Ацетилювання сульфадимезину оцінювали за екскрецією із сечею вільного та ацетильованого сульфадимезину після перорального введення його щурам (100 мг/кг маси тіла). Кількість сульфадимезину визначали методом Bratton-Marshall [10].

Після внутрішньоочеревинної ін'єкції щурам ацетаніліду (100 мг/кг маси тіла) у сечі, зібраній впродовж 12 год, визначали рівень його метаболітів як описано раніше [12]. Гідроксилювання ацетаніліду з утворенням парацетамолу здійснюється CYP1A2 [13], після чого він кон'югується з глюкуроновою кислотою та сульфатом за участю UDP-глюкуронілтрансферази та фенолсульфотрансферази [14]. Парацетамол може окислюватись до токсичного метаболіту N-ацетил-*п*-бензохіноніміну, переважно CYP2E1 [14]. N-ацетил-*п*-бензохінонімін детоксикується після кон'югації із глутатіоном за дії глутатіонтрансферази. Подальший метаболізм глутатіонового кон'югату завершується формуванням меркаптурових кислот [14].

Метаболізм толуолу оцінювали за екскрецією його метаболітів із сечею (за 12 год) після перорального введення щурам 50%-го розчину його на соняшниковій олії (100 мг/кг маси тіла). Основним шляхом метаболізму толуолу є гідроксилювання метильної групи з утворенням бензилового спирту, який після окислення до бензойної кислоти і кон'югації останньої із гліцином екскретується у вигляді гіпурової кислоти [15]. В незначній частині толуолу окислюється ароматичне ядро і накопичуються *о*-, *м*- і *п*-крезоли. В метилгідроксилюванні його головну роль відіграє CYP2E1, у той час як в гідроксилюванні ароматичного ядра – ізоформи сімейства CYP2C [16]. Вміст гіпурової кислоти визначали за реакцією з піридином і наявності в середовищі оцтової кислоти [17], а кількість крезолів – за реакцією з 4-аміноантипірином [10].

Першою реакцією метаболізму індометацину є його CYP2C-залежне О-деметилювання [18]. Після кон'югації препарат виводиться з організму у вигляді О- та М-глюкуронідів. Для визначення вмісту індометацину після екстракції його з підкисленої плазми крові хлороформом застосовували метод високоефективної рідинної хроматографії. Використовували хроматограф HP 1100 Leonardo (США) з колонкою Hypersil BDS C18 (125 × 4 мм, діаметр пор – 5 мкм), елюентом слугувала суміш 0,03 М цитратного буфера (pH 3,9) та ацетонітрилу (50 : 50, v/v). Швидкість потоку елюенту становила 1 мл/хв, тривалість виходу індометацину з колонки – 5,2 хв, довжина хвилі детектора – 260 нм.

Метаболізм бромбензолу досліджували після перорального введення щурам (200 мг/кг маси тіла) 50%-го розчину його на олії. В сечі, зібраній за 18 год, визначали вміст меркаптурових кислот за кількістю тіоефірів, утворених після її лужного гідролізу [19], рівень фенольних та катехольних метаболітів – за реакцією з 4-аміноантипірином і хлоридом кобальту відповідно [10].

Гепато- нефро- та пульмотоксичність бромбензолу оцінювали після його перорального введення щурам (1 г/кг маси тіла). В добовій сечі визначали вміст білка, креатиніну, активність γ-глутамілтрансферази, в сироватці крові – рівень креатиніну, активність аланінамінотрансферази (КФ 2.6.1.2), аспартатамінотрансферази (КФ 2.6.1.1) [9]. Лаваж легень проводили 0,9%-м розчином хлориду натрію. В рідині змивів оцінювали вміст білка, активність γ-глутамілтранс-

ферази та глутатіонтрансферази.

В експериментах використовували глюкозо-6-фосфат, GSH і ATP («Reanal», Угорщина); метопролол, індометацин, еритроміцин, UDP-глюкуронову та етакринову кислоти, β-глюкуронідазу та арилсульфатазу фірми «Sigma» (США). Ацетил-КоА одержували додаванням до препарату коензиму А («Ferak», Швейцарія) в кількості, розрахованій за оцтовим ангідридом. Інші реактиви – виробництва країн СНД.

Результати та обговорення

Голодування зумовлює значні зміни у вуглеводному та ліпідному обміні щурів. На третій день від його початку вміст глюкози у крові становив 4,08 ± 0,21 ммоль/л (за 5,94 ± 0,25 у контролі), концентрація глікогену в печінці – 48,0 ± 4,1 мкмоль/г (у контролі – 135 ± 12), рівень кетонових тіл у крові – 2,03 ± 0,10 ммоль/л (у контролі – 0,36 ± 0,026), вміст жирних кислот в сироватці крові – 1,45 ± 0,11 ммоль/л (у контролі – 0,70 ± 0,07), активність глюкозо-6-фосфатази в печінці – 0,98 ± 0,06 нмоль/хв на 1 мг білка (в контролі – 0,39 ± 0,03).

Позбавлення щурів їжі впливає на монооксигеназну активність печінки, причому виразність змін підвищується зі збільшенням його тривалості (табл. 1). На другий та третій день голодування значно зростає активність залежних від CYP2E1 ферментів –анілінгідроксилази (в 2,3 та 2,8 раза) і *п*-нітрофенолгідроксилази (в 2,4 та 3,0 рази), CCl_4-залежної пероксидації ліпідів мікросом (в 2,0 та 2,5 раза). Меншою мірою зростає (на 29 та 40% – другий і третій дні експерименту) еритроміцин-N-деметилазна активність, яка є маркером CYP3A. Водночас ацетанілідгідроксилазна (маркер CYP1A2), метопролол-О-деметилазна (маркер CYP2D), індометацин-О-деметилазна (маркер CYP2C) активність під час голодування, навпаки, знижується на 20–35%.

Таблиця 1. Цитохром Р-450-залежна монооксигеназна активність, ферменти та субстрати кон'югації в печінці тварин під час голодування і відновлення харчування щурів та введення їм ацетону (M ± m, n = 9–10)

Активність ферментів, нмоль/хв на 1 мг білка	Контрольна група	Дні голодування		Відновлення харчування	Ацетон
		Другий	Третій		
Монооксигеназна активність					
Цитохром *Р*450	0,80 ± 0,04	0,71 ± 0,05*	0,64 ± 0,04*	0,77 ± 0,06	1,13 ± 0,05*
Анілінгідроксилаза	0,80 ± 0,075	1,82 ± 0,07*	2,22 ± 0,17*	1,27 ± 0,09*	2,16 ± 0,17*
п-Нітрофенолгідроксилаза	0,29 ± 0,02	0,71 ± 0,04*	0,86 ± 0,07*	0,52 ± 0,04*	1,05 ± 0,09*
Ацетанілідгідроксилаза	1,90 ± 0,14	1,55 ± 0,11	1,51 ± 0,08*	1,82 ± 0,12	1,58 ± 0,10
Еритроміцин-N-деметилаза	1,03 ± 0,06	1,33 ± 0,06*	1,42 ± 0,08*	1,16 ± 0,09	1,58 ± 0,09*
Метопролол-О-деметилаза	0,80 ± 0,06	0,67 ± 0,03	0,64 ± 0,02*	0,72 ± 0,04	0,65 ± 0,04*
Індометацин-О-деметилаза	0,60 ± 0,04	0,48 ± 0,02*	0,39 ± 0,03*	0,50 ± 0,03	0,53 ± 0,05*
Ферменти і субстрати кон'югації					
UDP-глюкуронілтрансфераза	2,94 ± 0,23	2,50 ± 0,20	2,33 ± 0,15*	2,76 ± 0,16	2,59 ± 0,21
Глюкуроніди	92,2 ± 7,8	74,1 ± 4,6*	66,1 ± 3,4*	81,8 ± 3,97	78,1 ± 4,23
Фенолсульфотрансфераза	0,35 ± 0,02	0,30 ± 0,02	0,27 ± 0,02*	0,31 ± 0,03	0,26 ± 0,02*
Сульфати	1,42 ± 0,06	1,11 ± 0,05*	0,99 ± 0,05*	1,23 ± 0,05*	1,13 ± 0,05*
N-ацетилтрансфераза	0,28 ± 0,02	0,36 ± 0,02*	0,38 ± 0,02*	0,30 ± 0,02	–
КоА	305 ± 15	717 ± 51*	925 ± 57*	420 ± 33*	–
Глутатіонтрансфераза (хлординітробензол)	330 ± 33	246 ± 12*	226 ± 15*	295 ± 16	286 ± 27
Глутатіонтрансфераза (нітрогліцерол)	30,5 ± 2,44	24,1 ± 1,31*	22,6 ± 1,28*	26,6 ± 1,04	24,8 ± 1,94
Глутатіонтрансфераза (етакринова кислота)	27,4 ± 1,47	19,8 ± 1,02*	15,9 ± 1,13*	21,8 ± 1,77*	20,9 ± 1,69*
GSH	6,88 ± 0,36	5,53 ± 0,19*	4,96 ± 0,19*	6,09 ± 0,20	6,05 ± 0,30

Тут і в табл. 2–5: * різниця з контролем вірогідна, $p < 0,05$; вміст цитохрому *Р*-450 наведено в нмоль/мг білка, рівні глюкуронідів, сульфатів та GSH – в мкмоль/г печінки, КоА – в нмоль/г печінки.

Монооксигеназна активність змінюється також у нирках та легенях. На третій день голодування анілінгідроксилазна активність у нирках зростає до 0,620 ± ± 0,044 (за 0,260 ± 0,017 нмоль/хв на 1 мг білка в контролі), а *n*-нітрофенолгідроксилазна – до 0,300 ± 0,027 (за 0,100 ± 0,007 нмоль/хв на 1 мг білка в контролі). В легенях в обох випадках ферментативна активність підвищується на 50 та 67% відповідно. В разі відновлення харчування щурів виявлено чітку тенденцію до повної або часткової нормалізації активності ферментів у печінці, нирках та легенях.

Введення тваринам ацетону спричинює зміни монооксигеназної активності, як і під час голодування, зокрема активуються залежна від CYP2E1 анілінгідроксилазна та *n*-нітрофенолгідроксилазна активність, CCl_4-залежне ПОЛ і посилюється залежна від CYP3A еритроміцин-N-деметилазна активність, але пригнічується монооксигеназна, яка каталізується CY1A2, CYP2C та CYP2D.

Внаслідок позбавлення щурів їжі інгібується активність ферментів кон'югації. На третій день експерименту активність UDP-глюкуронілтрансферази, фенолсульфотрансферази та ізоферментів глутатіонтрансферази (субстрати ХДНБ, нітрогліцерол, етактринова кислота) виявляється нижчою, ніж у контролі на 21, 23, 41, 26 та 32%, відповідно. В печінці знижується вміст глюкуронідів, сульфатів і GSH на 28, 30 та 28% відповідно. Однак голодування супроводжується підвищенням в ній активності N-ацетилтрансферази (на 35%) та вмісту КоА (на 203%). Після припинення голодування спостерігається тенденція до нормалізації цих показників.

Пероральне введення в організм ацетону дещо знижує вміст глюкуронідів та активність UDP-глюкуронілтрансферази, вірогідно зменшує активність сульфотрансферази та вміст сульфатів, а також зумовлює тенденцію до зниження рівня GSH і активності глутатіонтрансферази із субстратами ХДНБ та нітрогліцеролом і вірогідно гальмує активність ферменту за використання як субстрату етактринової кислоти (π-форма). Вплив голодування на систему біотрансформації ксенобіотиків підтверджується даними кореляційного аналізу (табл. 2). Встановлено, що хоча загальний вміст цитохрому *P*-450 вірогідно не корелює з метаболічним статусом тварин, проте для маркерної активності окремих його ізоформ

Таблиця 2. Кореляційний аналіз зв'язків монооксигеназної активності, ферментів та субстратів кон'югації з біохімічним статусом печінки щурів під час їхнього голодування (n = 40)

Показники	Глюкоза крові	Вільні жирні кислоти	Кетонові тіла	Глікоген	Глюкозо-6-фосфатаза
Цитохром *P*450	0,32	-0,29	-0,31	0,16	-0,07
Анілінгідроксилаза	-0,37*	0,51*	0,65*	-0,43*	0,59*
n-Нітрофенолгідроксилаза	-0,39*	0,59*	0,69*	-0,45*	0,68*
ПОЛ, стимулюване CCl_4	-0,31	0,46*	0,52*	-0,34	0,46*
Ацетанілідгідроксилаза	0,24	-0,35	-0,36*	0,34	-0,39*
Еритроміцин-N-деметилаза	-0,36*	0,38*	0,55*	-0,44*	0,48*
Метопролол-О-деметилаза	0,33	-0,33	-0,37*	0,31	-0,24
Індометацин-О-деметилаза	0,32	-0,38*	-0,47*	0,38*	-0,35
UDP-глюкуронілтрансфераза	0,18	-0,26	-0,37*	0,12	-0,33
Глюкуроніди	0,36*	-0,45*	-0,55*	0,48*	-0,36*
Фенолсульфотрансфераза	0,28	-0,31	-0,41*	0,32	0,34
Сульфати	0,41*	-0,40*	-0,51*	0,42*	-0,35
N-ацетилотрансфераза	-0,23	0,37*	0,48*	-0,31	0,41*
КоА	-0,47*	0,51*	0,64*	-0,54*	0,48*
Глутатіонтрансфераза (субстрат – хлординітробензол)	0,34	-0,43*	-0,45*	0,35	-0,37*
Глутатіонтрансфераза (субстрат –нітрогліцерол)	0,35	-0,39*	-0,45*	0,33	-0,42*
Глутатіонтрансфераза (субстрат –етакринова кислота)	0,31	-0,36*	-0,49*	0,34	-0,41*
GSH	0,37*	-0,50*	-0,50*	0,43*	-0,50*

такий зв'язок виявлено. Значний кореляційний зв'язок показано між активністю анілінгідроксилази та *п*-нітрофенолгідроксилази, вмістом кетонових тіл і активністю глюкозо-6-фосфатази (r = = 0,59 − 0,69), дещо менший − між активністю цих ферментів і рівнем вільних жирних кислот та глікогену (r = 0,43 − 0,69) і ще менший − із вмістом глюкози. Незначний, але вірогідний зв'язок встановлено між активністю ПОЛ, спричиненою тетрахлорметаном, та еритроміцин-N-деметилазою. Ацетанілідгідроксилазна і *м*-О-деметилазна активність вірогідно корелює лише з рівнем кетонових тіл, тоді як індометацин-О-деметилазна − із вмістом кетонових тіл, вільних жирних кислот та глікогену.

Активність UDP-глюкуронілтрансферази і фенолсульфотрансферази залежить лише від кількості кетонових тіл, а вміст глюкуронідів та сульфатів, крім того, ще й від рівня жирних кислот, глікогену та активності глюкозо-6-фосфатази. Активність N-ацетилтрансферази тісно корелює із вмістом кетонових тіл, жирних кислот, КоА та активністю глюкозо-6-фосфатази, глутатіон-S-трансферази, а кількість GSH − з рівнем жирних кислот, кетонових тіл та активністю глюкозо-6-фосфатази, хоча і слабше, ніж з КоА.

Ці дані свідчать, що під час голодування щурів значно підвищується активність ферментів, асоційованих з CYP2E1 та CYP3A, і пригнічується ферментативна активність, яка залежить від CYP2D та CYP2C. Позбавлення тварин їжі інгібує реакцію кон'югації з глюкуроновою та сірчаною кислотами, глутатіоном, активуючи водночас кон'югацію з оцтовою кислотою. Ці зміни корелюють зі ступенем активації глюконеогенезу та ліполізу, але найвираженіше − із процесами кетогенезу. Введення в організм ацетону фактично імітує зміни в активності ферментів, які індукуються голодуванням тварин.

Варіабельність в активності ферментів виявлено також при дослідженні біотрансформації сульфадимезину, ацетаніліду, толуолу та бромбензолу. В деяких експериментах зроблено спробу компенсувати дефіцит глюкози, зумовлений голодуванням, введенням щурам UDP-глюкози, оскільки відомо, що за таких умов синтез кофактора глюкуронізації UDP-глюкуронової кислоти лімітується на стадії утворення саме UDP-глюкози [20].

Встановлено, що голодування стимулює ацетилювання сульфадимезину, внаслідок чого зростає на 77% екскреція із сечею ацетилсульфадимезину (табл. 3). Введення тваринам UDP-глюкози істотно знижує її, в той час як ацетон не спричинює вірогідних змін у метаболізмі сульфадимезину.

Голодування істотно впливає на метаболізм ацетаніліду. За незначного зниження екскреції продуктів обміну ксенобіотика спостерігається суттєвий перерозподіл між окремими шляхами його метаболізму. Так, вірогідно знижується (на 22%) інтенсивність залежного від CYP1A2 ароматичного гідроксилювання і екскреція амінофенольних метаболітів на тлі збільшення частки неметаболізованого ацетаніліду. Голодування тварин ослаблює процеси кон'югації як із глюкуроновою кислотою, так і сульфатом, унаслідок чого підвищується виділення з організму вільних амінофенолів (на 174%) та знижується глюкуронідних і сульфатних метаболітів (на 33 і 36% відповідно). Однак реакція N-гідроксилювання, яка каталізується переважно CYP2E1 і зумовлює утворення токсичного N-ацетил-*п*-бензохінонімін, під час голодування значно активується, а тому екскреція із сечею меркаптурових кислот зростає в 4,27 раза.

Ацетон зумовлює такі зміни в метаболізмі ацетаніліду, які подібні до змін, спричинених голодуванням щурів. При цьому гальмується залежне від CYP1A2 гідроксилювання ацетаніліду, за якого знижується екскреція *п*-амінофенольних метаболітів і пригнічуються процеси кон'югації, що підтверджується зростанням кількості некон'югованих амінофенолів і зменшенням вмісту глюкуронідних та сульфатних метаболітів. Істотно посилюється також утворення токсичних метаболітів, зокрема значно зростає (понад 5 разів) екскреція меркаптурових кислот. Ін'єкція тваринам UDP-глюкози компенсує індуковані голодуванням зміни метаболізму ксенобіотика. Зменшується пригнічення CYP1A2-залежного гідроксилювання останнього: збільшується частка амінофенольних метаболітів і зменшується анілідних. Меншою мірою інгібуються процеси кон'югації, що супроводжується майже повним відновленням екскреції глюкуронідних метаболітів і, частково, сульфатних. Введення щурам UDP-глюкози обмежує утворення реакційноздатних продуктів обміну. Порівняно із тваринами, які голодували, екскреція меркаптурових кислот зменшується майже вдвічі.

Позбавлення щурів їжі значно активує метаболізм толуолу шляхом метилгідроксилювання, яке індукується CYP2E1 і завершується утворенням гіпурової кислоти, але гальмує залежне від CYP2C гідроксилювання толуолу до крезолів. Тому в разі голодування тварин екскреція гіпурової кислоти збільшується на 57% на тлі зменшення рівня крезолів на 49%. Введення щурам ацетону відтворює індуковані голодуванням зміни метаболізму толуолу, а ін'єкція їм UDP-глюкози − пом'якшує ефекти голодування за дії ксенобіотика.

Дані літератури свідчать, що бромбензол

Таблиця 3. Вплив голодування щурів, UDP-глюкози та ацетону на екскрецію із сечею метаболітів сульфадимезину, ацетаніліду, толуолу та бромбензолу (M ± m, n = 10)

Показники, мкмоль/100 г маси тіла	Контрольні щури	Голодування		Ацетон
		3-й день	UDP-глюкоза	
Сульфадимезин (36 мкмоль на 100 г маси тіла)				
Вільний сульфадимезин	5,43 ± 0,52	6,08 ± 0,39	5,72 ± 0,47	6,10 ± 0,44
Ацетилсульфадимезин	4,28 ± 0,36	7,56 ± 0,65*	5,52 ± 0,45	3,62 ± 0,43
Загальний сульфадимезин	9,71 ± 0,74	13,6 ± 0,89	11,2 ± 0,87	9,72 ± 0,84
Ацетанілід (74 мкмоль на 100 г маси тіла)				
Загальний вміст метаболітів ацетаніліду	57,5 ± 1,94	53,0 ± 1,29	54,9 ± 0,65	56,3 ± 1,39
Загальний вміст амінофенолів	40,8 ± 1,69	32,0 ± 0,88*	36,6 ± 0,72*	37,4 ± 1,14*
Ацетанілід та анілін	16,7 ± 1,45	21,2 ± 1,22*	18,2 ± 0,40	18,9 ± 0,83
Некон'юговані амінофеноли	2,47 ± 0,11	6,76 ± 0,34*	3,54 ± 0,21*	4,47 ± 0,21*
Глюкуроніди амінофенолів	22,4 ± 0,59	15,0 ± 0,59*	20,2 ± 0,59*	17,0 ± 0,82*
Сульфати амінофенолів	15,7 ± 0,82	10,0 ± 0,62*	11,6 ± 0,33*	12,2 ± 0,65*
Меркаптурові кислоти	1,65 ± 0,21	7,05 ± 0,56*	3,73 ± 0,31*	7,92 ± 0,56*
Толуол (109 мкмоль на 100 г маси тіла)				
Загальний вміст метаболітів	55,2 ± 2,44	85,9 ± 3,53*	76,7 ± 2,25*	97,1 ± 2,85*
Гіпурова кислота	54,6 ± 2,41	85,6 ± 3,52*	76,3 ± 2,23*	96,6 ± 2,83*
Крезоли	0,61 ± 0,04	0,31 ± 0,01*	0,45 ± 0,03*	0,49 ± 0,03*
Бромбензол (127 мкмоль на 100 г маси тіла)				
Загальний вміст метаболітів	52,2 ± 2,73	78,8 ± 2,79*	65,1 ± 2,35*	85,0 ± 3,4*
Меркаптурати	29,8 ± 1,44	48,6 ± 1,68*	39,8 ± 1,30*	53,0 ± 2,6*
Загальний вміст бромфенолів	16,9 ± 1,49	20,8 ± 0,95*	18,6 ± 1,02	22,3 ± 1,1*
Вільні бромфеноли	3,77 ± 0,29	9,36 ± 0,46*	5,13 ± 0,20*	7,59 ± 0,48*
Кон'юговані бромфеноли *	77,2 ± 1,06	55,0 ± 1,03*	72,0 ± 0,98*	65,8 ± 1,5*
Загальні катехоли	5,52 ± 0,21	9,36 ± 0,52*	6,73 ± 0,31*	9,79 ± 0,88*

*Вміст кон'югованих бромфенолів наведено в % від їхнього загального вмісту.

(модельний токсин), метаболізується до токсичних епоксидів (3,4- та 2,3-оксидів), які здатні ковалентно зв'язуватись із білками та нуклеїновими кислотами [21]. Детоксикація епоксидів до меркаптурових кислот відбувається за участю глутатіонтрансферази. Гідролітичний і негідролітичний розрив зв'язків в молекулах епоксидів призводить до утворення бромкатехолів або бромфенолів, які здатні до детоксикації шляхом кон'югації з глюкуроновою кислотою та сульфатом і бути джерелом радикалів кисню та семіхінонових радикалів [21]. Згідно з одержаними нами результатами, до утворення токсичних метаболітів бромбензолу найбільше причетна CYP2E1 ізоформа цитохрому *P*-450 [6].

Під час голодування щурів істотно посилюється біотрансформація бромбензолу. Екскреція всіх його метаболітів із сечею збільшується на 51%, меркаптурових кислот – на 63%, катехолів – на 69%, у той час як загальних бромфенолів лише на 23%, а некон'югованих бромфенолів – на 148%. Частка кон'югованих бромфенолів знижується на 25%, що свідчить про порушення кон'югації метаболітів бромбензолу. Під впливом ацетону значно активується окислювальна фаза метаболізму бромбензолу і пригнічується кон'югація його метаболітів. Ін'єкція тваринам UDP-глюкози зменшує дію голодування на біотрансформацію бромбензолу, що підтверджується зменшенням екскреції меркаптурових кислот і бромкатехолів та зростанням частки кон'югованих бромфенолів.

За голодування щурів інгібується виведення із крові неметаболізованої форми індометацину (табл. 4). Відомо, що елімінація його пов'язана з реакцією О-деметилування, каталізованої CYP2C, та кон'югацією із глюкуроновою кислотою. Вже через 4 год спостерігається тенденція до підвищення у плазмі крові рівня індометацину (на 29%), а через 8–12 год його концен-

Таблиця 4. Вплив голодування щурів та UDP-глюкози на динаміку концентрації незміненої форми індометацину у плазмі крові за перорального введення тваринам індометацину в дозі 30 мг/кг маси тіла (M ± m; n = 4)

Час після введення щурам індометацину, год	Групи тварин				
	Контрольні щури	Голодування	% до контролю	Голодування + UDP-глюкоза	% до контролю
	Концентрація індометацину у плазмі крові, мкг/мл				
0,5	38,7 ± 6,17	37,2 ± 6,54	96	40,2 ± 8,04	104
1,0	47,4 ± 2,90	44,5 ± 5,05	94	45,5 ± 4,67	96
2,0	31,0 ± 3,74	31,8 ± 1,31	103	30,0 ± 3,36	97
4,0	17,2 ± 2,06	22,2 ± 2,80	129	20,0 ± 2,52	116
8,0	9,67 ± 1,31	13,3 ± 0,65*	138	11,4 ± 0,93	118
12,0	4,37 ± 0,50	8,78 ± 0,84*	201	6,02 ± 0,50*	138

трація вірогідно збільшується на 38 та 101% відповідно. Введення в організм UDP-глюкози зменшує індуковане голодуванням пригнічення елімінації індометацину.

Дані таблиці 5 свідчать, що бромбензол зумовлює важкі ураження печінки (це підтверджується зниженням в ній на 67% вмісту GSH та підвищенням у 4 рази в сироватці крові активності трансаміназ), пошкодження легень (в рідині бронхоальвеолярного лаважу зростає рівень білка в 1,95 раза, глутатіон- і γ-глутатіонмілтрансферази – в 3 рази) та нирок (рівень білка та γ-глутатіонмілтрансферази у сечі підвищується в 2,2 та 3,2 раза, вміст креатиніну в сироватці крові – в 1,5 раза).

Гепатотоксичність бромбензолу істотно посилюється на фоні голодування щурів. Активність аланін- та аспартаттрансферази збільшується

Таблиця 5. Вплив голодування щурів та введення їм ацетону і UDP-глюкози на гепато- пульмо- та нефротоксичність бромбензолу (M ± m, n = 8–9)

Показники	Контрольні тварини	Бромбензол	Голодування + бромбензол	UDP-глюкоза + бромбензол	Ацетон + бромбензол
			Гепатотоксичність		
Аланінамінотрансфераза сироватки крові, мкмоль/год на 1 л	0,49 ± 0,06	1,95 ± 0,15	2,86 ± 0,23*	1,53 ± 0,09*	3,42 ± 0,20*
Аспартатамінотрансфераза сироватки крові, мкмоль/год на 1 л	0,56 ± 0,07	2,28 ± 0,19	3,24 ± 0,25*	1,67 ± 0,08*	3,84 ± 0,21*
GSH печінки, мкмоль/г	6,65 ± 0,40	2,20 ± 0,20	1,37 ± 0,13*	3,19 ± 0,24*	0,99 ± 0,15*
			Пульмотоксичність (рідина бронхоальвеолярного лаважу)		
Білок, мг/л	6,79 ± 0,45	13,3 ± 0,61	16,7 ± 0,75*	11,3 ± 0,42*	18,5 ± 0,68*
γ-Глутатіонмілтрансфераза, нмоль/хв на 1 мг білка	0,32 ± 0,05	0,94 ± 0,04	1,10 ± 0,04*	0,73 ± 0,03*	1,24 ± 0,05*
γ-Глутатіонмілтрансфераза, нмоль/хв на 1мг білка	0,25 ± 0,04	0,75 ± 0,06	0,92 ± 0,03*	0,59 ± 0,04*	1,08 ± 0,05*
			Нефротоксичність		
Білок, мг/мл	5,89 ± 0,86	11,7 ± 0,84	17,1 ± 1,08*	10,2 ± 0,47	18,9 ± 1,03*
γ-Глутатіонмілтрансфераза, нмоль/хв на 1мл	1,09 ± 0,14	3,44 ± 0,25	4,67 ± 0,21*	2,51 ± 0,18*	5,03 ± 0,25*
Креатинін сироватки крові, мкмоль/л	72,0 ± 4,6	107,8 ± 2,8	116,8 ± 3,9	100,5 ± 4,27	119,8 ± 4,4*

в 5,8 раза, вміст GSH зменшується на 79%. Ще істоніше впливає на щурів ацетон: активність трансаміназ підвищується майже в 7 разів, рівень GSH знижується на 85%. Ін'єкція тваринам UDP-глюкози зменшує токсичний вплив бромбензолу. Активність цих ферментів в сироватці крові підвищується лише в 3,1 та 3,0 рази відповідно на тлі зменшення в печінці на 52% вмісту глутатіону.

Голодування щурів і введення їм ацетону потенціюють пульмотоксичність бромбензолу. Рівень білка в рідині лаважу у стані голодування тварин зростає в 2,5 раза, активність глутатіонтрансферази та γ-глутамілтрансферази – в 3,4 та 3,7 раза відповідно, а за перорального введення їм ацетону ці показники збільшуються в 2,7, 3,9 та 4,3 раза відповідно. UDP-глюкоза зменшує токсичний вплив бромбензолу на легені.

Голодування посилює негативний вплив бромбензолу на нирки. Вміст білка в сечі підвищується в 2,9 раза, активність γ-глутамілтрансферази – в 4,3 раза, рівень креатиніну в сироватці крові – на 62%. Ще істотніше підвищується нефротоксичність бромбензолу під впливом ацетону, в той час як UDP-глюкоза значно зменшує негативний ефект ксенобіотика.

Таким чином, по-перше, голодування супроводжується глибокими порушеннями в системі біотрансформації токсичних сполук. Відбувається значне збільшення активності ферментів, залежних від CYP2E1, і помірне – залежних від CYP3A. Водночас спостерігається зменшення ферментативної активності, асоційованої з CYP2C, CYP2D та CYP1A2. Системним наслідком цих змін є помітна інтенсифікація етапів біотрансформації ацетаніліду, толуолу та бромбензолу, каталізованих CYP2E1. Така перебудова метаболізму дуже небезпечна для організму, оскільки субстрати CYP2E1 досить часто метаболізуються з утворенням токсичних продуктів [2]. Вірогідно, що саме цим пояснюється різке підвищення токсичності бромбензолу, парацетамолу та толуолу в період голодування тварин, виявлене в наших та інших дослідженнях [22, 1]. Останнє підтверджується підвищенням екскреції меркаптурових кислот, що належать до реакційноздатних метаболітів ацетаніліду та бромбензолу. З іншого боку, уповільнення елімінації індометацину, очевидно, є наслідком гальмуванням О-деметилування, яке каталізується ферментами підсімейства CYP2C.

По-друге, голодування істотно обмежує здатність організму до кон'югації ксенобіотиків, передусім із глюкуроновою кислотою. Ослаблення глюкуронізації, ймовірно, пов'язано зі зменшенням доступності глюкози, яка необхідна для синтезу UDP-глюкуронової кислоти. Спричинені голодуванням щурів порушення енергетичного обміну можуть бути також чинником ослаблення синтезу коферменту сульфатування. Однак інтенсифікація процесів кетогенезу зумовлює зростання пулу ацетил-КоА, що, ймовірно, стимулює процеси кон'югації сульфадимезину з оцтовою кислотою. Ключове значення зниження доступності глюкози для метаболізму ксенобіотиків загалом, а не лише для його кон'югаційної фази, підтверджується даними експериментів, згідно з якими навіть одноразове введення щурам UDP-глюкози компенсує інші порушення метаболізму цих сполук під час голодування тварин.

По-третє, одержані дані свідчать, що одним із механізмів, унаслідок яких відбуваються зміни в системі біотрансформації ксенобіотиків за голодування щурів, є активація процесів кетогенезу. За таких умов у тварин між підвищенням рівня кетонових тіл і змінами активності ферментів встановлюється вірогідна кореляційна залежність, а введення їм ацетону імітує більшість ефектів голодування. Активація CYP2E1 у тварин, які голодують, не викликає сумніву з огляду на його істотну роль у перетворенні ацетону на молочну кислоту, що є джерелом відновлення фонду глюкози. F. G. Bondok et al. показали важливе значення CYP2E1 в утилізації ацетону на мишах за інгібування активності CYP2E1. У таких тварин під час голодування вміст ацетону у крові зростав у 28 разів, тоді як у мишей з CYP2E1 дикого типу – лише в 2,5 –4,4 раза [23]. Основним механізмом підвищення активності CYP2E1 є його субстратна стабілізація, що зумовлює збільшення кількості білка останнього за відсутності відповідного підвищення рівня іРНК, хоча допускається також транскрипційний варіант стимуляції його експресії [2]. Посилення активності CYP3A можливо пов'язано з типовим для стану голодування тварин підвищенням продукції глюкокортикоїдів, які є індукторами як ферментів глюконеогенезу, так і CYP3A. З іншого боку, введення в організм ацетону також посилює експресію CYP3A [24]. Зниження активності CYP2C, ймовірно, спричинено зростанням під час голодування тварин рівня глюкагону, який здатний гальмувати їхню експресію [25].

На підставі власних результатів та даних літератури можна уявити таку послідовність подій, які трансформують відповідь організму під час голодування на дію ксенобіотиків: голодування → перебудова енергетичного метаболізму → → зміни в активності ферментів → зміна величини співвідношення між токсичними і неток-

сичними метаболітами → зміна токсичності ксенобіотиків.

INFLUENCE OF STARVATION AND ACETONE ON THE ENZYME SYSTEMS OF BIOTRANSFORMATION AND TOXICITY OF XENOBIOTICS CYP2E1 SUBSTRATES IN RATS

S. O. Kachula, O. O. Pentyuk

Pirogov, Vynnytsya National Medical University;
e-mail: vjar@vsmu.vinnica.ua

S u m m a r y

In experiments on 205 rats it was fixed, that starvation during 2–3 days, as well as introduction of acetone (250 and 1000 mg/kg) considerably increases CYP2E1- dependent aniline and *p*-nitrophenol hydroxylase activity in the liver, kidneys, lungs and CYP3A dependent erythromycin N-demethylase activity, at the same time, suppress in a liver activity enzymes, dependent CYP2D, CYP1A2 and CYP2C as well as of activity UDP-glucuronosyltransferase, sulfotransferase and glutathione-S-transferase. The starvation causes accumulation of KoA and increases activity of N-acetyltransferase in the liver. Starvation induces the change of enzymes activity and correlates with the intensifying of the processes of lipolysis, glycogenolysis, gluconeogenesis and, especially, ketogenesis which are appreciably initiated by introduction of acetone. The starvation and introduction of acetone increases metabolism of acetanilide and brombenzene, and, increasing the formation of toxic metabolites, raise its hepato-, nephro- and pulmotoxicity. The starvation attenuates elimination of indometacin from blood plasma, but intensifies conjugation of sulfadimidine with acetic acid.

K e y w o r d s: starvation, acetone, cytochrome *P*-450, monooxygenase, conjugation of enzymes, sulfadimedine, acetanilide, toluene, brombenzene, toxicity.

1. *Miles F. K., Kamath R., Dorney S. F. et al.* // Med. J. Aust. 1999. **171**, N 9. P. 472–475.
2. *Lieber C. S.* // Physiol. Rev. 1997. **77**, N 2. P. 517–544.
3. *LeBrun M., Grenier L., Bergeron M. G. et al.* // Antimicrob. Agents Chemother. 1999. **43**, N 3. P. 520–524.
4. *Экспериментальная* витаминология / Под ред. Ю. М. Островского. Минск: Наука и техника. 1979. 550 с.
5. *Zuber R., Anzenbacherova E., Anzenbacher P.* // J. Cell. Mol. Med. 2002. **6**, N 2. P. 189–198.
6. *Качула С. А., Пентюк А. А., Тертышная Е. В. и др.* // Соврем. пробл. токсикол. 2002. № 2. С. 40–44.
7. *Habig W. H., Jacobi W. B.* // Meth. Enzymol. 1981. **77**. P. 398–405.
8. *Асатиани В. С.* Биохимическая фотометрия. М.: Изд-во АН СССР.1957. 836 с.
9. *Лабораторные* методы исследования в клинике. Справочник / Под ред. В. В. Меньшикова. М.: Медицина. 1987. 368 с.
10. *Коренман И. М.* Методы определения органических соединений. М.:Химия. 1975. 360 с.
11. *Estrada-Rodgers L., Levy G. N., Weber W. W.* // Drug Metab. Dispos. 1998. **26**, N 5. P. 502–505.
12. *Пентюк А. А., Луцюк Н. Б., Гуцол В. И. и др.* // Вопросы мед. химии. Депонировано в ВИНИТИ. 1990. № 3165-В90. 11 с.
13. *Liu G., Gelboi H., Myers M.* // Arch. Biochem. and Biophys. 1991. **284**, N 2. P. 400–406.
14. *Bessems J. G., Vermeulen N. P.* // Crit. Rev. Toxicol. 2001. **31**, N 1. P. 55–138.
15. *Pierce C. H., Chen Y., Dills R. L. et al.* // Toxicol Lett. 2002. **24**, N 129. P. 65–76.
16. *Gelboin H. V., Goldfarb I., Krausz K. W.* // Chem. Res. Toxicol. 1996. **9**, N 6. P. 1023–1030.
17. *Ogata M., Shimada Y., Kamiya H. et al.* // Int. Health. 1981. **19**, N 3. P. 155–161.
18. *Nakajima M., Inoue T., Shimada N. et al.* // Drug Metab. Dispos. 1998. **26**, N 3. P. 261–266.
19. *Henderson P. T., van Doorn R., Leijdekkers C. M.* // IARC. Sci. Publ. 1984. **59**. P. 173–187.
20. *Price V. F. Jollow D. J.* // Biochem. Pharmacol. 1988. **37**, N 6. P. 1067–1075.
21. *Lau S. S., Monks T. J.* // Life Sci. 1988. **42**, N 13. P. 1259–1269.
22. *Пентюк О. О., Андрєєв А. П., Блажієвська Г. Й. і ін.* / Ліки. 1999. № 2. С. 72–75.
23. *Bondoc F. Y., Bao Z., Hu W. Y. et al.* // Biochem. Pharmacol. 1999. **58**, N 3. P. 461–463.
24. *Giorgi M., Marini S., Longo V. et al.* // Toxicol. Appl. Pharmacol. 2000. **167**, N 3. P. 237–245.
25. *Iber H., Li-Masters T., Chen Q. J. et al.* // Pharmacol. Exp. Ther. 2001. **297**, N 1. P. 174–180.

Отримано 23.07.2003