

ВПЛИВ ПЕРЕВАНТАЖЕННЯ РАЦІОНУ ЖИРАМИ НА ЕНЗИМАТИЧНІ СИСТЕМИ МЕТАБОЛІЗМУ У ЩУРІВ

О. Х. ГЕРИЧ, О. О. ПЕНТЮК

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

Згодовування щурам протягом 4 тижнів високожирової дієти (частка жирів становила 50% енергетичної цінності раціону проти 20% у контролі) збільшує вміст цитохрому P-450 у печінці, активність анілін- та п-нітрофенолгідроксилази CYP2E1; еритроміцин-N-деметилази CYP3A; альдегіддегідрогенази класу 3, UDP-глюкуронозилтрансферази, глутатіон-S-трансферази та N-ацетилтрансферази; але помірно пригнічує індометацин-O-деметилазну активність CYP2C та фенолсульфотрансферази. Зміни в активності ферментів корелюють з активацією процесів глюконеогенезу, глікогенолізу і, особливо, кетогенезу. Високожирова дієта посилює реакції біотрансформації амідопірину, ацетаніліду, толуолу, сульфадимезину, каталізовані CYP2E1 і 3A, ферментами кон'югації та збільшує гепатотоксичність парацетамолу.

Ключові слова: високожирова дієта, ксенобіотики, цитохром P-450, ферменти кон'югації, ацетанілід, амідопірин, толуол, парацетамол, токсичність.

Широка доступність висококалорійної їжі в поєднанні з низькою фізичною активністю є основною причиною широкого розповсюдження ожиріння серед населення розвинених країн. При ожирінні триацилгліцериoli накопичуються не лише в жировій, але і в інших тканинах, що призводить до порушення метаболічних процесів, розвитку структурних змін та функціональної недостатності органів [1]. Ці механізми є основою інсулінорезистентності, цукрового діабету типу 2, стеатозу печінки та стеатогепатиту – патологічних станів, які майже завжди супроводжують ожиріння. Феномен ліпотоксичності пов'язують з перепоვნенням клітин жирними кислотами, ацетил-КоА, іншими продуктами неповного окислення жирних кислот, які не повністю метаболізуються у циклі трикарбонових кислот. За цих умов надлишок ацетил-КоА утилізується в гепатоцитах через синтез кетонових тіл з подальшим їхнім перетворенням за участю цитохрому P-450-2E1 (CYP2E1) на молочну кислоту, а надлишок жирних кислот – через посилення їхнього окислення за участю цитохромів P-450-4A3 (CYP4A3) та CYP2E1 [2, 3].

Виникає питання – в якій мірі метаболічні зміни в печінці, зумовлені ожирінням, здатні вплинути на процеси біотрансформації ксенобіотиків, адже саме в цьому органі метаболізм чужорідних речовин відбувається

найбільш активно. Комплексних досліджень впливу перевантаження жирами на процеси метаболічних перетворень ксенобіотиків, які б одночасно охоплювали ензиматичні системи окислювальної та кон'югаційної фаз метаболізму чужорідних речовин, процеси елімінації ксенобіотиків та оцінку їхньої токсичності на сьогодні немає.

Метою дослідження була оцінка впливу високожирової дієти на активність множинних форм цитохрому P-450, альдегіддегідрогенази, ензимів кон'югації з глюкуроною кислотою, сульфатом, глутатіоном та ацетил-КоА, процеси біотрансформації модельних препаратів – амідопірину, ацетаніліду, толуолу і сульфадимезину та гепатотоксичність парацетамолу.

Матеріали і методи

У роботі використано глюкозо-6-фосфат, GSH і АТФ («Reanal», Угорщина), метопролол, індометацин, еритроміцин, орфенандрін, троландоміцин, триптамін, NADPH, UDP-глюкуронова та етакринова кислоти фірми «Sigma» (США). Ацетил-КоА отримували додаванням до препарату коензиму А «фірми Ferak» розрахованої кількості оцтового ангідриду. Інші реактиви були виробництва країн СНД.

Досліди проведені на 84 білих безпородних самцях щурів з початковою масою тіла 145–185 г. Протягом чотирьох тижнів тваринам згодовували напівсинтетичний раціон,

який містив всі необхідні макро- і мікронутрієнти [4]. Раціон контрольних тварин містив (з розрахунку на 1 кг) 200 г казеїну, 650 г кукурудзяного крохмалю та 100 г жирів (50 г свинячого сала та 50 г соняшникової олії), 10 г суміші вітамінів, приготовленої на крохмалі, 30 г суміші солей і 10 г целюлози. Енергетична цінність 1 кг раціону становила 4740 ккал (внесок білків, вуглеводів та жирів, відповідно 24, 56 та 20%). 1 кг корму заварювався 2,5 літрами води за повільного нагрівання, його згодовували тваринам без обмежень. Високожирову дієту створювали шляхом збільшення частки жирів до 50% загального калоражу і зменшення частки вуглеводів до 26% [5]. Раціон включав суміш вітамінів і солей, целюлозу, 200 г казеїну, 300 г крохмалю та 250 г жиру (125 г свинячого сала та 125 г соняшникової олії). Оскільки маса цього раціону була меншою від контрольного раціону на 200 г, то для його заварювання об'єм води збільшували з 2,5 л до 2,7. Таким чином, обидва раціони були не лише ізокалорійними, але і містили однакову кількість білків, вітамінів та мінералів.

Щурів декапітували під ефірним наркозом та отримували субклітинні фракції печінки, нирок і легень [6]. В мікросомній фракції визначали рівень цитохрому *P*-450 (КФ.1.14.14.1) та активність його ізоформ. Анілінгідроксилазну та *n*-нітрофенолгідроксилазну активність СYP2E1 визначали за утворенням, відповідно, *n*-амінофенолу та *n*-нітрокатехолу; ацетанілдігідроксилазну активність СYP1A2 – за утворенням парацетамолу. Метопролол-*O*-деметилазну (СYP2D), індометацин-*O*-деметилазну (СYP2C) та еритроміцин-*N*-деметилазну (СYP3A) активність оцінювали за утворенням формальдегіду; активність UDPглюкуронозилтрансферази (КФ 2.4.1.17) – за швидкістю кон'югації *n*-нітрофенолу; активність глюкозо-6-фосфатази (КФ 3.1.3.9) – за вивільненням неорганічного фосфату. В постмітохондріальній фракції оцінювали активність арилсульфотрансферази (КФ 2.8.2.1.) за утворенням сульфоефіру β-нафтолу; ариламін-*N*-ацетилтрансферази (КФ 2.3.1.5) – за ацетилюванням *n*-амінобензойної кислоти. Вміст глутатіону (GSH) визначали у глутатіонтрансферазній реакції. Активність глутатіон-*S*-трансферази (КФ 2.5.1.18) вивчали із субстратами: 1 – хлор-2,4-динітробензол – ХДНБ (форми α, μ, π), етакриноювою кислотою – ЕК (форма π) та нітрогліцеролом – НГ (форма μ). Вміст КоА (КоА-SH та ацетил-КоА) визначали за ацетилюванням *n*-амінобензойної кислоти. За допомогою методів, наведених у попередній роботі [6].

Визначення активності альдегіддегідрогенази класів 1 та 3 проводили спектрофотометричним методом за окисненням, відповідно, ацетальдегіду та бензальдегіду, реєструючи зміну абсорбції NAD та NADP при 340 нм [7,8]. У мікросомах печінки визначали малоновий діальдегід (продукт, що реагує з тіобарбітуровою кислотою) та СС₄-залежну пероксидацію ліпідів [9].

До мікросомної фракції додавали специфічні інгібітори цитохрому *P*-450: інгібітори СYP2B – орфенадрін (0,2 мМ), СYP1A2 та СYP2A6 – триптамін (0,05 мМ), СYP2B і 2C – хлорамфенікол (0,05 мМ), СYP2D – хінідин (10 мкМ), СYP3A – тролеандоміцин (0,025–0,1 мМ), СYP2E1 – діетилдитіокарбамат (0,1 мМ). Оскільки орфенадрін, триптамін, хлорамфенікол, тролеандоміцин та діетилдитіокарбамат мають суїцидальний механізм дії (mechanism-based), то попередньо мікросомну фракцію 10 хв інкубували з цими інгібіторами у присутності NADPH. Інші інгібітори додавали до інкубаційної суміші разом із субстратами. Посилання на концентрації інгібіторів та їхню специфічність наведено в роботі [10].

Амідопірин вводили щурам внутрішньочеревинно в дозі 12,8 мкмоль/100 г маси тварин, і в сечі, зібраній за 12 год, визначали вміст метаболітів [11]. Біотрансформацію ацетаніліду, толуолу та сульфадимезину оцінювали за екскрецією їхніх метаболітів із сечею, з використанням методів, описаних раніше [6]. Ацетанлід вводили щурам внутрішньочеревинно в дозі 100 мг/кг, і в сечі, зібраній за 12 год, визначали його метаболіти. Метаболізм толуолу оцінювали за екскрецією його метаболітів із сечею (за 12 год) після перорального введення його 50%-го розчину на соняшниковій олії в дозі 100 мг/кг. Вміст гіпурової кислоти визначали за реакцією з піридином в середовищі оцтової кислоти, а кількість крезолів – за реакцією з 4-аміноантипірином. Ацетилювання сульфадимезину оцінювали за екскрецією із сечею вільного та ацетилюваного сульфадимезину після перорального введення в дозі 100 мг/кг.

Гепатотоксичність парацетамолу оцінювали після його одноразового перорального введення щурам у дозі 3 г/кг. Частині тварин, що отримували високожирову дієту, парацетамол вводили на фоні інгібітору СYP2E1 діетилдитіокарбамату, який вводили до шлунка в дозі 200 мг/кг двічі: напередодні та в день введення парацетамолу.

У сироватці крові тварин визначали активність аланінамінотрансферази (АлАТ, КФ 2.6.1.2) та аспартатамінотрансферази (АсАТ, КФ 2.6.1.1) [12]. Вміст кетонів тіл тестували дифузійним методом із саліциловим альдегідом, глікогену – антроновим методом [6], глюкози–*o*-толуїдиновим методом, вільних жирних кислот – за утворенням мідних солей, триацилгліцеролу – за кількістю формальдегіду, що утворюється після окислення гліцеролу [12].

Результати та обговорення

Спостереження показали, що протягом чотирьох тижнів перебування на високожировій дієті щури дещо швидше набирали масу тіла (на $21,0 \pm 1,2\%$ проти $17,2 \pm 1,2\%$ в контролі відповідно). Відносна маса печінки цих щурів також виявилась дещо вищою (відповідно $3,33 \pm 0,14$ та $3,73 \pm 0,11\%$, $P < 0,05$).

У тварин дослідної групи виявлено зниження рівня глюкози у крові (на 15%) та одночасне підвищення в 1,9 та 2,8 рази вмісту вільних жирних кислот та кетонів тіл (табл. 1). У печінці зменшується на 36% вміст глікогену, але зростає вміст триацилгліцеролу (в 4,9 рази) та суми ацетил-КоА та КоА-SH (у 2,9 рази) і активність глюкозо-6-фосфатази (на 41%). Зниження вмісту глюкози та глікогену, як і активацію глюкозо-6-фосфатази, можна вважати реакцією організму на обмеження надходження вуглеводів з їжею, яка полягає в поповненні пулу глюкози внаслідок розпаду глікогену печінки та активації глюконеогенезу. Причиною гіперкетонемії, очевидно, є зростання вмісту ацетил-КоА, що утворюється під час окислення надмірної кількості жирних кислот, які надходять з раціоном, за одночасного зниження здатності циклу трикарбонів кислот утилізувати надлишок ацетил-КоА. Останнє

обумовлене зниженням у раціоні частки вуглеводів, які постачають оксалоацетат, необхідний для цитратсинтезаційної реакції. Через це у тканині накопичується надмірна кількість ацетил-КоА, з якої утворюються кетонів тіла.

Дані, наведені в табл. 2, свідчать, що перевантаження жирами зумовлює помірне зростання загального вмісту цитохрому *P*-450 на тлі значного підвищення активності, асоційованої з СYP2E1, про що свідчить значне підвищення анілінгідроксилазної та *n*-нітрофенолгідроксилазної активності в печінці тварин. Активність СYP2E1 зростає також у нирках (анілінгідроксилазна активність – до $0,39 \pm 0,017$ при $0,28 \pm 0,019$ нмоль/хв на 1 мг білка в контролі, а *n*-нітрофенолгідроксилазна – до $0,18 \pm 0,008$ при $0,12 \pm 0,010$ нмоль/хв на 1 мг білка в контролі). В легенях активність обох ензимів підвищується відповідно, до $0,22 \pm 0,011$ та $0,15 \pm 0,010$ при $0,13 \pm 0,011$ та $0,08 \pm 0,009$ нмоль/хв на 1 мг білка в контролі). Еритроміцин-*N*-деметилазна активність (маркер СYP3A) за цих умов зросла дещо менше (на 46%), а індометацин-*O*-деметилазна активність СYP2C знизилась на 22%. Ацетанілглідроксилазна та метопролол-*O*-деметилазна активності, що каталізуються СYP1A2 та СYP2D відповідно, вірогідно не змінювались.

Активність альдегіддегідрогенази класу 1, яка має тропність до низькомолекулярних альдегідів, змінювалася мало, в той час як активність ензиму класу 3 з більшою спорідненістю до альдегідів жирного та ароматичного ряду вірогідно підвищувалась на 24%. Активність UDP-глюкуронозилтрансферази та *N*-ацетилтрансферази вірогідно зростає (кожної) на 27%, а фенолсульфотрансферази на 22%. Активність досліджених форм глутатіон-*S*-трансферази (субстрати ХДНЗ, нітрогліцерол, етак-

Таблиця 1. Показники вуглеводного та ліпідного обміну у щурів, що отримували високожирову дієту ($M \pm m$, $n = 10$)

Показники	Контроль	Високожирова дієта	<i>P</i>
Глюкоза крові, ммоль/л	$5,84 \pm 0,31$	$4,98 \pm 0,22$	0,05
Вільні жирні кислоти у крові, ммоль/л	$0,53 \pm 0,05$	$1,02 \pm 0,07$	0,001
Кетонів тіла у крові, ммоль/л	$0,38 \pm 0,05$	$1,07 \pm 0,05$	0,001
Глікоген печінки, мкмоль/г	140 ± 11	90 ± 11	0,01
Триацилгліцерол, мг/г печінки	$1,61 \pm 0,09$	$7,84 \pm 0,31$	0,001
Активність глюкозо-6-фосфатази печінки, нмоль/хв на 1 мг білка	$0,41 \pm 0,02$	$0,58 \pm 0,03$	0,001
Сумарний вміст КоА, нмоль/г печінки	298 ± 19	857 ± 73	0,001

Таблиця 2. Редуктазна та монооксигеназна активність у субклітинних фракціях печінки щурів, які отримували високожирову дієту ($M \pm m$, $n = 10$)

Активність ферментів, нмоль/хв на 1 мг білка	Контроль	Високожирова дієта
<i>Монооксигеназна активність цитохрому P-450</i>		
Цитохром P-450, нмоль/мг білка	0,79 ± 0,05	0,99 ± 0,06*
Анілінгідроксилаза	0,740 ± 0,083	1,45 ± 0,10*
<i>n</i> -нітрофенолгідроксилаза	0,280 ± 0,033	0,58 ± 0,037*
Ацетанлідгідроксилаза	1,76 ± 0,12	1,90 ± 0,11
Еритроміцин- <i>N</i> -деметилаза	0,98 ± 0,09	1,43 ± 0,09*
Метопролол- <i>O</i> -деметилаза	0,83 ± 0,08	0,65 ± 0,05
Індометацин- <i>O</i> -деметилаза	0,65 ± 0,04	0,51 ± 0,03*
<i>Ферменти кон'югації та метаболізму альдегідів</i>		
Альдегіддегідрогеназа класу 1	10,3 ± 0,51	11,7 ± 0,46
Альдегіддегідрогеназа класу 3	3,94 ± 0,28	4,90 ± 0,24*
UDPглюкуронозилтрансфераза	2,80 ± 0,20	3,55 ± 0,20*
Фенолсульфотрансфераза	0,32 ± 0,02	0,25 ± 0,02*
<i>N</i> -ацетилтрансфераза	0,26 ± 0,02	0,33 ± 0,02*
Глутатіон- <i>S</i> -трансфераза (субстрат хлординітробензол)	342 ± 20	449 ± 30*
Глутатіон- <i>S</i> -трансфераза (субстрат нітрогліцерол)	29,5 ± 1,82	40,9 ± 2,10*
Глутатіон- <i>S</i> -трансфераза (субстрат етакринова кислота)	27,3 ± 1,57	34,6 ± 2,03*
Відновлений глутатіон, мкмоль/г	6,71 ± 0,34	5,52 ± 0,33*
Глутатіондисульфід, мкмоль/г	0,26 ± 0,03	0,47 ± 0,06*

Примітка. 1. Активність ізоформ цитохрому P-450 та UDPглюкуронозилтрансферази визначали в мікросомній фракції печінки, інших ензимів – у постмітохондріальній фракції. Активність *N*-ацетилтрансферази виражена в нмоль/год на 1 мг білка; 2. * дані порівняно з контролем вірогідні, $P < 0,05$

ринова кислота) збільшувалась відповідно на 31, 39 та 27%.

Перевантаження раціону жирами – субстратами пероксидації – супроводжується розвитком оксидативного стресу, про що свідчить зниження вмісту в печінці відновленого глутатіону на 18% за одночасного зростання вмісту глутатіондисульфиду (в 1,8 раза). В мікросомній фракції печінки вміст малонового діальдегіду зростає (з $6,13 \pm 0,55$ у контролі до $14,7 \pm 1,09$ нмоль/мг білка), більш ніж втричі посилюється інтенсивність CCl_4 -залежної пероксидації ліпідів – з $4,40 \pm 0,46$ до $15,6 \pm 1,41$ нмоль/хв на 1мг білка.

Кореляційний аналіз дозволив уточнити зв'язки між біохімічними показниками та ензимами метаболізму ксенобіотиків (табл. 3). Виявилось, що зміни активності ензимів, які метаболізують ксенобіотик, незначно коре-

люють із рівнем глюкози та глікогену, дещо сильнішим виявився їхній зв'язок з активністю ензиму глюконеогенезу – глюкозо-6-фосфатази. Найбільше активність ензимів корелює з рівнем кетонових тіл, вільних жирних кислот та триацилгліцеролів. При цьому між цими показниками та активністю CYP2E1 (анілін- та *n*-нітрофенолгідроксилазою), CYP3A (еритроміцин-*N*-деметилазою), альдегіддегідрогеназою класу 3, UDPглюкуронозилтрансферазою, *N*-ацетилтрансферазою та глутатіон-*S*-трансферазою виявляються прямі кореляційні зв'язки, а з активністю CYP2C (індометацин-*O*-деметилазою) та фенолсульфотрансферазою – зворотні зв'язки. Натомість рівень кетонових тіл, вільних жирних кислот та триацилгліцеролів вірогідно не асоціюється з активністю CYP1A2 та CYP2D (ацетанлідгідроксилазою та метопролол-*O*-деметилазою).

Таблиця 3. Кореляційний аналіз зв'язків між біохімічними показниками та активністю ензимів, що метаболізують ксенобіотики в печінці щурів, що отримували високожирову дієту (n = 25)

Показники	Глюкоза крові	Глікоген	Глюкозо-6-фосфатаза	Вільні жирні кислоти	Кетонові тіла	Тригліцериди
Рівень цитохрому P-450	0,22	-0,21	0,41	0,42	0,49*	0,46*
Анілінгідроксилаза	-0,35	-0,41	0,45	0,46*	0,55*	0,53*
<i>n</i> -нітрофенолгідроксилаза	-0,38	-0,41	0,46*	0,48*	0,65*	0,61*
Ацетанлідгідроксилаза	0,05	0,41	0,23	-0,36	-0,43	-0,10
Еритроміцин- <i>N</i> -деметилаза	-0,18	-0,14	0,45	0,34	0,47*	0,46*
Метопрол- <i>O</i> -деметилаза	0,21	0,21	-0,15	-0,36	-0,33	-0,17
Індометацин- <i>O</i> -деметилаза	0,34	0,38	-0,42	-0,49*	-0,55*	-0,23
Альдегіддегідрогеназа класу 1	-0,33	-0,23	0,38	0,42	0,42	0,11
Альдегіддегідрогеназа класу 3	-0,45	-0,14	0,29	0,46*	0,52*	0,25
UDPглюкуронозил-трансфераза	-0,35	-0,15	0,45	0,46*	0,47*	0,49*
Фенолсульфотрансфераза	0,38	0,26	-0,45	-0,48*	-0,57*	-0,36
<i>N</i> -ацетилтрансфераза	-0,16	-0,18	0,46*	0,46*	0,56*	0,54*
Глутатіон- <i>S</i> -трансфераза (субстрат хлординітробензол)	-0,12	-0,05	0,43	0,45	0,53*	0,37
Глутатіон- <i>S</i> -трансфераза (субстрат нітрогліцерол)	-0,18	-0,26	0,48*	0,51*	0,61*	0,57*
Глутатіон- <i>S</i> -трансфераза (субстрат етакринова кислота)	-0,17	-0,13	0,44	0,42	0,58*	0,46*

* Коефіцієнти кореляції статистично вірогідні

Вищенаведені дані свідчать, що надмірне надходження жирів до організму щурів зумовлює значні зміни активності ензимів метаболізму ксенобіотиків – активацією CYP2E1 та 3A, ензимів кон'югації із глюкуроною кислотою, глутатіоном і ацетил-КоА на тлі одночасного пригнічення активності CYP2C і фенолсульфотрансферази.

Відомо, що множинні форми цитохрому P-450 мають відносно невисоку субстратну специфічність і нерідко той самий ксенобіотик метаболізується різними його ізоформами. Через це виникає питання, чи є приріст анілін- та нітрофенолгідроксилазної активності наслідком індукції CYP2E1, а приріст еритроміцин-*N*-деметилазної активності – індукції CYP3A. Одержані дані (табл. 4) свідчать про позитивну відповідь на це питання. Саме інгібітору CYP2E1 діетилдитіокарбамат притаманна най-

більша гальмувальна дія на активність анілін- та нітрофенолгідроксилази, а тролеандоміцин (інгібітор CYP3A) стосовно еритроміцин-*N*-деметилазної активності. Таким чином, у разі посиленого надходження жирів до організму щурів посилюється активність цих ізоформ цитохрому P-450.

Виникає також питання, чи є достатніми зміни активності ферментів в печінці для виникнення порушень процесів біотрансформації ксенобіотиків в цілісному організмі. Ми дослідили вплив високожирової дієти на біотрансформацію модельних ксенобіотиків (табл. 5). Встановлено, що через 2 тижні від початку згодовування високожирової дієти виникають вірогідні зміни метаболізму тест-препаратів і виразність цих змін поглиблюється на 4-у тижні.

Таблиця 4. Вплив інгібіторів ізоформ цитохрому P-450 на анілінгідроксилазну, *n*-нітрофенолгідроксилазну та еритроміцин-*N*-деметилазну активність мікросомної фракції печінки щурів, які отримували високожирову дієту ($M \pm m$, $n = 6$)

Ензими	Анілінгідроксилаза, нмоль/хв на 1 мг білка		<i>n</i> -нітрофенол-гідроксилаза, нмоль/хв на 1 мг білка		Еритроміцин- <i>N</i> -деметилаза, нмоль/хв на 1 мг білка	
	Інтакtnі тварини	На високо- жировій дієті	Інтакtnі тварин	На високо- жировій дієті	Інтакtnі тварини	На високо- жировій дієті
Активність ензимів без інгібіторів (контроль)	0,83 ± 0,05	1,61 ± 0,08	0,28 ± 0,02	0,74 ± 0,05	0,94 ± 0,08	1,43 ± 0,05
Інгібітори:	у % до активності без інгібіторів					
Орфенадрін, 0,2 мМ	94,30 ± 0,68	89,00 ± 2,06*	92,90 ± 2,18	82,80 ± 2,36*	90,10 ± 2,44	85,50 ± 2,89
Триптамін, 0,05 мМ	96,60 ± 1,52	92,70 ± 1,53	91,30 ± 2,28	88,20 ± 2,31	89,50 ± 1,85	84,50 ± 3,22
Хлорамфенікол, 0,05 мМ	89,70 ± 2,23	70,30 ± 2,53*	88,00 ± 1,68	75,40 ± 2,91*	87,90 ± 2,75	80,40 ± 3,18
Хінідин, 10 мкМ	90,30 ± 1,98	89,6 ± 2,3	90,50 ± 3,34	88,80 ± 2,56	91,40 ± 3,11	85,00 ± 3,03
Тролеандоміцин, 0,1 мМ	87,00 ± 2,03	72,40 ± 2,26*	86,40 ± 2,28	69,40 ± 2,53*	46,60 ± 2,48	36,90 ± 2,61*
Діетилдітіокарбамаг, 0,1 мМ	29,20 ± 1,62	14,10 ± 1,26*	25,10 ± 1,89	14,80 ± 1,11*	86,00 ± 2,93	82,20 ± 3,08

Примітка: активність ферментів у пробах без інгібіторів прийнято за 100%; * відмінності вірогідні

Відомо, що основним шляхом метаболізму амідопіріну є реакція *N*-деметилування, яка веде до утворення 4-аміноантипірину і каталізується ензимами підродин СYP4503A та СYP4502С, а ариламін-*N*-ацетилтрансфераза забезпечує приєднання оцтової кислоти до 4-аміноантипірину з утворенням *N*-ацетил-4-аміноантипірину [13, 14]. Сульфадимезин кон'югується з оцтовою кислотою за участю *N*-ацетилтрансферази (ізоформа NAT-2) [6]. У щурів з цукровим діабетом посилюється реакція деметилування амідопіріну до 4-аміноантипірину і кон'югація останнього з ацетил-КоА. Стимулюються процеси ацетилювання сульфадимезину за участю *N*-ацетилтрансферази, внаслідок чого підвищується екскреція з сечею ацетилсульфадимезину.

Гідроксилювання ацетаніліду до парацетамолу здійснюється СYP1A2, а утворений парацетамол далі кон'югується з глюкуроною кислотою та сульфатом за участю UDPглюкуронозилтрансферази та фенолсульфотрансферази. *N*-ацетил-*n*-бензохінонімін детоксикується через кон'югацію з глутатіоном за участю глутатіон-*S*-трансфераз. Подальший метаболізм глутатіонового кон'югату завершується формуванням меркаптурових кислот. Парацетамол також окислюється до токсичного метаболіту *N*-ацетил-*n*-бензохіноніміну за участю СYP2E1[6]. У дослідних щурів стрімко зростає екскреція меркаптурових кислот (це свідчить про посилене утворення реакційноздатного метаболіту *N*-ацетил-*n*-бензохіноніміну), але лише помірно зростає швидкість перетворення ацетаніліду на амінофенольні метаболіти та кон'югація останніх із глюкуроною кислотою. Натомість пригнічується утворення сульфатних метаболітів.

У разі високожирової дієти порушується і метаболізм толуолу. Головним шляхом його метаболізму є гідроксилювання за метильною групою з утворенням бензилового спирту, який після окислення до бензойної кислоти і кон'югації останньої із гліцином екскретується у вигляді гіпурової кислоти. Невелика частина толуолу окислюється за ароматичним ядром з утворенням *o*-, *m*- і *n*-крезолів. Головна роль в метилгідроксилюванні толуолу належить СYP2E1, а в ароматичному гідроксилюванні – СYP2С [6]. У дослідних щурів значно зростає екскреція гіпурової кислоти (утворення якої започатковується реакцією метилгідроксилювання, а завершується реакцією кон'югації з гліцином), за одночасного пригнічення утворення крезольних метаболітів (продуктів ароматичного гідроксилювання толуолу).

Таблиця 5. Вплив високожирової дієти на екскрецію метаболітів амідопіріну та сульфадимезину із сечею щурів ($M \pm m, n = 10$)

Метаболіти в сечі за 12 год, мкмоль/100 г маси щурів	Контроль	Високожирова дієта	
		Через 2 тижні	Через 4 тижні
<i>Амідопірін (12,8 мкмоль/100 г маси тіла)</i>			
Вільний 4-аміноантипірін	1,07 ± 0,04	0,94 ± 0,02*	0,87 ± 0,03*
Ацетильований 4-аміноантипірін	3,64 ± 0,18	4,37 ± 0,19*	5,00 ± 0,14*
Загальний 4-аміноантипірін	4,71 ± 0,16	5,30 ± 0,18*	5,87 ± 0,14*
Ацетильований 4-аміноантипірін, % до загального	77,00 ± 1,35	82,00 ± 0,99*	85,20 ± 0,66*
<i>Ацетанілід (74 мкмоль/100 г маси тіла)</i>			
Всі метаболіти ацетаніліду	57,2 ± 1,38	59,0 ± 1,24	61,30 ± 1,17*
Всі амінофеноли	40,6 ± 1,41	43,4 ± 1,2	46,50 ± 1,53*
Сума ацетаніліду та аніліну	16,5 ± 0,6	15,50 ± 0,95	14,90 ± 0,82
Анілін	8,13 ± 0,40	8,85 ± 0,38	9,19 ± 0,30
Глюкуроніди амінофенолів	21,90 ± 0,92	25,70 ± 0,51*	29,60 ± 0,77*
Сульфати амінофенолів	15,40 ± 1,13	13,10 ± 0,53	11,90 ± 0,56*
Меркаптурові кислоти	1,42 ± 0,21	3,35 ± 0,22*	4,68 ± 0,25*
<i>Толуол (109 мкмоль/100 г маси тіла)</i>			
Всі метаболіти	54,8 ± 2,60	68,1 ± 4,67*	72,1 ± 1,81*
Гіпурова кислота	54,2 ± 2,57	67,5 ± 4,64*	71,6 ± 1,81*
Крезолі	0,69 ± 0,04	0,62 ± 0,03	0,51 ± 0,03*
<i>Сульфадимезин (36 мкмоль/100 г маси тіла)</i>			
Вільний сульфадимезин	5,54 ± 0,54	5,72 ± 0,40	6,11 ± 0,42
Ацетильований сульфадимезин	4,38 ± 0,60	6,06 ± 0,43*	6,76 ± 0,41*
Загальний сульфадимезин	9,92 ± 1,01	11,8 ± 0,77	12,9 ± 0,77*

Примітка: * відмінності вірогідні щодо групи "контроль"

Для тестування того, якою мірою зміни в біотрансформації ксенобіотиків здатні вплинути на їхню токсичність, ми обрали популярний лікарський засіб парацетамол, який частіше є причиною токсичних гепатитів у людей. Виявилось, що згодовування тваринам високожирового раціону посилює гепатотоксичність парацетамолу, про що свідчать значні зміни активності трансаміназ, вмісту відновленого глутатіону та глікогену в печінці дослідних тварин (табл. 6). Підвищення за цих умов токсичності парацетамолу обумовлено індукцією CYP2E1, оскільки застосування інгібітора цього ферменту діетилдитіокарбамату значно зменшує токсичну дію парацетамолу.

Таким чином, одержані нами дані не залишають сумнівів у тому, що перевантаження раціону жирами спричинює значну перебудову системи метаболізму чужорідних речовин. Змінюються співвідношення між множинними формами цитохрому P-450, зокрема істотно

посилюється активність CYP2E1 і помірно активується CYP3A за одночасного зниження активності CYP2C і відсутності вірогідних змін з боку CYP2D та CYP1A2. Біологічна доцільність посилення активності CYP2E1 у разі надходження до організму надмірної кількості жирів є цілком зрозумілою, адже таким чином вирішується проблема утилізації надлишку вільних жирних кислот та кетонів тіл. Ацетон і жирні кислоти є природними субстратами цього ензиму [2]. Активація альдегіддегідрогенази також має компенсаторне значення, адже за її участю утилізуються токсичні альдегіди, що утворюються у процесі неферментативної пероксидації жирних кислот чи окислення їх за участю множинних форм цитохрому P-450 [15, 16].

Системним наслідком змін в експресії ізоформ цитохрому P-450 є значне посилення каталізованих CYP2E1 реакцій біотрансформації ацетаніліду та толуолу, про що свідчить

Таблиця 6. Вплив високожирової дієти та діетилдитіокарбамату на гепатотоксичність парацетамолу ($M \pm m$, $n = 8-9$)

Групи тварин	Сироватка крові		Печінка	
	АлАТ, мкмоль/год на 1 мл	АсАТ, мкмоль/год на 1 мл	Відновлений глутатіон, мкмоль/г	Глікоген, мкмоль/г
Контроль	0,47 ± 0,10	0,54 ± 0,11	7,39 ± 0,35	172,0 ± 21,9
Парацетамол	2,58 ± 0,16	3,23 ± 0,25	2,51 ± 0,29	82,9 ± 11,2
Високожирова дієта + парацетамол	3,83 ± 0,28*	4,45 ± 0,45*	1,32 ± 0,12*	40,0 ± 7,5*
Високожирова дієта + парацетамол + діетилдитіокарбамат	0,99 ± 0,10*	1,23 ± 0,12*	4,70 ± 0,27*	112,0 ± 8,4*

Примітка: * відмінності вірогідні щодо групи "парацетамол"

збільшення екскреції із сечею меркаптурових кислот та гіпурової кислоти. Однак активація СУР2Е1 спряжена з підвищенням ризику токсичних уражень, оскільки більшість ксенобіотичних субстратів ензиму метаболізуються з утворенням токсичних метаболітів [2]. Це підтверджується виявленням нами зростанням токсичності парацетамолу у тварин, що отримували високожирову дієту та зменшенням гепатотоксичності парацетамолу у разі застосування інгібітора СУР2Е1 діетилдитіокарбамату. Відомо, що парацетамол саме за участю СУР2Е1 метаболізується до токсичного *N*-ацетил-*n*-бензохіноніміну, що і є причиною некрозів печінки. Парацетамол – це не єдиний ксенобіотик, токсичність якого зростає у разі перевантаження раціону жирами. Зокрема показано, що під час збільшення в раціоні жирів, зростає токсичність тетрахлорметану, який також є субстратом СУР2Е1 [17].

Торкаючись безпосередніх механізмів індукції *P*-4502Е1, швидше всього індукцію СУР2Е1 слід пояснити посиленням утворенням кетонів тіл, зокрема ацетону – одного з потужних індукторів цитохрому *P*-4502Е1, який спричинює субстратну стабілізацію ензиму та індукує синтез його молекул на транскрипційному рівні [2]. Про провідну роль гіперкетонемії в активації цитохрому *P*-4502Е1 свідчать також і тісні кореляційні зв'язки між активністю цитохрому *P*-4502Е1 та рівнем кетонів тіл.

Посилення активності СУР3А у разі перевантаження організму жирами підтверджується не лише зростанням його еритроміцин-*N*-деметилазної активності в мікосомях печінки, але і підвищеною екскрецією з сечею

тварин продукту *N*-деметилування амідопірину – 4-аміноантипірину. Активація СУР3А, ймовірно, зумовлюється посиленням продукції глюкокортикоїдів, які є потужними індукторами як ферментів глюконеогенезу, так і СУР3А. Відомо, що перевантаження раціону жирами супроводжується активацією продукції глюкокортикоїдів та глюкагону, які забезпечують підтримання достатнього рівня глюкози внаслідок активації глюконеогенезу та глікогенолізу [18,19]. Зрештою причиною підвищення експресії СУР3А може бути й гіперкетонемія, оскільки введення щурам ацетону здатне спричинити зростання активності СУР3А [6].

Ознакою пригнічення активності СУР2С є не лише падіння активності індометацин-*O*-деметилази в мікосомях печінки, але і зменшення частки крезольних метаболітів толуолу, утворення яких, як відомо, каталізується СУР2С. Безпосередньою причиною цього гальмування, вірогідно, є підвищення продукції глюкагону, який, крім стимуляції продукції глюкози, здатен гальмувати експресію СУР2С [20]. Посилення продукції глюкагону є типовою реакцією організму на перевантаження жирами [19].

Індуковані надлишком жирів зміни в системі біотрансформації стосуються і ензимів кон'югації. Виявлено посилення здатності організму щурів до кон'югації ксенобіотиків із глюкуроною кислотою, глутатіоном та ацетил-КоА у разі ослаблення реакцій кон'югації із сульфатом. Інтенсифікація реакцій глюкуронізації, очевидно, має компенсаторне підґрунтя, адже вільні жирні кислоти є субстратами більшості множинних форм UDPглюкуронозилтрансферази [21]. Однак ми не маємо за-

довільного пояснення причин зниження активності процесів кон'югації ксенобіотиків із сульфатом.

Посилення кон'югації ксенобіотиків з ацетил-КоА виявляється не лише зростанням активності *N*-ацетилтрансферази в печінці, але і збільшенням елімінації ацетильованих метаболітів амідопіріну та сульфадимезину із сечею. На наш погляд, причиною активації процесів ацетилування ксенобіотиків є підвищення доступності ацетил-КоА. У разі перевантаження жирами, коли виникають проблеми з утилізацією надлишку ацетил-КоА в циклі трикарбонових кислот, його витрата у процесах кон'югації ксенобіотиків стає таким самим способом усунення надлишку ацетил-КоА, як і утворення кетонів тіл.

Фізіологічна доцільність активації множинних форм глутатіон-*S*-трансфераз, ймовірно, пов'язана з ліквідацією наслідків оксидативного стресу, адже продукти пероксидації ліпідів – гідропероксиди та епоксиди жирних кислот – є природними субстратами цих ензимів [22].

Таким чином, одержані нами дані підтверджують думку, що збільшення в раціоні квоти жирів (до 50% енергетичної цінності раціону) на тлі одночасного зниження частки вуглеводів зумовлює акумуляцію триацилгліцеролів у печінці, істотне зростання вмісту кетонів тіл та вільних жирних кислот у плазмі крові, помірне зниження вмісту глюкози у крові, глікогену в печінці та підвищення активності глюкозо-6-фосфатази. Високожирова дієта зумовлює зміну профілю експресії множинних форм цитохрому *P*-450 та ензимів-кон'югантів у бік підвищення активності СУР2Е1 та СУР3А, *N*-ацетилтрансферази, UDPглюкуронозилтрансферази та глутатіонтрансфераз та пригнічення активності СУР2С і фенолсульфотрансферази.

Перевантаження раціону шурів жирами змінює нормальні співвідношення між шляхами детоксикації та токсифікації ксенобіотиків і сприяє посиленню токсичності ксенобіотиків, які метаболізуються за участю цитохрому СУР2Е1 до токсичних метаболітів (як це нами доведено на прикладі парацетамолу) та прискорює елімінацію ксенобіотиків, що детоксуються через кон'югацію з ацетил-КоА, глюкуроною кислотою та глутатіоном.

ВЛИЯНИЕ ПЕРЕГРУЗКИ РАЦИОНА ЖИРАМИ НА ЭНЗИМАТИЧЕСКИЕ СИСТЕМЫ МЕТАБОЛИЗМА У КРЫС

Е. Ф. Герич, А. А. Пентюк

Винницкий национальный медицинский университет им. Н. И. Пирогова, Украина;
e-mail: sansei@vsmu.vinnica.ua

Скармливание крысам в течение 4 недель высокожировой диеты (доля жиров составляла 50% энергетической ценности рациона против 20% в контроле) увеличивает содержание цитохрома *P*-450 в печени; усиливает активность анилин- и *p*-нитрофенолгидроксилазы СУР2Е1; эритромицин-*N*-деметилазы СУР3А; активность альдегиддегидрогеназы класса 3, UDPглюкуронозилтрансферазы, глутатион-*S*-трансферазы и *N*-ацетилтрансферазы; но вызывает умеренное угнетение активности индометацин-*O*-деметилазы СУР2С и сульфотрансферазы. Изменения активности энзимов коррелируют с активацией процессов глюконеогенеза, гликогенолиза и, особенно, кетогенеза. Высокожировая диета усиливает реакции биотрансформации амидопирина, ацетанилида, толуола, сульфадимезина, катализируемые СУР2Е1 и 3А, энзимами кон'югации; увеличивает гепатотоксичность парацетамолу.

Ключевые слова: высокожировая диета, ксенобиотики, цитохром *P*-450, энзимы кон'югации, ацетанилид, амидопирин, толуол, парацетамол, токсичность.

INFLUENCE OF RATION OVERLOAD BY FATS ON THE ENZYMIC SYSTEMS OF METABOLISM IN RATS

E. F. Gerych, A. A. Pentyuk

Pirohov National Medical University,
Vinnitsa, Ukraine;
e-mail: sansei@vsmu.vinnica.ua

Summary

The feeding of rats with high-fat diet (a part of fats was 50% of energy value of ration against 20% in control) during 4 weeks increased the level of cytochrome *P*-450 in the liver and enhanced aniline- and *p*-nitrophenol hydroxylase activity of

CYP2E1 as well as erythromycin *N*-demethylase activity of CYP3A; the activity of aldehyde dehydrogenase class 3, UDP-glucuronosyl transferase, glutathione-*S*-transferase and *N*-acetyl transferase. At the same time, the moderate decrease of indomethacin-*O*-demethylase of CYP2C both phenolsulfotransferase activity were fixed. The changes of enzymatic activity correlated with activating of processes of gluconeogenesis, glycogenolysis and, especially, ketogenesis. A high-fat diet enhanced reactions of biotransformation of amidopyrine, acetanilide, toluene, sulfadimezine, were catalyzed with CYP2E1, CYP3A and enzymes of conjugation, simultaneously it increased the hepatotoxicity of paracetamol.

Key words: high-fat diet, xenobiotics, cytochrome of *P*-450, enzymes of conjugation, acetanilide, amidopyrine, toluene, paracetamol, toxicity.

1. *Slawik M., Vidal-Puig A. J.* // Ageing Res. Rev. – 2006. – **5**, N 2. – P. 144–64.
2. *Пентюк О. О., Качула С. О., Герич О. Х.* // Укр. біохім. журн. – 2004. – **76**, № 5. – С. 16–28.
3. *Su G. M., Fiala-Beer E., Weber J. et al.* // Biochem. Pharmacol. – 2005. – **69**, N 4. – P. 709–17.
4. *Экспериментальная витаминология* / Под ред. Ю. М. Островского. – Минск: Наука и техника, 1979. – 550 с.
5. *Wilkes J. J., Vonen A., Bell R. C.* // Am. J. Physiol. – 1998. – **275**, N 4 – P. 679–86.
6. *Качула С. О., Пентюк О. О.* // Укр. біохім. журн. – 2004. – **76**, № 1. – С. 114–122.
7. *Bunting K. D., Lindahl R., Townsend A. J.* // J. Biol. Chem. – 1994. – **269**, N 37. – P. 23197–203.
8. *Dockham P. A., Sreerama L., Sladek N. E.* // Drug Metab. Dispos. – 1997. – **25**, N 12. – P. 1436–41.
9. *Костюк В. А.* // Биохимия. – 1991. – **56**, вып. 1. – С. 109–114.
10. *Качула С. О., Герич О. Х., Пентюк О. О.* // Мед. хімія. – 2004. – **6**, № 1. – С. 14–19.
11. *Попов Т. А., Леоненко О. Б.* // Гигиена и санитария. – 1977. – № 9. – С. 23–26.
12. *Лабораторные методы исследования в клинике* / Под ред. В. В. Меньшикова. – М.: Медицина, 1987. – 368 с.
13. *Agundez J. A., Martinez C., Benitez J.* // Xenobiotica. – 1995. – **25**, N 4. – P. 417–427.
14. *Ramana K. V., Kohli K. K.* // Mol. Cell. Biochem. – 1999. – **198**, N 1–2. – P. 79–88.
15. *Demozay D., Rocchi S., Mas J. C. et al.* // J. Biol. Chem. – 2004. – **279**, N 8 – P. 6261–6270.
16. *He X., Cryle M. J., De Voss J. J. et al.* // Ibid. – 2005. – **280**, N 24. – P. 22697–22705.
17. *Sawant S. P., Dnyanmote A. V., Shankar K. et al.* // J. Pharmacol. Exp. Ther. – 2004. – **308**, N 2. – P. 694–704.
18. *Tannenbaum B. M., Brindley D. N., Tannenbaum G. S. et al.* // Am. J. Physiol. – 1997. – **273**, N 6, Pt 1. – P. 1168–1177.
19. *Wu Y. H., Li X. J., Li H. L. et al.* // Zhonghua Yi Xue Za Zhi. – 2005. – **85**, N 27. – P. 1907–1910.
20. *Iber H., Li-Masters T., Chen Q. et al.* // J. Pharmacol. Exp. Ther. – 2001. – **297**, N 1. – P. 174–180.
21. *Little J. M., Williams L., Xu J. et al.* // Drug Metab. Dispos. – 2002. – **30**, N 5. – P. 531–533.
22. *Gallagher E. P., Gardner J. L., Barber D. S.* // Biochem. Pharmacol. – 2006. – **71**, N 11. – P. 1619–1628.

Отримано 19.10.2007