

## АФК-ГЕНЕРУЮЧА ТА АНТИОКСИДАНТНА СИСТЕМИ ПЕЧІНКИ ЩУРІВ ЗА ДІЇ ПРЕДНІЗОЛОНУ І ВІТАМІНУ D<sub>3</sub>

І. О. ШИМАНСЬКИЙ, А. В. ХОМЕНКО, О. О. ЛІСАКОВСЬКА,  
Д. О. ЛАБУДЗИНСЬКИЙ, Л. І. АПУХОВСЬКА, М. М. ВЕЛИКИЙ

Інститут біохімії ім. О. В. Палладіна НАН України, Київ;  
e-mail: ishyansk@inbox.ru

Механізм індукованих глюкокортикоїдними гормонами порушень функції печінки за участю процесів вільнорадикального окислення біологічних молекул та їх регулювання вітаміном D<sub>3</sub> на сьогодні залишається недостатньо з'ясованим. Дослідження присвячено вивченню особливостей окисного метаболізму в печінці щурів і функціонального стану гепатоцитів за тривалого введення синтетичного глюкокортикоїду преднізолону та дії вітаміну D<sub>3</sub>. Показано, що введення преднізолону в дозі 0,5 мг упродовж 30 діб призводить до зростання частки некротичних клітин серед ізольованих гепатоцитів. Індуковані глюкокортикоїдом порушення функції гепатоцитів супроводжуються посиленням генерування активних форм кисню (АФК), окисного пошкодження протеїнів (за вмістом карбонільних груп), накопиченням ТБК-активних продуктів ліпопероксидації та зниженням рівня вільних SH-груп низькомолекулярних сполук у печінці. Продемонстровано зниження активності ключових ензимів системи антиоксидантного захисту (СОД, каталази, глутатіонпероксидази), в той час як активність прооксидантних ензимів NAD(P)H-хінон-оксидоредуктази та семікарбазидчутливої аміноксидази зростає. Введення вітаміну D<sub>3</sub> в дозі 100 МО (особливо в поєднанні з  $\alpha$ -токоферолом) на фоні глюкокортикоїдної терапії сприяє зниженню рівня утворення АФК та окисного ушкодження біомолекул, нормалізує стан системи антиоксидантного захисту в печінці та підвищує виживання гепатоцитів. Одержані дані свідчать про важливу роль вітаміну D<sub>3</sub> в регулюванні окисного метаболізму за дії преднізолону.

**Ключові слова:** 25OHD<sub>3</sub>, преднізолон, активні форми кисню, пероксидне окислення біомолекул, про- і антиоксидантні ензими.

Глюкокортикоїди – високоефективні протизапальні та імунодепресантні засоби – широко застосовуються в медичній практиці [1]. Хоча протизапальна дія глюкокортикоїдів є добре вивченою, дані щодо можливого порушення функції печінки за хронічного введення цих гормонів є достатньо суперечливими. Так, глюкокортикоїди, знижуючи утворення імунних комплексів, виявляють виражену протизапальну дію та анаболічний вплив на печінку, однак імуносупресорні ефекти кортикостероїдів можуть супроводжуватись гепатотоксичністю [1–3]. Зокрема, поряд із загальновідомими ускладненнями, спричиненими призначенням глюкокортикоїдів, такими як дистрофія надниркових залоз, інсулінорезистентність, атрофія м'язів та остеопороз, у хворих на хронічні захворювання печінки відмічається розвиток жи-

рового гепатозу, зростає ймовірність тромбозів варикознозмінених судин системи портальної вени, а також можливі тяжкі геморагічні некрози паренхіми печінки [4]. Виявлено, крім того, що в пацієнтів після застосування високих доз глюкокортикоїдних препаратів, зокрема метилпреднізолону, для лікування захворювань, за яких відбувається демієлінізація, спостерігалось посилене вивільнення ензимів печінки в сироватку крові, характерне для розвитку гострого гепатиту [5, 6]. Ушкодження печінки внаслідок розвитку холестазу та жовчнокам'яної хвороби також можуть бути результатом побічної дії глюкокортикоїдів [7].

Оксидативний стрес, обумовлений посиленням генерування активних форм кисню (АФК) та зниженням ефективності системи антиоксидантного захисту, вважається одним з універсальних механізмів виникнення деструктивних змін у

різних тканинах та органах [8]. Індуковані АФК ушкодження на клітинному рівні за патології печінки та дії гепатотоксикантів включають порушення функціонування мітохондрій і апоптоз клітин, посилення накопичення ліпідів і катаболізму протеїнів, запальні реакції в тканині із залученням про- та антизапальних цитокінів, модулювання імунної відповіді, формування фіброзу і цирозу печінки [9]. Можливість залучення прооксидантного компонента в розвиток гепатотоксичності, пов'язаної саме із систематичним надходженням глюкокортикоїдів, на сьогодні залишається дискусійним питанням.

Крім загальновідомої участі вітаміну  $D_3$  в регулюванні метаболізму кальцію, фосфору та пов'язаної з цими ефектами ролі холекальциферолу в процесах ремоделювання кісткової тканини, також відомо, що вітамін  $D_3$  виявляє імуномодуляторну, протизапальну, антипроліферативну дію та здатен попереджувати пухлинну трансформацію клітин [10]. Молекулярні механізми, які забезпечують цитопротекторні властивості вітаміну  $D_3$  можуть реалізовуватись як через геномну регуляцію, механізм якої здебільшого відповідає дії стероїдних гормонів, так і через негеномні ефекти, включаючи регуляторний вплив його на експресію сигнальних протеїнів, клітинний метаболізм, запальні процеси та оксидативний стрес [11–13]. На сьогодні в дослідженнях, присвячених вивченню ефектів вітаміну  $D_3$  в клітинах як біологічного антиоксиданту, механізм його дії розглядається в контексті структурної подібності з холестеролом і ергостеролом, а відтак пов'язується зі спроможністю холекальциферолу безпосередньо модифікувати фізико-хімічний стан біологічних мембран [14]. Класичним природним неензимним антиоксидантом є вітамін Е ( $\alpha$ -токоферол), який локалізується в клітинних мембранах та захищає їх від пероксидного окислення ліпідів (ПОЛ), а також безпосередньо взаємодіє з вільними радикалами [15].

Метою роботи було з'ясування ролі вітаміну  $D_3$ , а також його поєданого застосування з вітаміном Е в регуляції інтенсивності утворення АФК, процесів окисної модифікації біомолекул, стану ензимної системи антиоксидантного захисту (АОЗ) печінки щурів та виживання гепатоцитів за тривалого застосування глюкокортикоїду преднізолону.

## Матеріали і методи

Дослідження проводили на щурах-самцях лінії Wistar масою  $100 \pm 5$  г. Щурів, яких утримували на дієті віварію, було розділено на групи: 1 – контроль; 2 – тварини, яким щодоби вводили преднізолон по 0,5 мг протягом 30 діб за допомогою зонда у вигляді водної суспензії; 3 – тварини, яким вводили вітамін  $D_3$  (100 МО, *per os*) на фоні дії преднізолону; 4 – тварини, яким вводили вітамін  $D_3$  (100 МО, *per os*) та вітамін Е (5 мг/кг маси тіла, *per os*) на фоні дії преднізолону. Усі маніпуляції із тваринами проводили під легким ефірним наркозом та без порушень норм гуманного поводження з лабораторними тваринами у відповідності до «Загальних етичних принципів проведення експериментів на тваринах» (Україна, 2001 р.).

Гепатоцити ізолювали після перфузії печінки фізіологічним розчином через портальну вену. Промиту печінку подрібнювали на тонкі фрагменти, які інкубували з колагеназою при  $37^\circ\text{C}$  упродовж години з подальшим відмиванням фосфатно-сольовим буфером, що містив 0,146 М NaCl та (мМ): 5,4 KCl; 0,8  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ; 2  $\text{CaCl}_2$ ; 0,7  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ ; 0,7  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 1% альбуміну, рН 7,4 [16]. Чистоту фракції гепатоцитів визначали цитохімічним методом після їх фарбування гематоксиліном Бомера. Кількість клітин підраховували в камері Горяєва.

Вміст 25-гідрокси вітаміну  $D_3$  ( $25\text{OHD}_3$ ) в сироватці крові визначали методом імуноензимного аналізу (набір 25-Hydroxy Vitamin  $D_3$  EIA, IDS, США).

Флуоресцентне визначення вмісту АФК та азоту проводили з DCFH-DA (2',7'-дихлордигідрофлуоресцеїн діацетатом) [17]. До 100 мкл суспензії ізолюваних гепатоцитів щурів ( $0,5 \cdot 10^6$  клітин) додавали 1 мкл розчину DCFH-DA (2,5 мМ) та інкубували 15 хв при  $37^\circ\text{C}$  в темряві. Проби центрифугували при 1,5 тис. об./хв 10 хв та промивали 2 рази фосфатним буферним розчином (PBS, рН = 7,4). Остаточний осад гепатоцитів ресуспендували у 0,5 мл PBS. Одразу після приготування проби аналізували на протоковому цитофлуориметрі COULTER® EPICSTM XLTM. Флуоресценцію окисленої форми DCFH-DA – DCF (2',7'-дихлорфлуоресцеїн діацетату) вимірювали при  $\lambda_{36} = 488$  та  $\lambda_{\text{ем}} = 540$  нм.

Оцінку загибелі гепатоцитів проводили на протоковому цитофлуориметрі за кількістю клітин, здатних акумулювати пропідій йодид [18].

Ступінь окисної модифікації протеїнів (ОМП) оцінювали за вмістом карбонільних похідних протеїнів (кетон-2,4-динітрофенілгідрозонів) у присутності донорів електронів і металів змінної валентності, насамперед іонів заліза або міді. Зміни абсорбції реєстрували за допомогою автоматичного мікроспектрофотометра  $\mu$ Quant (Biotek, США) [19]. Визначення вмісту продуктів ПОЛ проводили за реакцією з тіобарбітуровою кислотою [20], а вмісту вільних SH-груп низькомолекулярних сполук – за реакцією з *o*-фталієвим альдегідом [21] у гомогенатах печінки.

Активність антиоксидантних ензимів супероксиддисмутази (СОД), каталази та глутатіонпероксидази визначали згідно з описаними раніше методами [22–24].

Активність NAD(P)H-хінон-оксидоредуктази встановлювали в гомогенатах печінки в реакційній суміші, що містила NADPH-генеруючу глюкозо-6-фосфатдегідрогеназну систему, менадіон (2-метил-1,4-нафтохінон) та МТТ [3-(4,5-диметилтіазо-2-іл)-2,5-дифенілтетразолій бромід]. NAD(P)H-хінон-оксидоредуктаза каталізує NADPH-залежне відновлення менадіону в менадіол. Наступне утворення формагану внаслідок неензиматичного відновлення МТТ за дії менадіолу детектували на мікропланшетному рідері в діапазоні довжини хвиль 550–640 нм [25].

Активність семікарбазидчутливої аміноксидази (CAO) визначали в реакції окисного деамінування метиламіну за утворенням пероксиду гідрогену, який детектували флуориметрично ( $\lambda_{36} = 360$  нм,  $\lambda_{em} = 460$  нм) [26], а активність NAD(P)H-оксидази в гомогенатах печінки – спектрофотометрично за швидкістю окислення NADPH в NADP<sup>+</sup> в паралельних пробах без додавання та з додаванням специфічного інгібітора NAD(P)H-оксидази апоцініну (10 мкМ) [27].

Одержані дані аналізували статистичними методами з використанням *t*-критерію Стьюдента [28].

## Результати та обговорення

Порушення нормального перебігу окислювальних процесів внаслідок переважання прооксидантних процесів над антиоксидантними призводить до оксидативного стресу, який є одним з універсальних неспецифічних механізмів розвитку численних морфофункціональних змін в організмі [8, 29]. Для з'ясування ролі кисень-залежних процесів у механізмі індукованих тривалим введенням глюкокортикоїдів порушень функцій печінки на першому етапі вивчали рівень утворення вільнорадикальних сполук, стан окисної модифікації біомолекул та ефективність функціонування системи АОЗ в тканині печінки.

За даними протокової цитофлуориметрії з використанням чутливого до утворення вільнорадикальних форм кисню та азоту зонда DCFH-DA встановлено, що пролонговане введення преднізолону стимулює утворення активних кисневих метаболітів в ізольованих гепатоцитах, підвищуючи інтенсивність флуоресценції зонда на 60% ( $P < 0,05$ ) порівняно з контрольними тваринами (рис. 1).

Як відомо, надмірне утворення активних кисневих метаболітів є одним із ключових механізмів, що призводить до порушення функцій та загибелі клітин. Цитотоксична та мутагенна дія АФК обумовлюється посиленням процесів вільнорадикального (пероксидного) окислення фізіологічно важливих макромолекул. Результати біохімічного аналізу змін інтегральних маркерних показників вільнорадикального окислення біомолекул свідчать про істотну інтенсифікацію цього процесу за введення преднізолону. Зокрема, це стосується вмісту ТБК-активних продуктів, які є кінцевими продуктами ПОЛ – токсичними альдегідами, що спричинюють пошкодження біомембран, протеїнів і нуклеїнових кислот [29–31]. Встановлено, що рівень ТБК-активних продуктів в 1,94 раза перевищує відповідний показник у щурів контрольної групи (табл. 1).

Показано, що за преднізолонового навантаження АФК спричинюють окисну деструкцію не тільки ліпідів, але й протеїнів. Прийнято вважати, що окисна модифікація протеїнів відіграє ключову роль у молекулярних механізмах

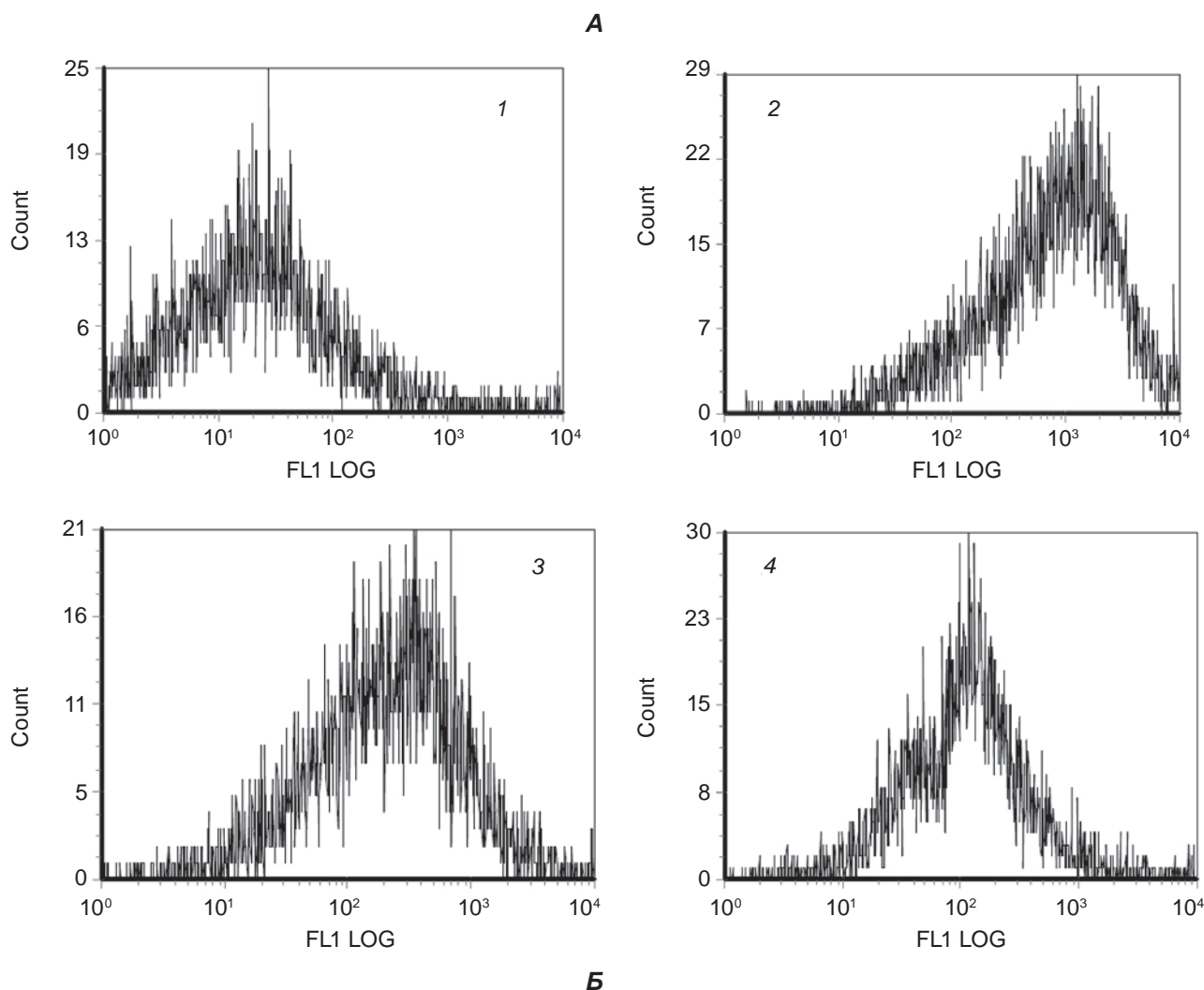


Рис. 1. Цитофлуорограми (А) утворення DCF-чутливих активних форм кисню в ізолюваних гепатоцитах (тут і на рис. 2: count – кількість подій; FL1 LOG – інтенсивність флуоресценції) та кількісний аналіз цитофлуорограм (Б). 1 – контроль; 2 – преднізолон; 3 – преднізолон + вітамін D<sub>3</sub>; 4 – преднізолон + вітаміни D<sub>3</sub> та E (M ± m, n = 6). Тут і на рис. 2–3: \*різниця порівняно з контролем вірогідна (P < 0,05), #різниця порівняно з дією преднізолону вірогідна (P < 0,05)

Таблиця 1. Вміст продуктів вільнорадикального окислення та SH- груп низькомолекулярних сполук у печінці щурів ( $M \pm m$ ,  $n = 9$ )

Досліджувані показники	Контроль	Преднізолон	Преднізолон + вітамін D <sub>3</sub>	Преднізолон + вітаміни D <sub>3</sub> та E
ТБК-активні продукти, мкмоль/г тканини	0,17 ± 0,01	0,33 ± 0,03*	0,22 ± 0,02 <sup>#</sup>	0,20 ± 0,02 <sup>#</sup>
Протеїнові карбонільні групи, нмоль/мг протеїну	0,47 ± 0,04	0,93 ± 0,08*	0,61 ± 0,04 <sup>#</sup>	0,40 ± 0,03 <sup>#</sup>
Вільні SH-групи низькомолекулярних сполук, нмоль/мг протеїну	5,54 ± 0,06	3,70 ± 0,22*	4,73 ± 0,04 <sup>#</sup>	5,45 ± 0,05 <sup>#</sup>

Тут і в табл. 2 \*різниця порівняно з контролем вірогідна ( $P < 0,05$ ); <sup>#</sup> різниця порівняно з дією преднізолону вірогідна ( $P < 0,05$ )

оксидативного стресу і може бути пусковим механізмом пошкодження інших біомолекул (ліпідів, ДНК) клітини [32, 33]. Ступінь окисної модифікації протеїнів оцінювали за вмістом карбонільних груп (>C=O), які утворюються в протеїнових молекулах в основному за рахунок прямого окислення вільними радикалами деяких залишків амінокислот (особливо Pro, Arg, Lys, Trh), а також внаслідок взаємодії із продуктами ПОЛ або редукуючими цукрами. Оскільки амінокислотні залишки в нормі містять дуже невелику кількість карбонільних груп, будь-яке, навіть незначне, їх зростання на одиницю протеїну може розглядатись як результат оксидативного стресу, що виникає у разі дисбалансу АФК-генеруючих та утилізуючих механізмів. Більше того, визначення рівня карбонільних груп у протеїнах має значні переваги порівняно з детекцією продуктів ліпопероксидації з огляду на відносну стійкість окислених протеїнів та їх утворення вже на початкових стадіях розвитку оксидативного стресу [32].

Встановлено, що вміст карбонільних груп у досліджуваних зразках печінки у 1,97 раза перевищує відповідний показник тварин контрольної групи (табл. 1). Серед різноманітних типів пошкоджень макромолекул саме окисна модифікація клітинних протеїнів часто призводить до втрати їхніх функцій, і такі молекули підлягають вибірковій деградації. Незважаючи на те, що помірною окисною модифікацією робить протеїни, за рідким виключенням, доступнішими для дії багатьох протеїназ та відіграє важливу роль в їх нормальному перетворенні в клітині, підвищення

стаціонарного рівня окислених протеїнів зі зміненими властивостями (особливо ензимів) за умов оксидативного стресу може порушувати клітинний метаболізм і спричинювати дисфункцію клітин.

Важливим компонентом підтримання окислювального гомеостазу в клітинах і тканинах є тіол-дисульфідна система. До неї належать низькомолекулярні тіоли, зокрема глутатіон, SH- та S-S-групи протеїнів, рівень яких регулюється ензимами глутатіонового циклу [34]. Циклічне окислення-відновлення тіолових груп залишків амінокислот слугує своєрідною пасткою, що перехоплює АФК, захищаючи такі протеїни від глибших необоротних окисних модифікацій. Зміни в редокс-стані GSH/GSSG здатні регулювати оборотне утворення змішаних дисульфідів між тіоловими групами протеїнів та відновленим глутатіоном. Однак у разі зниження рівня вільних SH-груп за патології і різних форм стресу утворення змішаних дисульфідів протеїнів може переважати над процесом їх відновлення та призводити до збільшення кількості дисульфідних зв'язків і підвищення жорсткості конформаційних структур протеїну, що змінює стан клітинних мембран, їхню проникність та адгезивні властивості, негативно впливає на активність ензимів, енергозабезпеченність і виживання клітин [32, 34]. За дії преднізолону відбуваються порушення в тіол-дисульфідній системі, що простежується у зниженні рівня вільних SH-груп низькомолекулярних сполук у печінці на 33,2% ( $P < 0,05$ ) порівняно з контролем (табл. 1). Це свідчить про значне пригнічення адаптивних механізмів АОЗ. За розвитку окси-

датовного стресу зрушення в системі SH/S-S у напрямку зменшення вільних сульфгідрильних груп сприяє подальшому накопиченню продуктів ліпопероксидації та окисного пошкодження протеїнів і може бути додатковим чинником ще більшого посилення оксидативного стресу. Не виключено, що значну роль у порушенні функцій тіол-дисульфідної системи печінки за дії преднізолону може відігравати зниження рівня відновленого глутатіону внаслідок його посиленого використання для утворення кон'югатів глутатіону із продуктами катаболізму глюкокортикоїду [33, 35].

Висока біологічна активність АФК та продуктів пероксидного окислення біомолекул обумовлює необхідність постійного функціонування в клітинах організму спеціальних механізмів АОЗ, важливими компонентами якої є антиоксидантні ензими. Останні, поряд із неензиматичними антиоксидантами, виконують цитопротекторну функцію, надійно обмежуючи прооксидантний процес на всіх його етапах, починаючи від стадії утворення АФК. Послаблення будь-якої ланки АОЗ через взаємозалежність всіх її компонентів чи порушення компенсаторних механізмів може сприяти розвитку оксидативного стресу [8, 29, 30, 35]. Встановлена активація прооксидантних процесів за дії глюкокортикоїду може бути результатом

порушення функціонування узгодженої системи ензимних і неензимних механізмів контролю за вмістом активних форм кисню і молекулярних продуктів вільнорадикального окислення.

Дослідження антиоксидантного статусу клітин печінки щурів, яким вводили преднізолон, дозволяє відмітити пригнічення активності ензимної ланки системи АОЗ. Зокрема, спостерігається зниження активності супероксиддисмутази на 41% ( $P < 0,05$ ) відносно аналогічного показника інтактних щурів (табл. 2). Цей ензим, як відомо, регулює процеси пероксидації на стадії ініціації, каталізуючи реакцію дисмутації супероксидних аніон-радикалів з утворенням пероксиду гідрогену та молекулярного кисню. Вивчення активності каталази, яка спряжено функціонує із СОД, запобігаючи накопиченню в клітинах пероксиду гідрогену і утворенню найтоксичніших гідроксильних радикалів, показало зниження активності ензиму на 48% ( $P < 0,05$ ) порівняно з контролем (табл. 2). Важливу роль в ензимній ланці АОЗ організму, що забезпечує захист від пошкоджуючої дії пероксидів різної природи, також відіграє глутатіонпероксидаза. Встановлено зниження активності цього ензиму на 24% ( $P < 0,05$ ) за дії преднізолону порівняно з контрольними тваринами (табл. 2). Одним з

Таблиця 2. Активність про- та антиоксидантних ензимів у печінці щурів за дії преднізолону та у разі введення вітамінів D<sub>3</sub> і E ( $M \pm m$ ,  $n = 9$ )

Досліджувані показники	Контроль	Преднізолон	Преднізолон + вітамін D <sub>3</sub>	Преднізолон + вітаміни D <sub>3</sub> та E
Супероксиддисмутаза, од./мг протеїну	308 ± 28	182 ± 17*	267 ± 23 <sup>#</sup>	317 ± 30 <sup>#</sup>
Каталаза, мкмоль H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> /хв·мг протеїну	820 ± 73	424 ± 32*	485 ± 28 <sup>#</sup>	539 ± 48 <sup>#</sup>
Глутатіонпероксидаза, нмоль GSH/хв·мг протеїну	140 ± 12	107 ± 10*	128 ± 13	170 ± 15 <sup>#</sup>
NADPH-хіноноксидоредуктаза, нмоль відновленого МТТ/хв·мг протеїну	25,3 ± 1,8	35,7 ± 2,8*	27,5 ± 1,8 <sup>#</sup>	25,1 ± 1,7 <sup>#</sup>
Семікарбазидчутлива аміноксидаза, нмоль H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> /хв·мг протеїну	331 ± 26	467 ± 35*	315 ± 2 <sup>3#</sup>	256 ± 18 <sup>#</sup>
NADPH-оксидаза, нмоль NADPH/хв·мг протеїну	3,54 ± 0,23	1,59 ± 0,13*	2,28 ± 0,18 <sup>#</sup>	2,86 ± 0,19 <sup>#</sup>

механізмів розвитку порушень ензимної ланки за введення преднізолону може бути індукована інтенсифікацією вільнорадикальних та пероксидних процесів пряма інактивація ензимів АОЗ [33].

Отже, підвищення рівня утворення АФК, вмісту продуктів пероксидного окислення протеїнів і ліпідів та зниження активності ключових ензимів системи АОЗ і антиоксидантного потенціалу тіолів у тканині печінки щурів є доказом розвитку оксидативного стресу за тривалого застосування преднізолону. Основними джерелами утворення АФК за дії глюкокортикоїдів може бути система цитохрому P450 та дихальний ланцюг мітохондрій, функціонування яких зазнає значних змін. Підтвердженням цього є дані літератури, які, з одного боку, свідчать про те, що глюкокортикоїди як первинні ефектори в механізмі стресової відповіді є потужними індукторами синтезу низки ізоформ цитохрому P450, що прискорюють перетворення як гепатотоксичних ксенобіотиків, так і ендогенних субстратів з утворенням вільних радикалів та електрофільних інтермедіатів [36]. З іншого боку, показано, що надмірний рівень глюкокортикоїдних гормонів може підвищувати окисне пошкодження біомолекул через інгібування активності мітохондріального комплексу I, а також ключового антиоксидантного ензиму – СОД [33].

Тривале застосування глюкокортикоїдів у високих дозах може сприяти порушенню сигналювання через їхні рецептори та спричинювати різноманітні метаболічні зміни, зокрема розвиток оксидативного стресу [2]. Так, стимулювання кортикостероїдами ліполізу в адипоцитах призводить до підвищення рівня поліненасичених жирних кислот та посиленого утворення ліпопротеїнів дуже низької щільності [37]. Відомо, що основним субстратом ПОЛ є саме поліненасичені ланцюги жирних кислот, що входять до складу клітинних мембран, а також ліпопротеїнів. Глюкокортикоїди, крім того, здатні спричинювати інсулінорезистентність і проглюконеогенну метаболічну відповідь, що виявляється у підвищенні концентрації глюкози в крові та значному накопиченні глікогену в гепатоцитах [2, 38]. Підвищення концентрації редуруючих моноцукрів, зокрема глюкози, є одним із факторів розвитку карбонільного стресу. В контексті побічних ефектів глюкокортикоїдної

терапії потрібно також враховувати потенційно гепатотоксичні властивості дезоксихолевої кислоти, рівень якої значно зростає за дії цих гормонів [39].

Враховуючи, що окисне пошкодження біомолекул та клітинних структур значною мірою визначає цитотоксичні ефекти вільнорадикальних форм кисню та азоту в умовах їх надмірного утворення, важливим було дослідити залежність між інтенсифікацією прооксидантних процесів та функціональною активністю і виживанням гепатоцитів за дії глюкокортикоїдів. Розвиток оксидативного стресу в тканині печінки, як однієї із ключових індукованих гормональною терапією змін, може спричинити дисфункцію мітохондрій з наступною ініціацією пошкодження та загибелі гепатоцитів. Було виявлено, що інтенсифікація вільнорадикальних процесів корелювала зі зростанням частки загиблих (некротичних) клітин серед ізольованих гепатоцитів до 12,8% за дії преднізолону порівняно з 8% у контролі ( $P < 0,05$ , рис. 2). Ці результати узгоджуються з попередньо одержаними нами гісто- та цитохімічними даними, які засвідчують зниження кількості гепатоцитів та істотні порушення їхньої структури і цілісності за введення глюкокортикоїду [40]. Деструкція паренхіматозних клітин печінки, ймовірно, може бути тригером активації інших клітинних популяцій, які здатні ініціювати запальну реакцію та/або адаптивну імунну відповідь і гальмувати регенерацію печінки.

Індуковані глюкокортикоїдами зміни структурної організації та функціонального стану гепатоцитів можуть бути пов'язані з порушеннями в системах біотрансформації ксенобіотиків та ендогенних сполук, зокрема процесів їх ензиматичного окислення. Найменш вивченими механізмами біотрансформації ксенобіотиків є такі, що відбуваються за участю NAD(P)H-хінон-оксидоредуктази (XR). Відомо, що розвиток оксидативного стресу в умовах токсичного впливу на організм ксенобіотиків негативно позначається на функції фосфорилуючої системи мітохондрій. Гідрофільні хінони за цих умов можуть відігравати роль факторів, які частково протидіють негативному ефекту. Зокрема, у разі блокування комплексу I дихального ланцюга мітохондрій та пов'язаного з цим накопичення NADH, ефективний спосіб нормалізації роботи дихального ланцюга полягає в тому, що

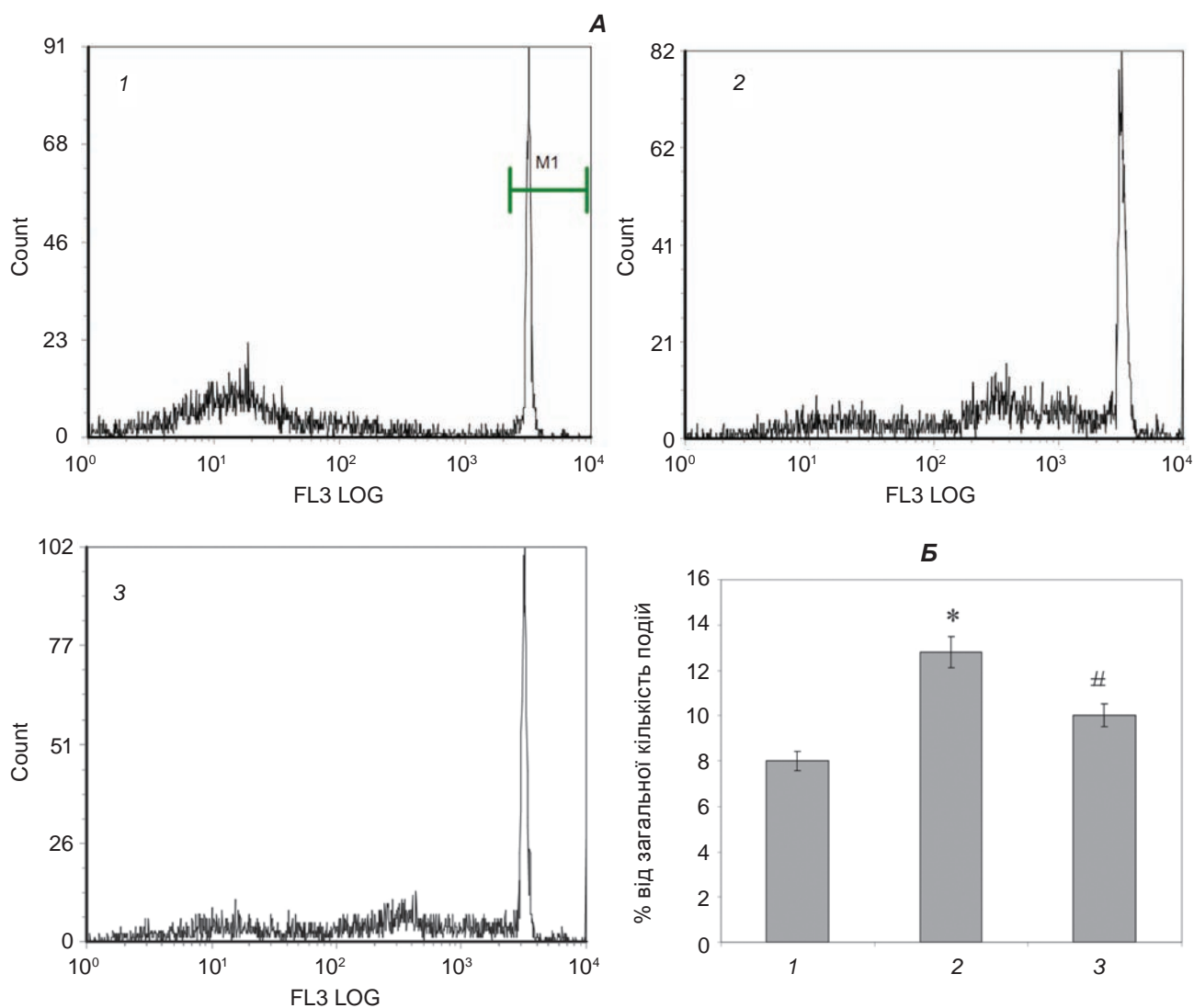


Рис. 2. Цитофлуорограми загибелі гепатоцитів за акумулюванням пропідію йодиду (А) та кількісний аналіз цитофлуорограм (Б). 1 – контроль; 2 – преднізолон; 3 – преднізолон + вітамін D<sub>3</sub> (M ± m, n = 6)

гідрофільні хінони за дії ХР та у присутності NADH відновлюються до гідрохінонів і далі, окислюючись в комплексі III дихального ланцюга, утворюють шунт, який забезпечує обхід комплексу I [41, 42].

В умовах тривалого навантаження преднізолоном було встановлено істотне, більш ніж в 1,4 раза підвищення активності ХР в печінці шурів (табл. 2), експресія якої, за даними літератури, різко зростає у відповідь на оксидативний стрес і дію ксенобіотиків. Ці результати є свідченням того, що індуковане преднізолоном посилення двоелектронного відновлення хінонів до дигідрохінонів за дії ХР може використовуватись для переносу електронів у дихальному

ланцюзі для відновлення функції клітин за дії ксенобіотика. Хоча ХР як індукційний антиоксидантний фермент запобігає утворенню АФК, утворені дигідрохінони самі можуть бути додатковим джерелом АФК, як це показано в роботі Watanabe N. та співавторів [43]. Отже, виявлене посилення вільнорадикальних процесів у разі введення преднізолону частково може пояснюватись зростанням активності цього ферменту.

Порушення ферментативних систем біотрансформації метаболітів спряжене з накопиченням токсичних продуктів розпаду, які можуть різко посилювати процеси оксидативного стресу і, відповідно, порушувати функції клітин. З цієї точки зору актуальним є вивчен-



ня активності САО печінки, яка бере участь в окисленні як ксенобіотиків, включаючи лікарські препарати, так і ендogenous токсичних сполук. Відомо, що САО метаболізує низку ендogenous амінів із вторинним утворенням високотоксичних альдегідів і пероксиду водню [44]. Нами показано зростання активності САО в печінці тварин, що отримували преднізолон, на 41,0% ( $P < 0,05$ ) порівняно з контролем (табл. 2). Можна припустити, що підвищення активності САО за патологічних умов буде супроводжуватись накопиченням вторинних токсичних сполук, що варто розглядати як додатковий фактор посилення окисдативного стресу та зниження репаративних процесів у тканині печінки.

Відомо, що функціонування ланцюга біоантиоксидантів і системи антиоксидантних ензимів залежить від фонду NADPH у клітинах. Зокрема, взаємозалежні окисно-відновні перетворення таких важливих антиоксидантів як глутатіон і аскорбінова кислота (остання відновлює радикали токоферолу та різних поліфенолів) відбуваються за рахунок відновних еквівалентів NADPH. Виявлене в роботі зниження антиоксидантного потенціалу клітин печінки могло би бути наслідком посиленого конкурентного використання NADPH у реакції, що каталізується NAD(P)H-оксидазою. Цей багатокомпонентний оксидазний комплекс забезпечує генерування АФК переважно у фагоцитуючих клітинах крові та в резидентних макрофагах периферичних тканин, зокрема, відіграє ключову роль у розвитку запального процесу в печінці за участю клітин Купфера [45]. Основним продуктом функціонування NAD(P)H-оксидази є супероксидний аніон-радикал, який виявляє бактерицидну дію та є одним із найважливіших компонентів неспецифічного протиінфекційного захисту організму. Крім того, NAD(P)H-оксидаза експресується в гепатоцитах та зірчастих клітинах печінки [46, 47]. Незважаючи на важливу роль NAD(P)H-оксидази в генеруванні вільнорадикальних форм кисню, одержані результати дослідження показали, що активність ензиму в гомогенаті печінки не тільки не зростає, але навіть знижується на 55% ( $P < 0,05$ ) за дії преднізолону порівняно з контролем (табл. 2). Можливо інактивація NAD(P)H-оксидази є захисним механізмом, що забезпечує від тяжкого ураження печінки внаслідок пролонгованої дії преднізолону. Ці дані узгоджуються з відомою

властивістю глюкокортикоїдів гальмувати здатність фагоцитів продукувати вільні радикали та пригнічувати неспецифічний імунний захист і вказують на те, що NAD(P)H-оксидаза не є джерелом посиленого утворення АФК у тканині печінки у разі введення преднізолону. Однак не виключено, що активація ензиму також може мати місце в окремих клітинних популяціях печінки, передусім саме в гепатоцитах.

Усі встановлені в роботі порушення за введення преднізолону спостерігались на фоні дефіциту вітаміну  $D_3$  в організмі щурів, про що свідчить більше, ніж триразове зниження рівня в сироватці крові щурів маркера забезпеченості цим вітаміном –  $25OHD_3$  – порівняно з контролем (рис. 3). Однією із причин зниження ступеня забезпеченості організму холекальциферолом в умовах навантаження глюкокортикоїдами може бути встановлене раніше інгібування активності та вмісту вітаміну  $D_3$  25-гідроксилазних ензимів за дії преднізолону [48]. Ці результати вказують на зміни метаболізму вітаміну  $D_3$  і дають змогу припустити, що підвищення прооксидантного статусу печінки може бути пов'язане з дефіцитом вітаміну  $D_3$  у разі тривалої дії преднізолону. У свою чергу, селективне фармакологічне посилення обміну холекальциферолу може стати важливим терапевтичним засобом протидії гепатотоксичним ефектам глюкокортикоїдів.

Дослідження біохімічних маркерів вільнорадикального процесу і вмісту продуктів ПОЛ та окисної модифікації протеїнів у печінці за поєднаного застосування преднізолону і вітаміну  $D_3$  виявило зниження інтенсивності

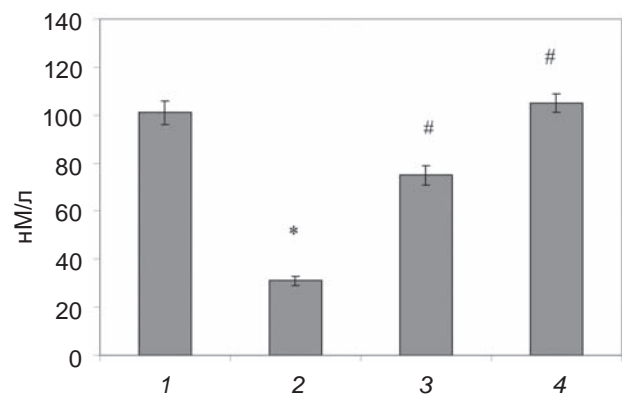


Рис. 3. Вміст  $25OHD_3$  у сироватці крові. 1 – контроль; 2 – преднізолон; 3 – преднізолон + вітамін  $D_3$ ; 4 – преднізолон + вітаміни  $D_3$  та E ( $M \pm m$ ,  $n = 10$ )

DCF-чутливого утворення вільнорадикальних форм кисню та азоту (рис. 1), концентрації ТБК-активних сполук та вмісту карбонільних груп протеїнів і підвищення вмісту тіолових сполук порівняно з показниками тварин, які отримували лише преднізолон (табл. 1). Ці зміни відбувались на тлі часткової нормалізації рівня 25ОНD<sub>3</sub> у сироватці крові щурів (рис 3). Гальмування процесів пероксидної модифікації ліпідів і протеїнів та підвищення антиоксидантного потенціалу тіолів за введення холекальциферолу корелювало з частковою або повною нормалізацією активності ензимів детоксикації, здатних посилювати прооксидантні процеси. Під час введення вітаміну D<sub>3</sub> активність ХР і САО знижувалась на 23,0 і 32,5% відповідно, в той час як активність NADPH-оксидази зростала на 43,0% порівняно з тваринами, яким вводили преднізолон ( $P < 0,05$ ; табл. 2). При цьому рівень активності антиоксидантних ензимів – СОД, каталази та глутатіонпероксидази – підвищувався відповідно на 47,0, 14,0 і 19,0% порівняно з аналогічними показниками в щурів, які отримували глюкокортикоїд ( $P < 0,05$ ; табл. 3). Було встановлено, що введення вітаміну D<sub>3</sub> істотно підвищує виживання гепатоцитів, знижуючи відсоток загинувших клітин, що може бути обумовлено гальмуванням утворення вільнорадикальних сполук та окисної модифікації біомолекул (рис. 3). Це дозволяє дійти висновку, що сумісне застосування преднізолону і вітаміну D<sub>3</sub> знижує розвиток оксидативного стресу в тканині печінки та загинувших гепатоцитів, що необхідно враховувати під час розробки схем терапії глюкокортикоїдних ускладнень.

За дослідження ролі оксидативного стресу в розвитку різних патологічних станів широко використовуються сполуки з переважанням прямої антиоксидантної дії. Відомо, що висока ефективність вітаміну Е, як природного біоантиоксиданту, полягає в його здатності захищати клітинні структури від пошкодження вільнорадикальними формами кисню та реактивними продуктами ПОЛ, що в разі його сумісного застосування з вітаміном D<sub>3</sub> могло б посилювати ефекти останнього [49]. В цілому, як свідчать одержані результати, поєднане введення вітаміну D<sub>3</sub> з  $\alpha$ -токоферолом виявилось ефективнішим у нормалізації порушеного окисного метаболізму порівняно з дією тільки

холекальциферолу. Однак відсутність значної адитивності за одночасного застосування цих двох сполук на прооксидантно/антиоксидантну рівновагу в тканині печінки вказує на виражену антиоксидантну дію самого холекальциферолу, яка може бути співрозмірною з ефектами вітаміну Е, що підтверджується також даними інших авторів [50].

Таким чином, вітамін D<sub>3</sub> протидіє розвитку оксидативного стресу в клітинах печінки, індукованого тривалим введенням преднізолону. Антиоксидантні ефекти вітаміну D<sub>3</sub>, в першу чергу, можуть опосередковуватись біологічно активним метаболітом холекальциферолу – 1,25(ОН)<sub>2</sub>D<sub>3</sub>, який, зв'язуючись із рецептором вітаміну D<sub>3</sub>, посилює передачу сигналу та ефективно контролює інтенсивність утворення вільних радикалів у клітинах печінки щурів [10, 51]. Однак існують дані літератури, які свідчать про значну антиоксидантну дію холекальциферолу в зрілих еритроцитах, що не містять ядра. Ці дані підтверджують наявність антиоксидантної активності, притаманної самій молекулі вітаміну D<sub>3</sub> [11, 12, 14, 52]. Припускають, що холекальциферол може діяти як мембранний антиоксидант, стабілізуючи мембрани та захищаючи їх від ПОЛ через взаємодію з їх гідрофобними ділянками [14].

Дані щодо антиоксидантної активності холекальциферолу узгоджуються з результатами, одержаними в низці робіт, в яких показано, що вітамін D<sub>3</sub> здатен гальмувати процес ПОЛ та підвищувати активність СОД у тканині печінки та інших органів щурів [50, 51, 53]. Крім того, продемонстровано здатність холекальциферолу захищати немалігновані клітини простати від індукованої оксидативним стресом загинелі через гальмування пошкодження клітин, що пов'язано з підвищеним утворенням АФК [54]. За даними літератури, кальцитріол (гормональна форма вітаміну D<sub>3</sub>) може посилювати шлях елімінації реактивних форм кисню і азоту, збільшуючи внутрішньоклітинний пул відновленого глутатіону [55]. Це корелює зі встановленим у цій роботі фактом підвищення вмісту низькомолекулярних тіолів у печінці за дії холекальциферолу, переважну частину яких становить власне глутатіон. Крім того, ефекти вітаміну можуть опосередковуватись його протизапальною дією, зокрема інгібуванням спричиненої гідроксильними радикалами

активації NF-κB-залежної транскрипції генів численних прозапальних цитокінів [56, 57].

З іншого боку, у дослідженнях на моделях неопластичних клітин, було виявлено, навпаки, прооксидантні ефекти вітаміну D<sub>3</sub> [58]. Показано також, що застосування кальцитріолу призводить до рецепторопосередкованого посилення утворення і секреції пероксиду водню моноцитами людини [59]. У культурі клітин кальцитріол відновлює здатність стимульованих моноцитів утворювати супероксидні аніон-радикали та підвищувати оксидативні процеси у порівнянні з нестимульованими моноцитами [60]. На додаток, метаболіти вітаміну D<sub>3</sub> індукують експресію мРНК ліпоксигенази, підвищують активність цього ензиму та утворення АФК у клітинних лініях кісткової тканини людини [61].

Така багатогранна регуляція окисного метаболізму за участю вітаміну D<sub>3</sub> обумовлена складною взаємодією між кількома ядерними коактиваторами або корепресорами, які опосередковують регулювання транскрипції генів на рівні їх взаємодії з рецепторами гормонально активних форм холекальциферолу (VDR) [13, 51]. Крім того, здатність холекальциферолу інгібувати прооксидантні процеси, зумовлені тривалим введенням преднізолону, може вказувати на відмінності механізмів дії стероїдних гормонів та гормонально активних метаболітів вітаміну D<sub>3</sub> на ті самі гени-мішені. Одержані дані свідчать про перспективність застосування вітаміну D<sub>3</sub> для лікування ускладнень, пов'язаних із тривалим введенням глюкокортикоїдів.

Таким чином, аналіз одержаних експериментальних даних засвідчує, що в розвитку преднізолоніндукованого порушення окисного метаболізму та в посиленні загибелі гепатоцитів провідне значення посідає оксидативний стрес, обумовлений інтенсивним утворенням АФК, активізуванням прооксидантних та інгібуванням антиоксидантних ензимів. Сумісне введення вітаміну D<sub>3</sub> на тлі преднізолону гальмує утворення активних форм кисню та азоту в гепатоцитах, нормалізує метаболічну та детоксикаційну функцію клітин печінки і забезпечує їх краще виживання. Встановлено, що рівень забезпеченості організму вітаміном D<sub>3</sub> (за вмістом 25OHD<sub>3</sub> у сироватці крові) є істотним фактором у нормалізації структурно-функціональних порушень гепатоцитів, обумовлених тривалою дією преднізолону.

## **АФК-ГЕНЕРИРУЮЩАЯ И АНТИОКСИДАНТНАЯ СИСТЕМА ПЕЧЕНИ КРЫС ПРИ ДЕЙСТВИИ ПРЕДНИЗОЛОНА И ВИТАМИНА D<sub>3</sub>**

*И. А. Шиманский, А. В. Хоменко,  
О. А. Лисаковская, Д. О. Лабудзинский,  
Л. И. Апуховская, Н. Н. Великий*

Институт биохимии им. А. В. Палладина  
НАН Украины, Киев;  
e-mail: ishyansk@inbox.ru

Механизм индуцированных глюкокортикоидными гормонами нарушений функций печени с участием процессов свободнорадикального окисления биологических молекул и их регуляция витамином D<sub>3</sub> на сегодня остаются недостаточно выясненными. Исследование посвящено изучению особенностей окислительного метаболизма в печени крыс и функционального состояния гепатоцитов при длительном введении синтетического глюкокортикоида преднизолон, а также гепатопротекторного действия витамина D<sub>3</sub>. Показано, что введение преднизолон в дозе 0,5 мг в течение 30 суток приводит к росту количества некротических клеток среди изолированных гепатоцитов. Индуцированные гормоном нарушения функции гепатоцитов сопровождаются усилением генерации активных форм кислорода (АФК), накоплением ТБК-активных продуктов липопероксидации и окислительного повреждения протеинов (по содержанию карбонильных групп), а также снижением уровня свободных SH-групп низкомолекулярных соединений в печени. Продемонстрировано снижение активности ключевых энзимов системы антиоксидантной защиты (СОД, каталазы, глутатионпероксидазы), в то время как активность прооксидантных энзимов NAD(P)H-хинон-оксидоредуктазы и семикарбазидчувствительной аминоксидазы увеличивалась. Введение витамина D<sub>3</sub> в дозе 100 МЕ (и в большей мере при сочетании с α-токоферолом) на фоне глюкокортикоидной терапии способствует снижению уровня образования АФК, окислительного повреждения биомолекул, нормализации активности системы антиоксидантной защиты в печени и повышению выживания гепатоцитов. Полученные данные свидетельствуют о важной роли витамина D<sub>3</sub> в регулировании окислительного метаболизма при действии преднизолон.

**Ключевые слова:** 25OHD<sub>3</sub>, преднизолон, активные формы кислорода, пероксидное окисление биомолекул, про- и антиоксидантные энзимы.

**THE ROS-GENERATING AND ANTIOXIDANT SYSTEMS IN THE LIVER OF RATS TREATED WITH PREDNISOLONE AND VITAMIN D<sub>3</sub>**

*I. O. Shymanskyi, A. V. Khomenko, O. O. Lisakovska, D. O. Labudzynskyi, L. I. Apukhovska, M. M. Veliky*

Palladin Institute of Biochemistry, National Academy of Sciences of Ukraine, Kyiv; e-mail: ishymansk@inbox.ru

The mechanisms of glucocorticoid-induced disturbances of liver function is currently not fully clarified. Vitamin D<sub>3</sub> was previously shown to play an important role in the regulation of impaired oxidative metabolism and detoxification function of the liver associated with the effects of hepatotoxic compounds. The study was undertaken to define the intensity of oxidative metabolism in the rat liver and survival of hepatocytes after prolonged prednisolone administration and to assess whether vitamin D<sub>3</sub> is capable to counter glucocorticoid-induced changes. It has been shown that prednisolone (0.5 mg per animal for 30 days) leads to 1.6-fold increase in the percentage of necrotic cells among isolated hepatocytes as compared with the control. The glucocorticoid-induced impairment of hepatocellular function was accompanied by enhanced generation of reactive oxygen species (ROS), accumulation of TBA-active products and carbonylated proteins but reduced levels of free SH-groups of low molecular weight compounds. It was demonstrated a decrease in the activities of key enzymes of antioxidant system (SOD, catalase, glutathione peroxidase), whereas the activities of pro-oxidant enzymes NAD(P)H-quinone oxidoreductase and semicarbazide-sensitive amine oxidase were shown to be increased. Vitamin D<sub>3</sub> (and to greater extent in combination with α-tocopherol) administration (100 IU) on the background of glucocorticoid therapy caused normalizing effects on the level of ROS formation, oxidative modification of biomolecules and activity of antioxidant enzymes resulting in better survival of hepatocytes. These data suggest a potential role of vitamin D<sub>3</sub> in the regulation of oxidative metabolism

alterations related to hepatotoxic action of glucocorticoids.

**Key words:** 25OHD<sub>3</sub>, prednisolone, reactive oxygen species, peroxide oxidation of biomolecules, pro- and antioxidant enzymes.

**References**

1. Vandevyver S., Dejager L., Tuckermann J., Libert C. New insights into the anti-inflammatory mechanisms of glucocorticoids: an emerging role for glucocorticoid-receptor-mediated transactivation. *Endocrinology*. 2013;154(3):993-1007.
2. Vengerovsky A. I., Baturina N. O., Saratikov A. S. The effect of glucocorticoid drugs on liver metabolism. *Eksperim. Klin. Farmakol.* 1999;62(1):75-80. (In Russian)
3. Wang Z., Iwasaki Y., Zhao L. F., Nishiyama M., Taguchi T., Tsugita M., Kambayashi M., Hashimoto K., Terada Y. Hormonal regulation of glycolytic enzyme gene and pyruvate dehydrogenase kinase/phosphatase gene transcription. *Endocr. J.* 2009;56(8):1019-1030.
4. Panin L. E., Korostyshevskaja I. M., Maksimov V. F., Khoshchenko O. M. Effect of combined glucocorticoids and low density lipoproteins on structural and functional changes in hepatocytes and Kupffer cell. *Tsitologija*. 2002;44(12):1149-1156. (In Russian).
5. Loraschi A., Banfi P., Mauri M., Sessa F., Bono G., Cosentino M. Hepatotoxicity after high-dose methylprednisolone for demyelinating disease. *Clin. Neuropharmacol.* 2010;33(1):52-54.
6. Topal F., Ozaslan E., Akbulut S., Küçükazman M., Yüksel O., Altıparmak E. Methylprednisolone-induced toxic hepatitis. *Ann. Pharmacother.* 2006;40(10):1868-1871.
7. Lu Y., Zhang Z., Xiong X., Wang X., Li J., Shi G., Yang J., Zhang X., Zhang H., Hong J., Xia X., Ning G., Li X. Glucocorticoids promote hepatic cholestasis in mice by inhibiting the transcriptional activity of the farnesoid X receptor. *Gastroenterology*. 2012;143(6):1630-1640.
8. Menshikova E. B., Zenkov N. K., Lankin V. Z., Bondar I. A., Trufakin V. A. Oxidative Stress. Pathological Conditions and Diseases. Novosibirsk: ARTA, 2008. 284 p. (In Russian).
9. Sánchez-Valle V., Chávez-Tapia N. C., Uribe M., Méndez-Sánchez N. Role of oxidative stress and

- molecular changes in liver fibrosis: a review. *Curr. Med. Chem.* 2012;19(28):4850-4860.
10. Bouillon R., Lieben L., Mathieu C., Verstuyf A., Carmeliet G. Vitamin D action: lessons from VDR and Cyp27b1 null mice. *Pediatr. Endocrinol. Rev.* 2013;10(Suppl 2):354-366.
  11. Mukhopadhyay S., Singh M., Chatterjee M. Vitamin D<sub>3</sub> as a modulator of cellular antioxidant defence in murine lymphoma. *Nutr. Res.* 2000;20(1):91-102.
  12. Lin A. M., Chen K. B., Chao P. L. Antioxidative effect of vitamin D<sub>3</sub> on zinc-induced oxidative stress in CNS. *Ann. NY Acad. Sci.* 2005;1053:319-329.
  13. Han Y. P., Kong M., Zheng S., Ren Y., Zhu L., Shi H., Duan Z. Vitamin D in liver diseases: from mechanisms to clinical trials. *J. Gastroenterol. Hepatol.* 2013;28(Suppl 1):49-55.
  14. Wiseman H. Vitamin D is a membrane antioxidant. Ability to inhibit iron-dependent lipid peroxidation in liposomes compared to cholesterol, ergosterol and tamoxifen and relevance to anticancer action. *FEBS Lett.* 1993;326(1-3):285-288.
  15. Petrova G. V., Delemenchuk N. V., Donchenko G. V. Effects of  $\alpha$ -tocopherol and its analogs on rat thymocytes programmed death induced by protein kinase inhibitors. *Ukr. Biokhim. Zhurn.* 2012;84(6):26-35. (In Russian).
  16. Seglen P. Preparation of isolated rat liver cells / In *Methods in cell Biology*. Ed. D. M. Prescott. New York: Academic press, 1987. P. 29-83.
  17. Das J., Ghosh J., Manna P., Sil P.C. Taurine provides antioxidant defense against NaF-induced cytotoxicity in murine hepatocytes. *Pathophysiology.* 2008;15(3):181-190.
  18. Ning B., Bai M., Shen W. Reduced glutathione protects human hepatocytes from palmitate-mediated injury by suppressing endoplasmic reticulum stress response. *Hepatogastroenterology.* 2011;58(110-111):1670-1679.
  19. Zaytseva O. V., Shandrenko S. G. Modification of spectrophotometric method of determination of protein carbonyl groups. *Ukr. Biokhim. Zhurn.* 2012;84(5):112-116. (In Ukrainian).
  20. Janero D. R. Malondialdehyde and thiobarbituric acid-reactivity as diagnostic indices of lipid peroxidation and peroxidative tissue injury. *Free Rad. Biol. Med.* 1990;9(6):515-540.
  21. Hissin P. J., Hilf R. A fluorometric method for determination of oxidized and reduced glutathione in tissues. *Anal. Biochem.* 1976;74:214-226.
  22. Eriksson U. J., Borg L. A. Protection by free oxygen radical scavenging enzymes against glucose-induced embryonic malformations *in vitro*. *Diabetologia.* 1991;34(5):325-331.
  23. Beers R. F, Jr, Sizer I. W. A spectrophotometric method for measuring the breakdown of hydrogen peroxide by catalase. *J. Biol. Chem.* 1952;195(1):133-140.
  24. Moin V. M. A simple and specific method for determining glutathione peroxidase activity in erythrocytes. *Lab. Delo.* 1986;(12):724-727. (In Russian).
  25. Petrova G. V., Donchenko G. V. Cytotoxicity of troglitazone, a structural analogue of  $\alpha$ -tocopherol is mediated by inhibition of NAD(P)H: Quinone oxidoreductase. *Ukr. Biokhim. Zhurn.* 2009;81(4):82-88. (In Russian).
  26. Hirakawa K. Fluorometry of hydrogen peroxide using oxidative decomposition of folic acid. *Anal. Bioanal. Chem.* 2006;386(2):244-248.
  27. Murillo M. M., Carmona-Cuenca I., Del Castillo G., Ortiz C., Roncero C., Sánchez A., Fernández M., Fabregat I. Activation of NADPH oxidase by transforming growth factor-beta in hepatocytes mediates up-regulation of epidermal growth factor receptor ligands through a nuclear factor-kappaB-dependent mechanism. *Biochem. J.* 2007;405(2):251-259.
  28. Lapach S.N., Chubenko A.V., Babich P.N. Statistical methods in biomedical studies using Excel. K.: Morion, 2000. 320 p. (In Russian).
  29. Dontsov V. I., Krut'ko V. N., Mrikaev B. M., Ukhanov S. V. Reactive oxygen species as a system: significance in physiology, pathology and natural ageing. *Proceedings SAI RAS.* 2006;19:50-69. (In Russian).
  30. Kazimirko V. K., Maltsev V. I., Butylkin V. Y., Gorobets N. I. Free-Radical Oxidation and the Antioxidant Therapy. K.:Morion, 2004. 160 p. (In Russian).
  31. Bhogal R. H., Curbishley S. M., Weston C. J., Adams D. H., Afford S. C. Reactive oxygen species mediate human hepatocyte injury during hypoxia/reoxygenation. *Liver Transpl.* 2010;16(11):H1303-1313.
  32. Gubskiy U. I., Belenichev I. F., Pavlov S. V. Toxicological effects of oxidative modification of proteins in various pathological conditions (review). *Sovr. Probl. Toks.* 2005;(3):20-26. (In Russian).

33. Tang V. M., Young A. H., Tan H., Beasley C., Wang J. F. Glucocorticoids increase protein carbonylation and mitochondrial dysfunction. *Horm. Metab. Res.* 2013;145(10):709-715.
34. Korzhov V. I., Zhadan V. N., Korzhov M. V. The role of glutathione system in the processes of detoxication and antioxidant protection. *Zhurn. AMN Ukr.* 2007;13(1):3-20. (In Russian).
35. Lozovoy M. A., Simão A. N., Panis C., Rotter M. A., Reiche E. M., Morimoto H. K., Lavado E., Cecchini R., Dichi I. Oxidative stress is associated with liver damage, inflammatory status, and corticosteroid therapy in patients with systemic lupus erythematosus. *Lupus.* 2011;20(12):1250-1259.
36. Matsunaga T., Maruyama M., Matsubara T., Nagata K., Yamazoe Y., Ohmori S. Mechanisms of CYP3A induction by glucocorticoids in human fetal liver cells. *Drug Metab. Pharmacokinet.* 2012;27(6):653-657.
37. Mueller K. M., Themanns M., Friedbichler K., Kornfeld J. W., Esterbauer H., Tuckermann J. P., Moriggl R. Hepatic growth hormone and glucocorticoid receptor signaling in body growth, steatosis and metabolic liver cancer development. *Mol. Cell Endocrinol.* 2012;361(1-2):1-11.
38. Reagan W. J., Yang R. Z., Park S., Goldstein R., Brees D., Gong D. W. Metabolic adaptive ALT isoenzyme response in livers of C57/BL6 mice treated with dexamethasone. *Toxicol. Pathol.* 2012;40(8):1117-1127.
39. Mazzella G., Fusaroli P., Pezzoli A., Azzaroli F., Mazzeo C., Zambonin L., Simoni P., Festi D., Roda E. Methylprednisolone administration in primary biliary cirrhosis increases cholic acid turnover, synthesis, and deoxycholate concentration in bile. *Dig. Dis. Sci.* 1999;44(12):2478-2483.
40. Khomenko A. V., Shymanskyi I. O., Veliky M. M., Apuchovska L. I. Alteration of cholecalciferol metabolism in hepatocytes associated with prednisolone administration. RECOOP Annual Project Review Meeting, October 10-13, 2013, Split, Croatia, p. 47.
41. Lind C., Cadenas E., Hochstein P., Ernster L. DT-diaphorase: purification, properties, and function. *Methods Enzymol.* 1990;186:287-301.
42. Kargin V. I., Motovilov K. A., Vyssokikh A. Yu., Yaguzhinskiy L.S. Interactions of positively charged ubiquinone analogue (MitoQ(10)) with DT-diaphorase in liver mitochondria. *Biol. Membr.* 2008;25:34-40. (In Russian).
43. Watanabe N., Dickson D. A., Liu R. M., Forman H. J. Quinones and glutathione metabolism. *Meth. Enzymology.* 2004;378:319-340.
44. Alferova V. V., Uzbekov M. G., Misionzhnik E. J., Lukjanjuk E. V., Geht A. B., Scklovsky V. M. Role of semicarbazide-sensitive amine oxidase in disturbances of endogenous detoxication in ischemic stroke patients. *Zh. Nevrol. Psikiatr. im. S. S. Korsakova.* 2011;111(2):18-22. (In Russian).
45. De Minicis S., Brenner D. A. Oxidative stress in alcoholic liver disease: role of NADPH oxidase complex. *J. Gastroenterol. Hepatol.* 2008;(Suppl 1):S98-103.
46. Diaz-Cruz A., Vilchis-Landeros M. M., Guinzberg R., Villalobos-Molina R., Piña E. NOX2 activated by  $\alpha$ 1-adrenoceptors modulates hepatic metabolic routes stimulated by  $\beta$ -adrenoceptors. *Free Radic. Res.* 2011;45(11-12):H1366-1378.
47. Clavijo-Cornejo D., Enriquez-Cortina C., López-Reyes A., Domínguez-Pérez M., Nuño N., Domínguez-Meraz M., Bucio L., Souza V., Factor V. M., Thorgeirsson S. S., Gutiérrez-Ruiz M. C., Gómez-Quiroz L. E. Biphasic regulation of the NADPH oxidase by HGF/c-Met signaling pathway in primary mouse hepatocytes. *Biochimie.* 2013;95(6):1177-1184.
48. Khomenko A. V. Cholecalciferol hydroxylation in rat hepatocytes under the influence of prednisolone. *Ukr. Biokhim. Zhurn.* 2013;85(3):90-95. (In Ukrainian).
49. Kancheva V. D., Kasaikina O. T. Bio-antioxidants - a chemical base of their antioxidant activity and beneficial effect on human health. *Curr. Med. Chem.* 2013;20(37):4784-4805.
50. Sardar S., Chakraborty A., Chatterjee M. Comparative effectiveness of vitamin D<sub>3</sub> and dietary vitamin E on peroxidation of lipids and enzymes of the hepatic antioxidant system in Sprague-Dawley rats. *Int. J. Vitam. Nutr. Res.* 1996;66(1):39-45.
51. Tukaj S., Trzonkowski P., Tukaj C. Regulatory effects of 1,25-dihydroxyvitamin D<sub>3</sub> on vascular smooth muscle cells. *Acta Biochim. Pol.* 2012;59(3):395-400.
52. Karmakar R., Banik S., Chatterjee M. Inhibitory effect of vitamin D<sub>3</sub> on 3' methyl-4-dimethyl-amino-azobenzene-induced rat hepatocarcinogenesis: a study on Antioxidant Defense Enzymes. *J. Exp. Ther. Oncol.* 2002;2(4):193-199.

53. Pahuja D. N., Mitra A. G., Deshpande U. R., Nadkarni G. D. The role of calcium in the modulation of the hepatic anti-oxidant defence system. *J. Trace Elem. Electrolytes Health Dis.* 1993;7(2):71-74.
54. Bao B. Y., Ting H. J., Hsu J. W., Lee Y. F. Protective role of  $1\alpha, 25$ -dihydroxyvitamin  $D_3$  against oxidative stress in nonmalignant human prostate epithelial cells. *Int. J. Cancer.* 2008;122(12):2699-2706.
55. Garcion E., Sindji L., Leblondel G., Brachet P., Darcy F.  $1,25$ -dihydroxyvitamin  $D_3$  regulates the synthesis of  $\gamma$ -glutamyl transpeptidase and glutathione levels in rat primary astrocytes. *J. Neurochem.* 1999;73(2):859-866.
56. Li H., Xie H., Fu M., Li W., Guo B., Ding Y., Wang Q.  $25$ -hydroxyvitamin  $D_3$  ameliorates periodontitis by modulating the expression of inflammation-associated factors in diabetic mice. *Steroids.* 2013;78(2):115-120.
57. Luong K. V., Nguyen L. T. The role of vitamin D in autoimmune hepatitis. *J. Clin. Med. Res.* 2013;5(6):407-415.
58. Koren R., Hadari-Naor I., Zuck E., Rotem C., Liberman U. A., Ravid A. Vitamin D is a prooxidant in breast cancer cells. *Cancer.* 2001;61(4):1439-1444.
59. Cohen M. S., Mesler D. E., Snipes R. G., Gray T. K.  $1,25$ -Dihydroxyvitamin  $D_3$  activates secretion of hydrogen peroxide by human monocytes. *J. Immunol.* 1986;136(3):1049-1053.
60. Levy R., Malech H. L. Effect of  $1,25$ -dihydroxyvitamin  $D_3$ , lipopolysaccharide, or lipoteichoic acid on the expression of NADPH oxidase components in cultured human monocytes. *J. Immunol.* 1991;147(9):3066-3071.
61. Somjen D., Katzburg S., Grafi-Cohen M., Knoll E., Sharon O., Posner G.H. Vitamin D metabolites and analogs induce lipoxygenase mRNA expression and activity as well as reactive oxygen species (ROS) production in human bone cell line. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* 2011;123(1-2):85-89.

Отримано 18.02.2014