

УДК 577.1.57.044:152.574.2:615.9

ВПЛИВ ВАЖКИХ МЕТАЛІВ НА ВМІСТ ЦИТОХРОМІВ P-450 I b₅ ТА АКТИВНІСТЬ ФЕРМЕНТІВ ПЕЧІНКИ ЩУРІВ

Цудзевич Б.О., Калінін І.В., Петрук Н.А.

ННЦ «Інститут біології» Київського національного університету імені Тараса Шевченка
e-mail: ikalin@rambler.ru

Надійшла до редакції 15.03.2011

Досліджено вплив важких металів (міді, цинку, кадмію, свинцю) на вміст цитохромів P-450 і b₅ та активність ферментів печінки щурів. Встановлено зниження вмісту досліджуваних цитохромів та зменшення активності глюкозо-6-фосфатдегідрогенази і 6-фосфоглюконатдегідрогенази у печінці інтоксикованих щурів.

Ключові слова: цитохром P-450 і b₅, глюкозо-6-фосфатдегідрогеназа, 6-фосфоглюконатдегідрогеназа, НАДН, НАДФН, міді сульфат, цинку сульфат, кадмію сульфат, свинець азотнокислий.

ВСТУП

На сьогоднішній день в результаті антропогенної діяльності використовується більше 70 тисяч чужорідних для організму речовин, які називають ксенобіотиками. Надійшовши до організму ксенобіотики, у тому числі і важкі метали, зазнають біотрансформації в печінці завдяки наявності в ендоплазматичному ретикулумі гепатоцитів широкого спектру ферментів. Серед них особливу роль відіграє система гемопротейнів P-450. Реакції гідроксилування ксенобіотиків, які забезпечує система мікосомальних монооксигеназ, спрямовані на захист живих систем від накопичення в них гідрофобних сполук.

Цитохроми P-450 і b₅, а також НАДФН- і НАДН-редуктази належать до монооксигеназної системи, що є унікальною за різноманітністю субстратів їхньої дії і типів реакцій [1-3]. З численних компонентів тільки цитохром P-450 (неспецифічна монооксигеназа, КФ 1.14.14.1) здатен активувати молекулярний кисень за участю електронів, донором яких є НАДФН і цитохром b₅ (рис.1).

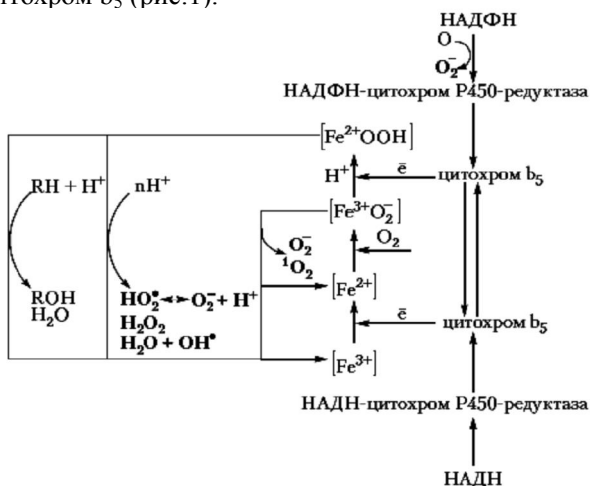


Рис. 1. Гідроксилування субстрату (RH) в НАДФН-цитохром-P-450-залежній монооксигеназній системі.

Метою досліджень було вивчення впливу важких металів (міді, цинку, кадмію, свинцю) на вміст цитохромів P-450 і b₅ та активність НАДФН-генеруючих ферментів (глюкозо-6-фосфатдегідрогенази – КФ 1.1.1.49 і 6-фосфоглюконатдегідрогенази – КФ 1.1.1.44) печінки щурів.

МАТЕРІАЛИ І МЕТОДИ

Досліди проводили на білих нелінійних щурах-самцях, одного віку, масою 180-200 г., впродовж 14 діб. Було утворено п'ять груп тварин: перша – інтактні (контроль), друга – тваринам перорально вводили розчин міді сульфату в дозі 1/10 від ЛД₅₀, третя – щурам перорально вводили розчин цинку сульфату в дозі 1/20 від ЛД₅₀, четверта – тваринам перорально вводили розчин кадмію сульфату в дозі 1/30 від ЛД₅₀, п'ята – тваринам перорально вводили розчин свинцю азотнокислого в дозі 1/50 від ЛД₅₀. Щурів декапітували під ефірним наркозом та відбирали тканини печінки для подальших досліджень. Вся робота проводилась відповідно до конвенції Ради Європи щодо захисту хребетних тварин, яких використовують у наукових цілях.

Для дослідження брали печінку, яку відмивали через воротну вену охолодженим 1% розчином KCl та гомогенізували в 0,05 М трис-НCl буфері (pH 7,5), що містив 0,025 М сахарози, 0,005 М MgCl₂, 0,025 М KCl, 0,008 М CaCl₂. Мікосомальну фракцію печінки одержували за методом [4]. Усі процедури виконували з дотриманням холодного режиму (+4°C). Стан монооксигеназної системи печінки оцінювали за вмістом цитохромів P-450 і b₅, які визначали за методом [5] та активністю n-нітрофенолгідроксилази - маркеру цитохрому P-450 [6].

Активність глюкозо-6-фосфатдегідрогенази і 6-фосфоглюконатдегідрогенази визначали за методом [7].

Стан вільнорадикальних процесів у мікросомальній фракції печінки визначали за швидкістю НАДФН накопичення продуктів реакції з тіобарбітуровою кислотою (ТБК) за методом [8]. Вміст білка у мікросомальній фракції печінки визначали згідно [9]. Експериментальні дані обробляли статистично з використанням t-критерію Ст'юдента [10].

РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

Встановлено, що вміст мікросомальних цитохромів P-450 і b₅ за умов інтоксикації іонами міді, цинку, кадмію та свинцю (рис.2) знизився у всіх дослідних групах. Зокрема цитохром P-450 знизився: в другій групі на 14 %, в третій на 12 %, в четвертій на

27 %, в п'ятій на 21 %, по відношенню до контрольних тварин. Зниження вмісту цитохрому b₅ реєструвалось: при введенні міді сульфату на 16 %, при введенні цинку сульфату на 14 %, при введенні кадмію сульфату на 31 %, при введенні свинцю азотнокислого на 25 %, відносно контролю. Більш виразне зниження цитохромів встановлено за умов інтоксикації іонами кадмію.

Таке зменшення ймовірно, зумовлене переважанням швидкості процесів деградації молекул цитохрому P-450 внаслідок активації процесів ферментативного пероксидного окиснення ліпідів (ПОЛ) в мікросомах. Зниження вмісту цитохрому b₅, можливо, пов'язане із порушеннями у функціонуванні електронно-транспортного ланцюга.

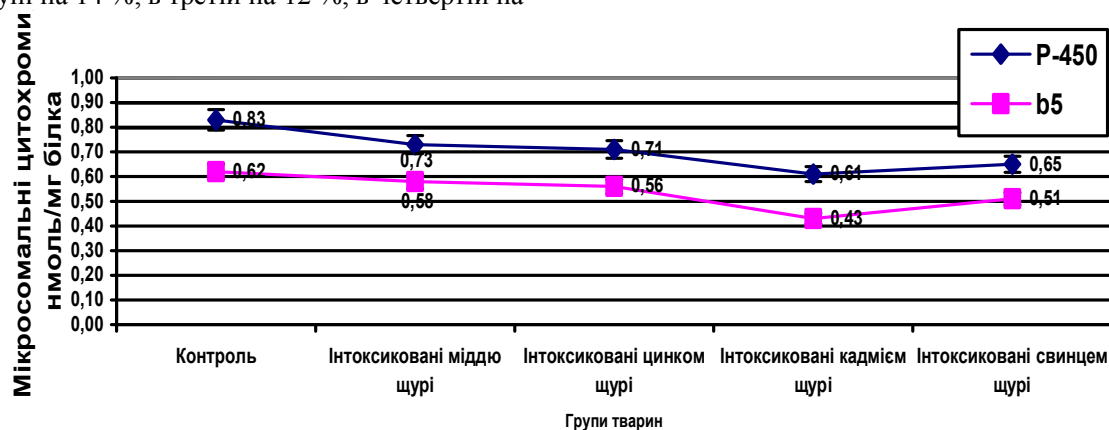


Рис. 2. Вміст мікросомальних цитохромів в печінці щурів після інтоксикації іонами міді, цинку, кадмію та свинцю ($M \pm m$, $n=8$).

Таблиця 1

Активність НАДФ-залежних дегідрогеназ в печінці щурів за умов інтоксикації іонами важких металів, нмоль НАДФН/мг білка за хв. ($M \pm m$, $n=8$)

Групи тварин	Глюкозо-6-фосфатдегідрогеназа	6-фосфоглюконатдегідрогеназа
Контроль	22,7 \pm 2,3	34,3 \pm 2,1
Інтоксовані CuSO ₄	20,1 \pm 1,8	33,1 \pm 2,6
Інтоксовані ZnSO ₄	19,8 \pm 1,7	32,9 \pm 2,4
Інтоксовані CdSO ₄	17,2 \pm 1,5*	30,5 \pm 2,2
Інтоксовані Pb(NO ₃) ₂	18,4 \pm 1,9*	31,2 \pm 2,8

Примітка: * – $P \leq 0,05$ – відносно контролю.

Таблиця 2

Швидкість НАДФН накопичення продуктів реакції з тіобарбітуровою кислотою в мікросомальній фракції печінки щурів за умов інтоксикації іонами важких металів ($M \pm m$, $n=8$)

Групи тварин	Швидкість НАДФН-залежного утворення ТБК-продуктів, нмоль/ хв•мг білка
Контроль	0,341 \pm 0,02
Інтоксовані CuSO ₄	0,689 \pm 0,07*
Інтоксовані ZnSO ₄	0,697 \pm 0,08*
Інтоксовані CdSO ₄	0,793 \pm 0,09*
Інтоксовані Pb(NO ₃) ₂	0,824 \pm 0,06*

Примітка: * – $P \leq 0,05$ – відносно контролю.

Дослідження активності НАДФН-генеруючих ферментів – глюкозо-6-фосфатдегідрогенази і 6-фосфоглюконатдегідрогенази при дії важких металів наведено в табл. 1. Встановлено зниження активності

обох досліджуваних ферментів, що каталізують НАДФ-залежне дегідрування субстратів.

За умов інтоксикації іонами важких металів (всі дослідні групи) спостерігалось зростання НАДФН-

залежного ПОЛ (табл. 2) у 2 рази, по відношенню до контрольної групи.

Значне посилення саме ферментативного ПОЛ є очевидним свідченням залучення до процесу монооксигеназної системи. Одержані результати узгоджуються з даними літератури щодо високої оксидазної активності цитохрому Р-450 за рахунок утворення активних форм кисню та ініціації залежного від НАДФН пероксидного окиснення ліпідів [11-12]. Можливо, продукти ПОЛ взаємодіють із вільними аміногрупами апобілків, що супроводжується зниженням вмісту цитохрому Р-450.

ВИСНОВКИ

В результаті проведених досліджень встановлено зниження вмісту цитохромів Р-450, b₅ і активності НАДФ-залежних дегідрогеназ, що може бути причиною гіперпродукції вільних радикалів та активних форм кисню, які створюють передумови для розвитку окисного стресу. Отримані дані підтверджують участь цитохромів у токсичній біотрансформації ксенобіотиків, що призводить до формування захисних реакцій в організмі та запобігає ушкодженню печінки.

Література

1. *Bondy, S.C.* Contribution of hepatic cytochrome P450 systems to the generation of reactive oxygen species / S.C. Bondy, S. Naderi // *Biochem. Pharmacol.* — 1994.— Vol. 48. — P. 155-159.
2. *Caro, A.A.* Oxidative stress, toxicology, and pharmacology of CYP2E1 / A.A. Caro, A.I. Cederbaum // *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* — 2004. — Vol. 44. — P. 27-42.
3. *Chen, X.-L.* Induction of cytoprotective genes through Nrf2/antioxidant response element pathway: a new therapeutic approach for the treatment of inflammatory diseases / X.-L. Chen, C. Kunsch // *Curr. Pharm. Des.* — 2004. — Vol. 10. — P. 879-891.
4. *Kamath S.A., Kummerow F.A., Narayan K.A.* A simple method for the isolation of rat liver microsomes // *FEBS Letters.* —1971. —V.17, No1. —P. 90-92.
5. *Omura T., Sato R.* The carbon monoxide-binding pigment of liver microsomes // *J. Biol. Chem.* —1964. —V. 239. —P. 2379-2385.
6. *Koop D.R.* Inhibition of ethanol-inducible cytochrome P-450 2E1 by 3-amino-1,2,4-triazole // *Chem. Res. Toxicol.* —1990. —№3. —P. 377-383.
7. *Bottomley R. H., Pilot H. C., Potter V. R., Morris H. P.* Metabolic adaptations in rat hepatomas. Reciprocal relationship between threonine dehydrogenase and glucose-6-phosphate dehydrogenase // *Canc. Res.* — 1963. — Vol. 23, N 1. — P. 400-409.
8. *Стальная И.Д., Гаришвили Т.Г.* Метод определения малонового диальдегида с помощью тиобарбитуровой кислоты // *Современные методы в биологии (под ред. В.Н. Ореховича).* —М., 1977. —С. 66-68.
9. *Lowry O.H., Rosebrough H. J., Farr A. L., Randall R. J.* Protein measurement with folin phenol reagent // *J. Biol. Chem.* — 1951. — Vol. 193. - № 1. — P. 265-275.
10. *Кучеренко М.С., Бабенюк Ю.Д., Войцукский В.М.* Сучасні методи біохімічних досліджень.- К.: Фітосоціоцентр, 2001.- С. 109-152.
11. *Snyder, R.* Microsomal enzyme induction // *Toxicological Sciences.* — 2000. — Vol. 55. — P. 233-234.
12. *Guengerich, F.P.* Cytochrome P450 and chemical toxicology / F.P. Guengerich // *Chem. Res. Toxicol.* — 2008. — Vol. 21. — P. 70-83.

ВЛИЯНИЕ ТЯЖЕЛЫХ МЕТАЛЛОВ НА СОДЕРЖАНИЕ ЦИТОХРОМОВ Р-450 И b₅ И АКТИВНОСТЬ ФЕРМЕНТОВ ПЕЧЕНИ КРЫС

Цудзевич Б.А., Калінін І.В., Петрук Н.А.

Исследовали влияние тяжелых металлов (меди, цинка, кадмия, свинца) на содержание цитохромов Р-450 и b₅ и активность ферментов печени крыс. Установлено снижение содержания исследованных цитохромов и уменьшение активности глюкозо-6-фосфатдегидрогеназы и 6-фосфоглюконатдегидрогеназы в печени крыс при интоксикации.

Ключевые слова: цитохром Р-450 и b₅, глюкозо-6-фосфатдегидрогеназа, 6-фосфоглюконатдегидрогеназа, НАДН, НАДФН, меди сульфат, цинка сульфат, кадмия сульфат, свинец азотнокислый.

INFLUENCE OF HEAVY METALS ON CONTENT CYTOCHROME P-450 AND B5 AND RAT LIVER ENZYMES

Tsudzevich B.A., Kalinin I.V., Petruk N.A.

Investigated the effect of heavy metals (copper, zinc, cadmium, lead) on the content of cytochrome P-450 and b₅ and the enzyme activity of rat liver. A reduction in the content of the study of cytochromes and the decrease in activity of glucose-6-phosphate dehydrogenase and 6-phosphogluconic dehydrogenase in rat liver during intoxication.

Key words: cytochrome P-450 and b₅, glucose-6-phosphate dehydrogenase, 6-phosphogluconic dehydrogenase, NADH, NADPH, copper sulfate, zinc sulfate, cadmium sulfate, lead nitrate.