

УДК 577.57.044 : 577.152.1

Г. В. Ганусова

Харьковский национальный университет им. В. Н. Каразина

АКТИВНОСТЬ ЦИТОПЛАЗМАТИЧЕСКИХ NADP-ЗАВИСИМЫХ ДЕГИДРОГЕНАЗ И СОДЕРЖАНИЕ ЦИТОХРОМОВ P-450 И B₅ В ПЕЧЕНИ КРЫС ПРИ ВВЕДЕНИИ ХЛОРИДА КОБАЛЬТА И ХЛОРИДА РТУТИ

Вивчено вплив хлориду кобальту та хлориду ртуті на активність цитоплазматичних NADP-залежних дегідрогеназ і вміст мікосомальних цитохромів у печінці щурів на різні терміни після введення солей (0,5, 2 і 14 годин). Хлорид кобальту та хлорид ртуті призводять до зниження вмісту мікосомальних цитохромів P-450 і b₅ через 14 годин. Встановлено зниження глюкозо-6-фосфатдегідрогеназної та малатдегідрогеназної активностей через півгодини після введення хлориду кобальту. Хлорид ртуті не впливав на активність NADP-залежних дегідрогеназ.

Influence of the cobalt chloride and mercury chloride on the activity of cytoplasmic NADP-dependent dehydrogenases and cytochromes level in a rat's liver was studied after 0.5, 2 and 14 hours of introduction. Cobalt chloride and mercury chloride result in decrease of the microsomal cytochromes P-450 and b₅ contents in 14 hours. Reduction of the glucose 6-phosphate dehydrogenase and malate dehydrogenase activities in half an hour after cobalt chloride introduction is ascertained. The mercury chloride did not influence on the activity of NADP-dependent dehydrogenases.

Введение

Соли кобальта и ртути – широко распространенные загрязнители окружающей среды. Несмотря на то, что кобальт относится к эссенциальным, а ртуть – к токсическим микроэлементам, при избыточном поступлении в организм они активируют процессы перекисного окисления липидов [22; 24], вызывают индукцию белков острой фазы и других стрессорных белков. Индукция гемоксигеназы, одного из стрессорных белков, сопровождается изменениями активности ферментов метаболизма гема, снижением концентрации свободного гема и микросомальных цитохромов P-450 и b₅ в печени [2; 9; 12]. Цитохром P-450 является терминальной оксидазой микросомальной монооксигеназной системы гидроксилирования ксенобиотиков, ряда лекарственных средств, стероидов [20]. Уровень цитохрома P-450 и активность цитохром P-450-редуктазы лимитируют скорость реакций гидроксилирования в процессе биотрансформации ксенобиотиков в печени [10]. Перенос второго электрона в реакции биотрансформации ксенобиотиков может осуществляться при участии как цитохром P-450-редуктазы, так и цитохрома b₅ [25]. Поставщиками NADPH для цитохром P-450-редуктазной реакции служат ферменты, катализирующие NADP-зависимое дегидрирование субстратов. Взаимодействие механизмов регуляции содержания микросомальных цитохромов и активности цитоплазматических NADP-дегидрогеназ после введения солей кобальта и ртути на этапе формирования защитных реакций организма изучены недостаточно.

В связи с этим в настоящей работе изучено влияние CoCl₂ и HgCl₂ на активность NADPH-генерирующих ферментов: глюкозо-6-фосфатдегидрогеназы (КФ 1.1.1.49), 6-фосфоглюконатдегидрогеназы (КФ 1.1.1.44), цитоплазматической малатдегидрогеназы (КФ 1.1.1.40) и цитоплазматической изоцитратдегидрогеназы

(КФ 1.1.1.42) и содержание микросомальных цитохромов *P-450* и *b₅* в печени крыс через 0,5, 2 и 14 часов после введения солей.

Материал и методы исследований

В работе использовали крыс-самок линии Вистар массой 150–200 г. $CoCl_2 \cdot 6(H_2O)$ или $HgCl_2$ растворяли в 0,9 % $NaCl$ и вводили внутривентриально из расчета 3,0 и 0,7 мг/100 г массы, соответственно. Контрольным животным вводили соответствующий объем физиологического раствора.

Животных декапитировали под легким эфирным наркозом через 0,5, 2 и 14 часов после введения соли. Печень перфузировали холодным физиологическим раствором *in situ* и микросомы выделяли методом дифференциального центрифугирования гомогенатов, приготовленных в среде: сахараза – 0,25 М, трис- HCl буфер – 0,01 М, ЭДТА – 0,001 М, $pH = 7,4$.

Содержание микросомальных цитохромов определяли методом дифференциальной спектрофотометрии по Омура и Сато [18], используя коэффициент молярной экстинкции для цитохрома *b₅* $164 \cdot 10^{-3} M^{-1} cm^{-1}$, для цитохрома *P-450* – $91 \cdot 10^{-3} M^{-1} cm^{-1}$ и для цитохрома *P-420* – $110 \cdot 10^{-3} M^{-1} cm^{-1}$ и выражали в нмоль на 1 мг микросомального белка. Цитозоль, полученный центрифугированием постмитохондриальной фракции при 105000 г в течение 1 часа на центрифуге VAC-601, использовали как ферментный препарат для определения активности *NADP*-зависимых дегидрогеназ.

Активности глюкозо-6-фосфат- и 6-фосфоглюконатдегидрогеназы определили по методу Глок и Мак-Лин в модификации Боттомли [15], малатдегидрогеназы – по методу Очоа в модификации Цончевой [4], а изоцитратдегидрогеназы – по методу Плаут и Санг [5]. Скорость образования *NADPH* регистрировали на спектрофотометре СФ-46 при 340 нм, активность ферментов выражали в нмоль *NADPH*/мин. на 1 мг белка. Концентрацию белка определяли по методу Лоури в модификации Миллера [16].

Результаты и их обсуждение

Содержание микросомальных цитохромов *P-450* и *b₅* (табл. 1) не изменялось в ранние сроки (0,5 и 2 часа) после введения $CoCl_2$ и $HgCl_2$. Снижение содержания цитохромов *P-450* и *b₅* отмечено только через 14 часов, причем более выраженное при введении хлорида ртути.

Таблица 1

Содержание микросомальных цитохромов (нмоль/мг белка)
в печени крыс в разные сроки после введения $CoCl_2$ или $HgCl_2$ ($M \pm m$, $n = 6-9$)

Цитохромы	Контроль	Время после введения соли, часы		
		0,5	2	14
<i>CoCl₂</i>				
<i>P-450</i>	0,82 ± 0,03	0,78 ± 0,04	0,74 ± 0,05	0,63 ± 0,05*
<i>b₅</i>	0,57 ± 0,03	0,54 ± 0,04	0,53 ± 0,05	0,44 ± 0,04*
<i>HgCl₂</i>				
<i>P-450</i>	0,82 ± 0,03	0,76 ± 0,03	0,73 ± 0,05	0,59 ± 0,06*
<i>b₅</i>	0,57 ± 0,03	0,55 ± 0,03	0,53 ± 0,02	0,38 ± 0,04*

Примечание: * – $p < 0,05$ по отношению к контролю.

При изучении влияния введения солей на активность *NADP*-зависимых дегидрогеназ (табл. 2) установлено снижение глюкозо-6-фосфатдегидрогеназной и

малатдегидрогеназной активностей и некоторое снижение изоцитратдегидрогеназной активности через 0,5 часа после введения $CoCl_2$ с нормализацией в последующие 1,5 часа. $HgCl_2$ не оказывал влияния на активность NADP-зависимых дегидрогеназ.

Снижение содержания микросомальных цитохромов P-450 и b₅ после введения солей тяжелых металлов обычно связывают с индукцией гемоксигеназы [9; 13]. Однако гем в составе цитохрома P-450 не атакуется гемоксигеназой и необходима предварительная дестабилизация гемопротеина. В литературе обсуждается несколько механизмов инактивации цитохрома P-450. При фосфорилировании апоцитохрома P-450 cAMP-зависимой протеинкиназой наблюдается ингибирование каталитической активности P-450, снижение его содержания и частичное превращение P-450 в P-420 [23; 21].

Таблица 2

Активность глюкозо-6-фосфатдегидрогеназы (Гл-6-ФДГ),
6-фосфоглюконатдегидрогеназы (6-ФГлДГ), малатдегидрогеназы (МДГ)
и изоцитратдегидрогеназы (ИцДГ) (нмоль NADPH / мг белка за мин.)
в печени крыс в разные сроки после введения $CoCl_2$ или $HgCl_2$ ($M \pm m$, $n = 6-9$)

Ферменты	Контроль	Время после введения соли, ч.		
		0,5	2	14
<i>CoCl₂</i>				
Гл-6-ФДГ	23,6 ± 2,1	16,7 ± 1,7*	20,3 ± 2,0	20,9 ± 1,8
6-ФГлДГ	35,5 ± 2,6	36,6 ± 2,5	35,7 ± 2,4	32,3 ± 2,6
МДГ	21,4 ± 1,6	15,3 ± 1,5*	17,9 ± 1,9	19,4 ± 1,8
ИцДГ	197,5 ± 11,2	171,7 ± 9,6	183,3 ± 9,8	196,4 ± 11,6
<i>HgCl₂</i>				
Гл-6-ФДГ	23,6 ± 2,1	24,9 ± 2,7	31,2 ± 3,9	23,3 ± 2,2
6-ФГлДГ	32,0 ± 2,4	32,4 ± 2,6	33,7 ± 2,5	30,7 ± 1,8
МДГ	21,4 ± 1,6	23,0 ± 2,7	24,1 ± 2,5	24,3 ± 2,8
ИцДГ	197,5 ± 11,2	201,7 ± 11,0	171,3 ± 9,4	205,3 ± 10,3

Примечание: * – $p < 0,05$ по отношению к контролю.

Другой путь ингибирования каталитической активности и денатурации P-450 осуществляется за счет окисления и связывания с $HgCl_2$ SH-групп активного центра цитохрома P-450, а также продуктов перекисного окисления липидов как *in vitro*, так и *in vivo* [6; 17]. Продукты перекисного окисления липидов взаимодействуют со свободными аминогруппами апобелка, что сопровождается снижением каталитической активности и содержания цитохрома P-450; образования P-420 в этих условиях не отмечено. Поскольку в наших опытах не зафиксировано появления P-420 после введения изучаемых солей животным, мы полагаем, что снижение содержания цитохрома P-450 происходит за счет действия $HgCl_2$ и продуктов перекисного окисления липидов. Согласно современным представлениям [6], для частичной инактивации и денатурации цитохрома P-450 достаточно тех концентраций альдегидных продуктов перекисного окисления липидов, которые образуются в микросомальных мембранах при окислительном стрессе.

Появление активных форм кислорода после введения животным $CoCl_2$ можно объяснить тем, что ионы Co^{2+} являются субстратом феррохелатазы, которая катализирует замещение Fe^{2+} в свободном геме [13]. При этом образуются Co^{2+} -протопорфирин и свободные ионы Fe^{2+} . В свою очередь, ионы Fe^{2+} инициируют одноэлектронное восстановление кислорода, что приводит к образованию супероксид-радикала и перекиси водорода. Из перекиси водорода в присутствии ионов металлов с переменной

валентностью, в том числе и Fe^{2+} , может спонтанно образовываться высокореакционноспособный и долгоживущий гидроксил-радикал OH· [3; 19].

Активация свободнорадикального окисления в печени после введения $HgCl_2$, как и других солей, ионы которых не являются субстратом для феррохелатазы, может осуществляться посредством других механизмов, связанных со снижением содержания восстановленного глутатиона. Так, в работе [8] показано, что после внутрибрюшинного введения мышам лактата алюминия уже через два часа резко снижается содержание восстановленного глутатиона и в последующем развивается окислительный стресс с индукцией гемоксигеназы и снижением цитохрома *P-450*.

Появлением активных форм кислорода в ранние сроки после введения $CoCl_2$ (0,5 часа), по-видимому, можно объяснить и снижение глюкозо-6-фосфат- и малатдегидрогеназной активностей. В литературе имеются данные о снижении активности глюкозо-6-фосфатдегидрогеназы активными формами кислорода [7; 11]. Поскольку активные формы кислорода инактивируются как ферментативным, так и неферментативным путем, в последующие 1,5 часа активность дегидрогеназ возвращается к исходному уровню.

Выводы

Влияние $CoCl_2$ и $HgCl_2$ на содержание микросомальных цитохромов и активность *NADP*-зависимых дегидрогеназ осуществляется путем формирования защитных реакций в ответ на появление активных форм кислорода и активацию перекисного окисления липидов. В результате индукции гемоксигеназы образуются внутриклеточные мессенджеры, которые участвуют в регуляции антиоксидантной системы клетки [14]. Снижение содержания цитохромов *P-450* и *b₅* не сопровождалось снижением активности *NADP*-зависимых дегидрогеназ, а значит, только индукция микросомальных цитохромов функционально связана с активацией образования *NADPH* [1].

Библиографические ссылки

1. **Активность** цитоплазматических *NADP*-зависимых дегидрогеназ в печени крыс в процессе индукции фенобарбиталом цитохрома *P-450* / П. А. Калиман, В. В. Петренко, С. П. Манандхар, Т. В. Бомко // Укр. биохим. журн. – 1991. – Т. 63, № 2. – С. 52–58.
2. **Калиман П. А.** Влияние хлорида кобальта на активность ключевых ферментов метаболизма гема в печени крыс / П. А. Калиман, И. В. Беловецкая // Биохимия. – 1986. – Т. 51, № 8. – С. 1302–1307.
3. **Осипов А. Н.** Активные формы кислорода и их роль в организме / А. Н. Осипов, О. А. Азизова, Ю. А. Владимиров // Усп. биол. хим. – М.: Наука, 1990. – Вып. 31. – С. 180–208.
4. **Усатенко М. С.** Влияние инсулиновой недостаточности и гидрокортизона на активность НАДФ- и НАД-зависимых малатдегидрогеназ в печени и коре почек крыс / М. С. Усатенко, А. В. Цончева // Вопр. мед. химии. – 1974. – Т. 20, № 4. – С. 401–406.
5. **Bauman D. E.** Pathways of fatty acid synthesis in mammary gland of rat, sow and cow / D. E. Bauman, R. E. Brown, C. L. Davis // Arch. Biochem. Biophys. – 1970. – Vol. 140, N 1. – P. 237–244.
6. **Bestervelt L. L.** Inactivation of ethanol-inducible cytochrome P-450 and other microsomal P-450 isozymes by trans-4-hydroxy-2-nonenal, a major product of membrane lipid peroxidation / L. L. Bestervelt, A. D. V. Vaz, M. J. Coon // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. – 1995. – Vol. 92, N 9. – P. 3764–3768.
7. **Dumitru I. F.** Decrease in yeast glucose-6-phosphate dehydrogenase activity due oxygen free radicals / I. F. Dumitru, M. T. Nechifor // Intern. J. Biochem. – 1994. – Vol. 26, N 2. – P. 1632–1635.

8. **Fulton B.** The temporal relationship between hepatic GSH loss, heme oxygenase induction, and cytochrome P-450 loss following intraperitoneal aluminium administration to mice / B. Fulton, E. N. Jeffery // *Toxicol. Appl. Pharmacol.* – 1994. – Vol. 127, N 2. – P. 291–297.
9. **Heme oxygenase activity** and cytochrome P-450 content associated with induced metallothionein in the liver of rats treated with various metals / K. Arizono, E. Okanari, K. Ueno, T. Ariyoshi // *J. Environ. Sci. Heals.* – 1991. – Vol. 26, N 6. – P. 941–951.
10. **Imai Y.** Rate-limiting step in the reconstituted microsomal drug hydroxylase system / Y. Imai, R. Sato, T. Ieanagi // *J. Biochem.* – 1977. – Vol. 82, N 4. – P. 1237–1246.
11. **Inactivation** of glucose-6-phosphate dehydrogenase by 4-hydroxy-2-nonenal. Selective modification of an active-site lysine / L. I. Szveda, K. Uchida, L. Tsai, E. R. Stadtman // *J. Biol. Chem.* – 1993. – Vol. 268, N 5. – P. 3342–3347.
12. **Lesuy S. F.** Heme oxygenase and oxidative stress. Evidence of involvement of bilirubin as physiological protector against oxidative damage / S. F. Lesuy, M. L. Tomaro // *Biochim. Biophys. Acta – Mol. Cell Res.* – 1994. – Vol. 1223, N 1. – P. 9–14.
13. **Maines M. D.** Metals as regulators of heme metabolism / M. D. Maines, A. Kappas // *Science.* – 1977. – Vol. 198, N 4323. – P. 1215–1221.
14. **Marks G. S.** Heme oxygenase: the physiological role of one of its metabolites, carbon monoxide and interactions with zinc protoporphyrin, cobalt protoporphyrin and other metalloporphyrins // *Cell. and Mol. Biol.* – 1994. – Vol. 40, N 7. – P. 863–870.
15. **Metabolic adaptations** in rat hepatomas. Reciprocal relationship between threonine dehydrase and glucose-6-phosphate dehydrogenase / R. H. Bottomley, H. C. Pilot, V. R. Potter, H. P. Morris // *Canc. Res.* – 1963. – Vol. 23, N 1. – P. 400–409.
16. **Miller G. L.** Protein determination for large number of samples // *Anal. Chem.* – 1959. – Vol. 31, N 5. – P. 964–966.
17. **Obrebska M. J.** The effects of carbon disulphide on rat liver microsomal mixed-function oxidases *in vivo* and *in vitro* / M. J. Obrebska, P. A. Kentish, D. V. Parke // *Biochem. J.* – 1980. – Vol. 188, N 1. – P. 107–112.
18. **Omura T.** The carbon monoxide-binding pigment of liver microsomes / T. Omura, R. Sato // *J. Biol. Chem.* – 1964. – Vol. 239, N 7. – P. 2379–2385.
19. **Pincus R.** Role of quinone-mediated generation of hydroxyl radicals in the induction of glutathione S-transferase gene expression / R. Pincus, L. M. Weiner, V. Daniel // *Biochemistry.* – 1995. – Vol. 34, N 1. – P. 81–88.
20. **Porter T. D.** Cytochrome P-450. Multiplicity of isoforms, substrates, and catalytic and regulatory mechanisms / T. D. Porter, M. J. Coon // *J. Biol. Chem.* – 1991. – Vol. 266, N 21. – P. 13469–13472.
21. **Relationship** between phosphorylation and cytochrome P-450 destruction / J. Jansson, M. Curti, P. M. Epstein et al. // *Arch. Biochem. Biophys.* – 1990. – Vol. 283, N 2. – P. 285–292.
22. **Stasey N. H.** Cellular toxicity and lipid peroxidation in response to mercury / N. H. Stasey, H. Kappas // *Toxicol. Appl. Pharmacol.* – 1982. – Vol. 63, N 1. – P. 29–35.
23. **Substrate-regulated**, cAMP-dependent phosphorylation, denaturation, and degradation of glucocorticoid-inducible rat liver cytochrome P-450 3A1 / E. Elliason, S. Mkrchan, J. R. Halpert, M. Ingelmannsundberg // *J. Biol. Chem.* – 1994. – Vol. 269, N 28. – P. 18378–18383.
24. **Sunderman F. W.** Metals and lipid peroxidation // *Acta Pharmacol. Toxicol.* – 1986. – Vol. 59, N 7. – P. 248–255.
25. **The stoichiometry** of the cytochrome P-450-catalyzed metabolism of methoxyflurane and benzphetamine in the presence and absence of cytochrome b₅ / L. D. Gruenko, K. Konopka, M. Calien, L. Waskell // *J. Biol. Chem.* – 1995. – Vol. 270, N 42. – P. 24707–24718.

Надійшла до редколегії 01.03.06.