

УДК: 616.36-008.811.6: 615.015.4:547.532)-092.4/9

## РОЛЬ ДЕЗОКСИХОЛЕВОЙ КИСЛОТЫ В ИНГИБИРОВАНИИ АКТИВНОСТИ МОНООКСИГЕНАЗНОЙ, ГЛЮКУРО- И ГЛУТАТИОНКОНЪЮГИРУЮЩЕЙ СИСТЕМ ПЕЧЕНИ КРЫС ПРИ ХОЛЕСТАЗЕ

М.И. Бушма (ст.н.сотр., д.м.н.), Т.И. Хомич  
(ст.н. сотр., к.б.н.), И.В. Зверинский  
(к.б.н.)

Гродненский государственный медицинский университет

Институт биохимии НАНБ, г. Гродно

*Перевязка общего желчного протока (8 дней) и введение дезоксихолевой кислоты (ДОХ; в/ж, 250 мг/кг/день, 8 дней) сопровождаются сходными однонаправленными изменениями в печени крыс, заключающимися в ингибировании активности монооксигеназной, глюкуро- и глутатионтрансферазной систем. В механизме выявленных нарушений важную роль играет снижение активности основных ферментных систем антиоксидантной защиты печени: глутатионпероксидазы, супероксиддисмутазы и каталазы.*

*Ключевые слова: холестаз, дезоксихолевая кислота, биотрансформация ксенобиотиков в печени, антиоксидантная система.*

*The common bile duct ligation (8 days) and the intoxication of rats with deoxycholic acid (intragastrically, 250 mg/kg/day, 8 days) are accompanied by similar unilateral changes in the liver involving inhibited activities of the monooxygenase, glucuro- and glutathione transferase systems. An important role in the mechanisms of disturbances found in cholestasis plays the decreased activities of the enzyme systems of the liver antioxidant protection: glutathione peroxidase, superoxide dismutase and catalase.*

*Key words: common bile duct ligation, deoxycholic acid, xenobiotic biotransformation, antioxidative system.*

### **Введение.**

Ингибирование лекарственно-метаболизирующей функции печени обнаружено при всех формах холестаза [11, 14]. Механизмы этого эффекта сложные и многогранные. Считают, что основную роль в его развитии играет эндотоксемия (накопление в крови холатов и других составных компонентов желчи, а также промежуточных продуктов нарушенного обмена веществ, появляющихся в связи с заболеванием печени).

Целью настоящего исследования явилась сравнительная оценка нарушений ксенобиотико-метаболизирующей функции печени крыс в условиях прекращения тока желчи (перевязка общего желчного протока) и интоксикации ДОХ. Основой научной идеи настоящей работы явилось предположение о том, что накапливающаяся в печени при холестазе ДОХ играет важную роль в ингибировании ксенобиотико-метаболизирующей функции печени.

### **Методы исследования.**

Проведено две серии опытов.

I серия. Опыты проведены на 42 крысах-сам-

цах массой 170-200 г. Наркотизированным диетическим эфиром животным перевязывали общий желчный проток. Контролем служили ложнопериорированные крысы.

II серия. Опыты проведены на 20 крысах-самцах массой 200-230 г. ДОХ вводили в/ж с помощью зонда (250 мг/кг/день, в слизи крахмала в течение 8 дней). Контрольным животным вводили равный объем слизи крахмала. Крыс I и II серии декапитировали через 8 дней от начала опыта (через 24 часа после последнего введения ДОХ).

Функцию ксенобиотико-метаболизирующей функции печени оценивали по содержанию цитохромов  $b_5$  и P450 (суммарно); скорости окисления NADPH; деметилирования аминопирина, этилмиорфина и гидроксирования анилина; активности NADPH-цитохром P 450 и NADPH-цитохром  $b_5$  редуктаз; УДФ-глюкозодегидрогеназы, УДФ-глюкуронил- и глутатион-S-трансфераз, как описано ранее [1].

В условиях целого организма об активности этих систем судили по содержанию в плазме крови субстрата этой системы – антипирина [6], дли-

тельности наркотического действия субстрата. УДФ- глюкуронилтрансферазы – хлоралгидрата [10] и экскреции с мочой глюкуроновой кислоты [15].

Состояние антиоксидантной системы печени оценивали по активности в гомогенате глутатионпероксидазы [5], супероксиддисмутазы [4] и каталазы [3], содержанию восстановленного глутатиона [12]. Активность АлАТ и содержание билирубина определяли в сыворотке крови [2].

**Результаты и обсуждение.** Установлено, что через 8 дней после перевязки общего желчного протока в сыворотке крови крыс, получивших 0,85% раствор NaCl, регистрируется более чем семикратное возрастание уровня билирубина за счет как неконъюгированной, так и конъюгированной фракций. Активность ферментных систем микросомального окисления, глюкуро- и глутатионконъюгации ксенобиотиков в этих условиях значительно ингибируется. Содержание цитохромов P450 и b<sub>5</sub>, активность их редуктаз, скорость окисления NADPH, деметилирования аминопирина, этилморфина и гидроксирования анилина снижаются на 17-73% в сравнении с ложнопериоперированными животными. При этом часть цитохрома P450 превращается в каталитически неактивную форму – цитохром P420. Содержание неметаболизированного антипирина (субстрат цитохрома P450) в плазме крови крыс с холестазом возрастает на 21% (табл. 1).

Активность УДФ-глюкуронилтрансферазы ингибируется параллельно с падением скорости биосинтеза ее субстрата – УДФ-глюкуроновой кислоты (снижение активности УДФ-глюкозо-

дегидрогеназы). Экскреция с мочой общей глюкуроновой кислоты при холестазе возрастает на 63% за счет как неконъюгированной, так и конъюгированной форм. Коэффициент отношения конъюгированной к общей глюкуроновой кислоте снижается, что может свидетельствовать о снижении скорости глюкуроконъюгации эндогенных веществ. Длительность наркотического действия хлоралгидрата (субстрат УДФ- глюкуронилтрансферазы) удлинняется на 34% (табл. 1).

Каталитическая активность микросомальной глутатион-S-трансферазы субстрат-1-хлор-2-4-динитробензол (ХДНБ) при холестазе ингибируется в большей степени, чем соответствующей изоформы цитозольного фермента (табл. 1).

**Таблица 1.** Активность аланинаминотрансферазы (АлАТ) и содержание билирубина в сыворотке крови; функция монооксигеназной, глюкуро- и глутатионконъюгирующей систем печени крыс с холестазом (перевязка общего желчного протока, 8 дней) и при введении дезоксиколовой кислоты (ДОХ; в/ж, 250 мг/кг/день, 8 дней).

Показатель	Ложная операция	Перевязка желчного протока	Контроль	ДОХ
АлАТ, ммоль/л	–	–	2,06±0,14 (100)	4,69±0,56 (228)*
Билирубин (мкмоль/л): общий,	12,38± 0,83 (100)	90,61±2,10 (732)*	–	–
неконъюгированный,	7,76±1,88 (100)	25,34±4,26 (327)*	–	–
конъюгированный	2,61± (100)	63,73± 2,56 (2441)*	–	–
Монооксигеназная система				
Цитохром P450, нмоль/мг белка	0,72 ±0,04 (100)	0,25± 0,08 (35)*	0,82 ±0,05 (100)	0,38± 0,09 (46)*
Цитохром b <sub>5</sub> , нмоль/мг белка	0,52± 0,02 (100)	0,38± 0,02 (73)*	0,54 ±0,07 (100)	0,35 ±0,05 (65)*
NADPH-цитохром P 450 редуктаза, нмоль/мин/мг белка	0,23± 0,01 (100)	0,19 ±0,01 (83)*	0,26± 0,02 (100)	0,20 ±0,01 (77)*
NADPH-цитохром b <sub>5</sub> редуктаза, нмоль/мин/мг белка	4,40 ±0,54 (100)	3,05± 0,18 (69)*	4,40± 0,23 (100)	2,51± 0,30 (57)*
Окисление NADPH нмоль/мин/мг белка	4,99 ±0,39 (100)	2,40± 0,26 (48)*	2,71 ±0,21 (100)	1,73 ±0,30 (64)*
N-диметилирование аминопирина, нмоль/мин/мг белка	9,67 ±0,54 (100)	4,32± 0,39 (45)*	11,33± 0,28 (100)	3,83± 1,04 (34)*
N-диметилирование этилморфина, нмоль/мин/мг белка	10,46 ±1,09 (100)	2,79± 0,36 (27)*	–	–
P-гидроксирование анилина, нмоль/мин/мг белка	0,55 ±0,03 (100)	0,25± 0,02 (46)*	0,67± 0,09 (100)	0,24± 0,04 (36)*
Антипирин, мкг/мл плазмы	15,52±0,25 (100)	18,50± 0,82 (121)*	–	–

Результаты исследований, представленных в таблице 1, свидетельствуют об ингибировании при холестазе в печени крыс каталитической активности ферментных систем микросомального окисления, глюкуро- и глутатионконъюгации ксенобиотиков. Причем в большей степени нарушается функция мембраносвязанных ферментов, что видно при сопоставлении активности микросомальной и цитозольной глутатион-S-трансфераз (см. табл. 1).

Одной из возможных причин ингибирования ксенобиотико-метаболизирующей функции печени крыс с холестазом может быть снижение активности ферментов антиоксидантной защиты гепатоцитов. Результаты исследований, представленных в таблице 2, свидетельствуют в пользу данного предположения.

Установлено, что через 8 дней после перевязки общего желчного протока в печени крыс снижается активность глутатионпероксидазы, супероксиддисмутазы и каталазы на 14-48 % в сравнении с ложноперированными животными (табл. 2). Снижение каталитической активности основных внутриклеточных ферментов антиоксидантной защиты при холестазе является предпосылкой для активации свободнорадикальных процессов в печени при этом состоянии. Накапливающиеся в больших количествах реакционноспособные перикисные соединения повреждают мембранные образования гепатоцитов. Это подтверждается увеличением активности АлАТ в сыворотке крови (нарушение целостности плазматической мембраны) и снижением активности ферментов микросомального окисления, глюкуро- и микросомальной глутатион-S-трансфераз (повреждение мембран эн-

Продолжение табл. 1

Показатель	Ложная операция	Перевязка желчного протока	Контроль	ДОХ
Глюкуроконъюгирующая система				
УДФ-глюкуронилтрансфераза, нмоль/мин/мг белка	7,11±0,75 (100)	5,11±0,61 (72)*	3,46±0,22 (100)	2,59±0,29 (75)*
УДФ-глюкозодегидрогеназа, нмоль/мин/мг белка	11,46±0,74 (100)	7,28±0,50 (64)*	14,33±1,17 (100)	10,42±0,69 (73)*
Глюкуроновая кислота в моче (мг/15 часов); общая, неконъюгированная,	3,33±0,23 (100)	5,42±0,28 (163)*	3,48±0,23 (100)	3,87±0,57 (111)
конъюгированная,	0,79±0,09 (100)	1,71±0,19 (216)*	0,77±0,12 (100)	1,24±0,16 (161)*
конъюгированная/общая	2,53±0,18 (100)	3,80±0,28 (150)*	2,60±0,24 (100)	3,00±0,44 (115)
конъюгированная/общая	0,75±0,01 (100)	0,68±0,03 (91)*	0,77±0,03 (100)	0,70±0,02 (90)*
Хлоралгидратный наркоз, мин	109,90±7,19 (100)	147,80±7,30 (134)*	—	—
Глутатионконъюгирующая система				
Микросомальная глутатион-S-трансфераза, нмоль ХДНБ/мин/мг белка	123,89±6,82 (100)	85,24±5,99 (69)*	78,11±6,98 (100)	53,62±9,22 (69)*
Цитозольная глутатион S-трансфераза: мкмоль ХДНБ/мин/мг белка,	0,77±0,04 (100)	0,71±0,03 (88)	0,60±0,06 (100)	0,46±0,1 (76)
нмоль СБФ/мин/мг белка	11,78±0,77 (100)	13,66±1,25 (116)	7,99±0,37 (100)	6,61±0,75 (83)

Примечание. В скобках - % изменения величин показателей по отношению к ложноперированным или контрольным крысам, принятым за 100 %.

\* - P<0,05. СБФ- сульфобромфталейн.

доплазматического ретикула).

Известно, что при развитии холестаза после перевязки общего желчного протока в плазме крови животных значительно возрастает содержание желчных кислот, особенно гидрофобных [13].

Исходя из выше изложенного, мы предположили, что одним из возможных патогенетических факторов ингибирования ксенобиотико-метаболизирующей и антиоксидантной систем печени крыс при холестазе может выступать ДОХ.

Установлено, что введение интактным крысам ДОХ (в/ж, 250 мг/кг/день в слизи крахмала) в течение 8 дней сопровождается нарушением целостности плазматической мембраны гепатоцитов (судя по увеличению в сыворотке крови активности АлАТ (табл. 1).

Функция монооксигеназной, глюкуро- и глута-

**Таблица 2.** Активность глутатионпероксидазы, супероксиддисмутазы и каталазы в печени крыс с холестазом (перевязка общего желчного протока, 8 дней).

Показатель	Ложная операция	Перевязка протока
Глутатионпероксидаза, мкмоль/мин/мг белка	6,50 0,12 (100)	4,97 0,23 (76)*
Супероксиддисмутаза, ЕД/мин/мг белка	2,11 0,12 (100)	1,81 0,08 (86)*
Каталаза, мкмоль/мин/г печени	51,73 0,76 (100)	27,13 5,02 (52)*

Примечание. В скобках - % изменения величин показателей по отношению к ложнооперированным крысам, принятым за 100%. \* -  $P < 0,05$ .

тионконъюгирующей систем печени при этом значительно ингибируется. Содержание цитохромов

P450 и  $b_5$ , активность их редуктаз, скорость окисления NADPH, деметилирования аминопиррина и гидроксилирования анилина снижаются на 23 – 66%. Активность УДФ-глюкуронилтрансферазы и УДФ-глюкозодегидрогеназы ингибируется на 25 – 27%. Экскреция с мочой неконъюгированной глюкуроновой кислоты возрастает, в то время, как коэффициент соотношения конъюгированная/общая глюкуроновая кислота снижается. Активность микросомальной глутатион-S-трансферазы снижается, а цитозольной – не изменяется (табл. 1).

Таким образом, результаты проведенных исследований свидетельствуют о том, что при перевязке общего желчного протока и интоксикации ДОХ в печени крыс развиваются сходные количественные и качественные морфо-функциональные изменения: ингибируется функция мембраносвязанных ферментных систем микросомального окисления, глюкуро- и глутатионконъюгации ксенобиотиков. Закономерность выявленных нарушений, по-видимому, свидетельствует о важной роли ДОХ в развитии нарушений структуры и функции печени крыс при холестазе.

В механизме мембраноповреждающего действия ДОХ (эндо- и экзогенного происхождения), сопровождающегося ингибированием активности мембраносвязанных ферментных систем биотрансформации ксенобиотиков в печени, по-видимому, основную роль играют её прооксидантные, детергентные и фосфолипазоподобные свойства [7- 9].

#### **Выводы.**

1. Через 8 дней после перевязки общего желчного протока у крыс ингибируется активность монооксигеназной, глюкуро- и глутатионконъюгирующей систем печени.

2. Введение интактным крысам ДОХ (в/ж, 250 мг/кг/день, 8 дней) сопровождается аналогичными изменениями.

3. В механизме выявленных нарушений ксенобиотикометаболизирующей функции печени важную роль играет ингибирование активности ферментов антиоксидантной системы органа: глутатионпероксидазы, супероксиддисмутазы и, особенно, каталазы.

#### **Литература**

1. Бушма М.И., Легонькова Л.Ф., Абакумов Г.З., Заводник Л.Б. Влияние длительного введения ундевита и его комбинации с кордиамином на гидроксигирующую, глюкуро- и глутатионконъюгирующую системы и перекисное окисление липидов печени интактных крыс // Вопросы питания. - 1994. - № 6. - С. 12-15.
2. Колб В.Г., Камышников В.С. Справочник по клинической химии. - Мн.: "Беларусь", 1982. - 366 с.
3. Королюк М.А., Иванова Л.И., Майорова И.Г., Токарев В.Е. Метод определения активности каталазы // Лаб. дело. - 1988. - № 1. - С. 16-19.
4. Костюк В.А., Потапович А.И., Ковалева Т.В. Простой и чувствительный метод определения активности СОД, основанный на реакциях окисления кверцетина // Вопр. мед. химии. - 1990. - Вып. 2. - С. 88-91.
5. Моин В.М. Простой и специфический метод определения активности глутатионпероксидазы в эритроцитах // Лаб. дело. - 1986. - № 12. - С. 724-727.
6. Brodie B.B., Axelrod J., Solerman R., Levy B.B. The estimation of antipirine in biological materials // J. Biol. Chem. - 1949. - Vol. 179, № 1. - P. 25-30.
7. Koganezawa M., Shimada I. Inositol 1,4,5-triphosphate transduction cascade in taste reception of the fleshfly // J. Neurobiol. - 2002. - Vol. 1, № 1. - P. 66-83.
8. Lechner S., Muller L.U., Schlottmann K., Jung B., McClelland M., Ruschoff J., Welsh J., Scholmerich J., Kullmann F. Bile acids mimic stress induced upregulation of thioredoxin reductase in colon cancer cell lines // Carcinogenesis. - 2002. - Vol. 23, № 8. - P. 1281-1288.
9. Matsui K., Nishioka M., Ikeyoshi M., Matsumura Y., Mori T., Kajiwar T. Cocumblar root lipoxygenase can acyl groups in phosphatidylcholine // Biochim. Biophys. Acta. - 1998. - Vol. - 1390, № 1. - P. 8-20.
10. Merrill J.C., Bray T.M. The effect of dietary protein quantity on the activity of UDP-glucuronyltransferase and physiological significance in drug metabolism // Can. J. Physiol. Pharmacol. - 1982. - Vol. 60, № 12. - P. 1556-1561.
11. Park E.J., Ko G., Sohn D.H. Biotransformation of theophylline in cirrhotic rats induced by biliary obstruction // Arch. Pharm.Res. - 1999. - Vol. 22, № 1. - P. 60-67.
12. Sedlak G., Lindsay R.H. Estimation of total, protein-bound, and nonprotein sulfhydryl groups in tissue with Ellman's reagent // Anal. Biochem. - 1968. - Vol. 25, № 1. - P. 192-205.
13. Shefer S., Kren B.T., Salm G., Stea C. J., Nguyen L.B., Chen T., Tinct G.S., Batta A.K. Regulation of bile acid synthesis by deoxycholic acid in the rat: different effects on cholesterol 7, alpha-hydroxylase and sterol 27-hydroxylase // Hepatol. - 1995. - Vol. 22, Pt. 1. - P.1215-1221.
14. Tanaka M., Nakura H., Tateishi T., Watanabe M., Nakaya S., Kumai T., Kobayashi S. Ursodeoxycholic acid prevents hepatic cytochrome P 450 isozyme reduction in rats with deoxycholic acid - induced liver injury // J. Hepatol. - 1999. - Vol. 31, № 2. - P. 263-270.
15. Yuki H., Fishman W.H. A carbazole method for the differential analysis of glucuronate, glucosiduronate and hyaluronate // Biochim. Biophys. Acta. - 1963. - Vol. 69. - P. 576-578.