

УДК 577.12+577.161.1

©Коллектив авторов

## АКТИВНОСТЬ КОМПОНЕНТОВ СИСТЕМЫ ЦИТОХРОМА P450 И СИНТАЗЫ ОКСИДА АЗОТА В ПЕЧЕНИ МЫШЕЙ ПРИ ОТСУТСТВИИ ЗАПАСОВ РЕТИНОИДОВ

*Г.П. Копыльчук<sup>1</sup>, И.А. Шмараков<sup>1</sup>, И.М. Бучковская<sup>1\*</sup>,  
М.М. Марченко<sup>1</sup>, В.С. Бленер<sup>2</sup>*

<sup>1</sup>Черновицкий национальный университет имени Юрия Федьковича, кафедра биохимии и биотехнологии, ул. Коцюбинского, 2, г. Черновцы, 58000 Украина  
<sup>2</sup>Колумбийский университет, отдел превентивной медицины и нутриентологии, колледж терапевтов и хирургов, Нью Йорк, США, 10032;  
эл. почта: ivannabuchkovska@mail.ru

В работе исследованы *n*-гидроксилазная и N-деметиلاзная активности системы цитохрома P450, активность NO-синтазы; интенсивность образования оксида азота и супероксидного анион-радикала в митохондриальной, микросомальной и постмикросомальной фракциях клеток печени мышей в условиях отсутствия запасов ретиноидов.

Показано, что при отсутствии запасов ретиноидов происходит активация NO-синтазы на фоне снижения *n*-гидроксилазной активности системы цитохрома P450. Результаты анализа интенсивности генерации оксида азота и супероксидного анион-радикала указывают на повышенный уровень NO и O<sub>2</sub><sup>-</sup> в митохондриальной фракции нокаутных мышей, тогда как обеспеченность организма ретиноидами не влияет на NADPH-зависимое продуцирование O<sub>2</sub><sup>-</sup> в микросомальной фракции клеток печени мышей.

**Ключевые слова:** NO-синтаза, оксид азота, цитохром P450, витамин А, ретиноиды, печень.

**ВВЕДЕНИЕ.** Цитохромы P450 (КФ 1.14.14.1; CYP) обеспечивают окислительную биотрансформацию ксенобиотиков, а также липофильных биорегуляторных молекул-эндобиотиков [1]. Значительное количество изоформ CYP принимают участие в метаболизме ретиноидов и играют важную роль в гомеостазе ретиноевой кислоты [2, 3]. В тоже время ретиноиды способны прямо (через активацию промотора, содержащего RARE (retinoic acid responsive element) в комплексе с рецепторами ретиноевой кислоты (RAR, RXR) и пролифераторами пероксисом (PPAR)) или опосредованно (выступая в роли субстратов) индуцировать экспрессию определенных изоформ CYP [3, 4].

Сегодня в литературе обсуждается эффекторное влияние ретиноидов на синтез NO и экспрессию гена индуцибельной NO-синтазы [5-7]. NO-синтаза (КФ 1.14.13.39; NOS) принадлежит к семейству цитохром P450-подобных гемопротеинов, катализирующих реакцию образования цитруллина и NO<sup>•</sup> путем ферментативного окисления L-аргинина при участии NADPH в качестве донора электронов. Результаты экспериментальных исследований свидетельствуют как об ингибирующем [6], так и активирующем [7] влиянии ретиноевой кислоты на синтез оксида азота и экспрессию генов iNOS в зависимости от дозы [8]. Известно, что связывание NO с цитохромом P450 ингибирует энзиматическую активность изоформ 1A1 и 1A2 [9, 10].

\* - адресат для переписки

## ВЛИЯНИЕ ЗАПАСОВ РЕТИНОИДОВ НА АКТИВНОСТЬ ЦИТОХРОМА P450 И NO-СИНТАЗЫ

Цель работы – исследовать активность синтазы оксида азота, *n*-гидроксилазной и N-деметиلاзной активности цитохрома P450; интенсивность генерации NO<sup>•</sup> и супероксидного анион-радикала в митохондриальной, постмикросомальной и микросомальной фракциях клеток печени мышей в условиях отсутствия запасов ретиноидов.

**МЕТОДИКА.** Исследования проведены на мышах линии C57 массой 25-30 г в возрасте 2,5-3 месяца. Линии трансгенных животных любезно предоставлены профессором W.S. Blaner (Department of Medicine, Columbia University, New York).

Эксперименты проводили в соответствии с международными рекомендациями по “Европейской конвенции о защите позвоночных животных, используемых для исследовательских и научных целей” (Страсбург, 1986), “Общих этических принципов экспериментов на животных”, утвержденных Первым национальным конгрессом по биоэтике (Киев, 2001).

Опытные животные были разделены на группы: I группа (контроль) – животные, которые содержались на полусинтетическом рационе, сбалансированном по всем нутриентам (в том числе 30 МЕ витамина А в форме ретинилацетата). II группа (А-дефицитная) – животные, содержащиеся в течение 6 недель до начала эксперимента на полусинтетическом рационе, сбалансированном по всем нутриентам, но без витамина А [11]. Наличие маргинального авитаминоза по витамину А у животных этой группы определяли по ранее описанным морфологическим и биохимическим параметрам [12]. III группа (*Lrat*<sup>-/-</sup>) – животные, содержащиеся на сбалансированном по всем нутриентам полусинтетическом рационе, (в том числе 30 МЕ витамина А в форме ретинилацетата), не способные синтезировать ретинилэфиры вследствие отсутствия гена, кодирующего фермент лецитин-ретинол-ацилтрансферазу (LRAT, КФ 2.3.1.135) и поэтому полностью лишены запасов ретиноидов в печени [13].

Эвтаназию животных осуществляли под легким эфирным наркозом. Митохондриальную фракцию клеток печени получали по методу [14]. Микросомальную фракцию клеток печени получали по методу [15].

Степень загрязнения исследуемых фракций мембранами других компартментов контролировали путем сравнительного определения 5-нуклеотидазной активности как специфического маркера плазматических мембран, сукцинатдегидрогеназной активности как маркера внутренней мембраны митохондрий и глюкозо-6-фосфатазной активности – маркера мембран эндоплазматического ретикулума.

Показатели ферментативной активности системы цитохрома P450 оценивали по скорости деметилирования диметиланилина (N-деметилазная активность) и гидроксилирования анилина (*n*-гидроксилазная активность) по количеству образованного формальдегида и *n*-аминофенола, с учётом коэффициентов молярной экстинкции 1,5 мМ<sup>-1</sup>×см<sup>-1</sup> и 13,3 мМ<sup>-1</sup>×см<sup>-1</sup> при длине волны 412 нм и при 630 нм соответственно и выражали в нмоль/мин/мг белка [16].

Определение NO-синтазной активности в митохондриальной и постмикросомальной фракциях клеток печени проводили по методу [17]. Активность NOS определяли как разницу между показателями экстинкции субстратного и безсубстратного окисления NADPH и выражали в нмоль NADPH за 1 мин на 1 мг белка.

Интенсивность образования NO<sup>•</sup> оценивали по накоплению нитрит-аниона (NO<sub>2</sub><sup>-</sup>), который является стабильным метаболитом оксида азота [18]. Поскольку NO<sup>•</sup> – высокореакционная молекула с коротким периодом жизни – быстро инактивируется в оксидазной реакции с превращением в нитрит (NO<sub>2</sub><sup>-</sup>) или нитрат (NO<sub>3</sub><sup>-</sup>), который быстро метаболизируется, то уровень NO правомерно оценивать по изменению NO<sub>2</sub><sup>-</sup>.

Уровень генерации супероксидного анион-радикала в митохондриальной и микросомальной фракциях клеток печени мышей регистрировали, применяя тест с нитросиним тетразолием (НСТ) [19].

Концентрацию протеина определяли по методу Лоури [20].

Статистическую обработку экспериментальных результатов проводили с использованием пакета анализа данных в Microsoft Excel. Для определения достоверных различий между средними величинами использовали критерий Стьюдента (t). Различия считали статистически достоверными при  $p \leq 0,05$ .

**РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ.** Результаты проведенных исследований показали, что в микросомальной фракции клеток печени мышей, находящихся на диете, дефицитной по витамину А, наблюдается снижение *n*-гидроксилазной и N-деметилазной активностей цитохрома Р450 на 45% и 65% соответственно по сравнению с показателями контрольной группы животных (рис. 1).

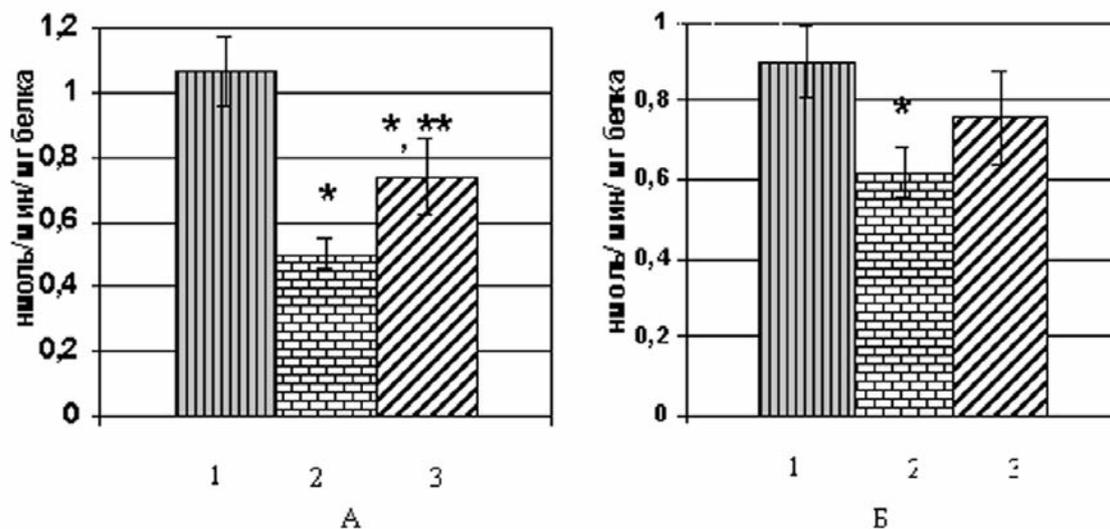


Рисунок 1.

*n*-Гидроксилазная (А) и N-деметилазная (Б) активности цитохрому Р450 микросомальной фракции клеток печени мышей при отсутствии запасов витамина А ( $M \pm m$ ,  $n=10$ )  
1 - контроль; 2 - витамин А-дефицитные животные; 3 - мыши *Lrat<sup>-/-</sup>*; \* - статистически достоверно по сравнению с контролем,  $p \leq 0,05$ ; \*\* - статистически достоверно по сравнению с показателями группы животных, находящихся на витамин А-дефицитной диете.

С одной стороны, микросомальные монооксигеназы, ведущими среди которых являются цитохромы Р450, катализируют первую фазу биотрансформации чужеродных веществ [1], с другой – превращают природные соединения в метаболиты, биологическая активность которых на порядки выше [21].

Метаболизм ретиноидов осуществляется изоформами цитохрома Р450 по механизму гидроксилирования [3]. Известно [22], что биосинтез ретиноевой кислоты – активной биологической формы витамина А – катализирует фермент ретинальдегидрогеназа (retinal dehydrogenase) (КФ 1.2.1.36) и цитохром Р450, находящийся в микросомальной фракции клеток печени.

Исследованиями, проведенными на белых нелинейных крысах показано, что снижение *n*-гидроксилазной и N-деметилазной активностей СYP может быть вызвано переходом цитохрома Р450 в неактивную Р420 форму вследствие накопления активных форм кислорода и свободнорадикальных продуктов [23], вызывающих окислительную модификацию SH-групп активного центра цитохрома Р450 за счёт неспецифических стрессовых реакций, возникающих вследствие алиментарной депривации витамина А в организм [24].

На печень приходится около 80% всех ретиноидов, присутствующих в организме. 70% из этих ретиноидов сохраняются в липидных каплях звездчатых клеток печени (клетках Ито) [25], тогда как гепатоциты играют важную роль в поглощении и превращении ретиноидов в печени, синтезе и секреции ретинол-связывающего белка (РСБ), необходимого для мобилизации ретиноидов, клетки Ито является центральным сайтом хранения ретиноидов.

## ВЛИЯНИЕ ЗАПАСОВ РЕТИНОИДОВ НА АКТИВНОСТЬ ЦИТОХРОМА P450 И NO-СИНТАЗЫ

Вероятно, снижение *n*-гидроксилазной активности CYP в печени нокаутных мышей (рис. 1А), обусловлено низким уровнем ретиноевой кислоты, вследствие отсутствия запасов витамина А, поскольку реакции гидроксилирования, происходящие с участием семейств изоформ CYP1A, CYP3A, CYP4A, CYP1B, CYP2C, CYP2S, индуцируются, в основном, ретиноидами [25].

Известно [22], что ретиноевая кислота – транскрипционно активная форма ретиноидов – вовлечена в регуляцию более 500 генов [22, 25]. Полностью-*транс*- и 9-*цис*-изомеры ретиноевой кислоты регулируют транскрипцию, связываясь с одним из шести ядерных рецепторов – рецепторами ретиноевой кислоты (RAR- $\alpha$ , - $\beta$  и - $\gamma$ ) и ретиноид X рецепторами (RXR- $\alpha$ , - $\beta$  и - $\gamma$ ). Все шесть из этих лиганд-зависимых транскрипционных факторов экспрессируются в печени [25]. Показано [3], что ретиноиды путем активации ядерных рецепторов RAR и RXR, проявляют модулирующее влияние на энзимные системы метаболизма ксенобиотиков и процессы их элиминации из организма. Вполне вероятно, что снижение *n*-гидроксилазной активности в печени мышей *Lrat*<sup>-/-</sup> нивелирует адекватную и своевременную инактивацию потенциально опасных липофильных молекул-эндобиотиков (стероидов, арахидонатов, ретиноидов и др.) и ксенобиотиков, что может приводить к снижению функции детоксикации печени как основного гомеостатического органа.

Данные литературы [9] показывают, что снижение энзиматической активности изоформ цитохрома P450 в печени может происходить при избыточном продуцировании NO<sup>•</sup> – продукта NO-синтазной реакции. Такое ингибирование активности CYP происходит тремя путями: при связывании NO с гемом и образовании нитрозильного комплекса с железом в активном центре энзима [26]; путём окисления SH-групп, которые являются функционально важными для фермента [10, 27], или в результате нитрования отдельных остатков тирозина [26], что приводит к деструкции энзимных систем цитохрома P450.

Результаты исследований показали, что в митохондриальной и постмикросомальной фракциях клеток печени мышей, находящихся на витамин А-дефицитной диете, наблюдается повышение NO-синтазной активности в 1,7 и 2,8 раза соответственно по сравнению с показателями животных, получающих рацион с физиологическим количеством витамина А (рис. 2).

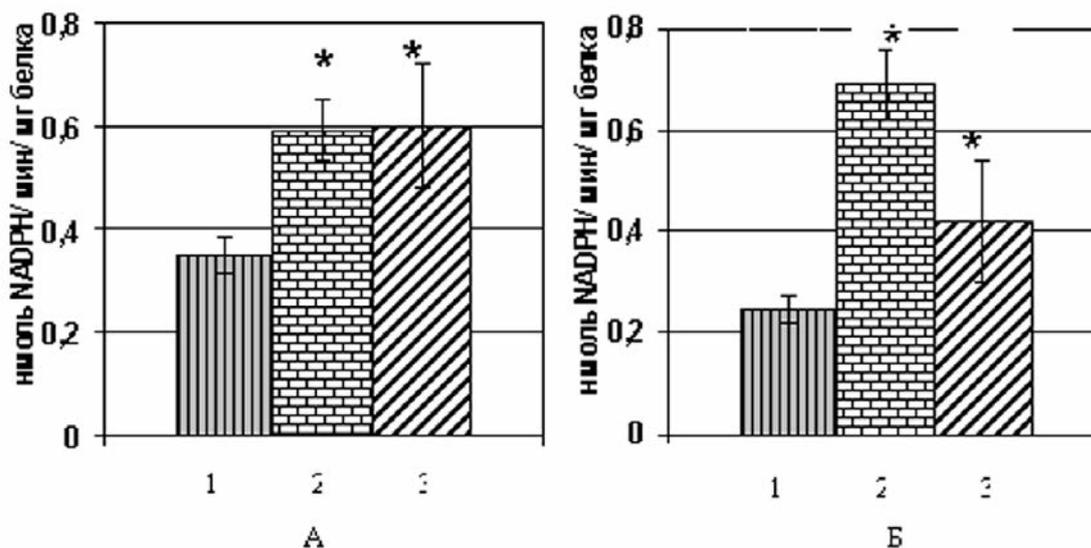


Рисунок 2.

NO-синтазная активность в митохондриальной (А) и постмикросомальной (Б) фракциях клеток печени мышей при отсутствии запасов витамина А ( $M \pm m$ ,  $n=10$ )

\*- статистически достоверно по сравнению с контролем,  $p \leq 0,05$ .

Данные литературы [7] свидетельствуют, что NO является эндогенным регулятором энергетики митохондрий и выступает в роли ингибитора митохондриального дыхания путём блокирования митохондриальной поры через связывание с функционально важными тиоловыми группами белков, а также опосредованно, с помощью регуляции мембранного потенциала митохондрий. Гиперпродукцией оксида азота также обусловлено ингибирование глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназы путём рибозилирования и нитрозилирования, что приводит к подавлению гликолиза, и как следствие, нарушению энергетического метаболизма [26, 27].

Наши предыдущие исследования [28] указывают на активацию синтазы оксида азота в митохондриальной и постмикросомальной фракциях клеток печени мышей, нокаутных по гену *Lrat* (рис. 2), что сопровождается интенсивным образованием NO<sup>•</sup> (рис. 3). По данным литературы [6], ретиновая кислота выполняет роль ингибитора экспрессии гена индуцибельной NO-синтазы и синтеза оксида азота. Вероятно, низкий уровень ретиновой кислоты в печени нокаутных мышей вследствие локального отсутствия запасов витамина А является причиной установленного нами повышения активности NOS и гиперпродукции NO.

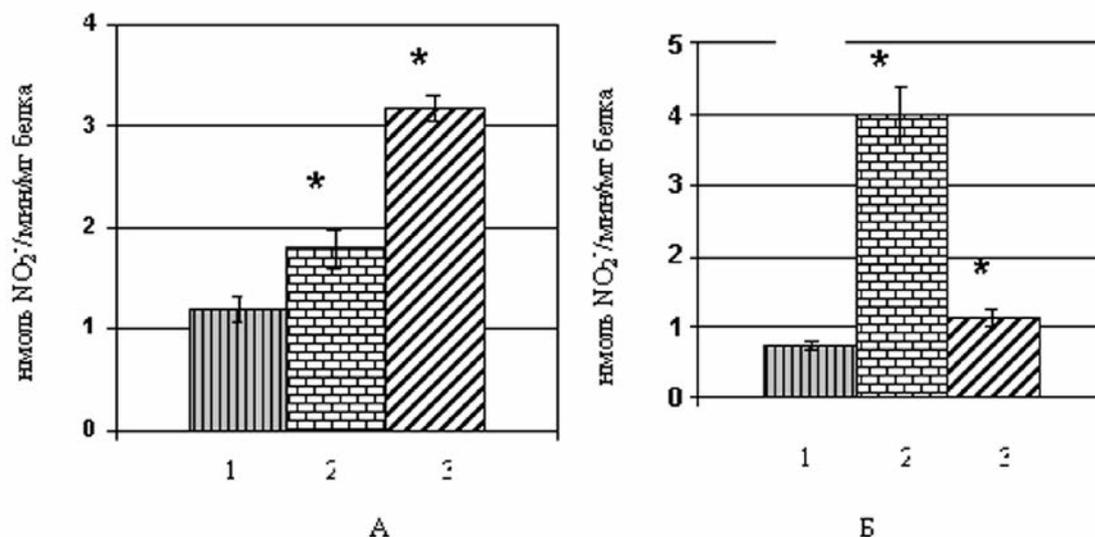


Рисунок 3.

Содержание NO<sub>2</sub><sup>-</sup> в митохондриальной (А) и постмикросомальной (Б) фракциях клеток печени мышей при отсутствии запасов витамина А (M±m, n=10).

\* - статистически достоверно по сравнению с контролем, p≤0,05.

Известно [29], что высокие концентрации оксида азота цитотоксичны вследствие связывания с супероксидными анион-радикалами и образования пероксинитрита (ONOO<sup>-</sup>), оказывающего отрицательное воздействие путём модификации тирозиновых остатков в структуре белков.

Предыдущими исследованиями показано, что отсутствие запасов ретиноидов сопровождается усилением NADH-зависимого продуцирование супероксидного анион-радикала в митохондриальной фракции (рис. 4А) [28] и не влияет на NADPH-зависимое продуцирование O<sub>2</sub><sup>-</sup> в микросомальной фракции клеток печени мышей (рис. 4Б).

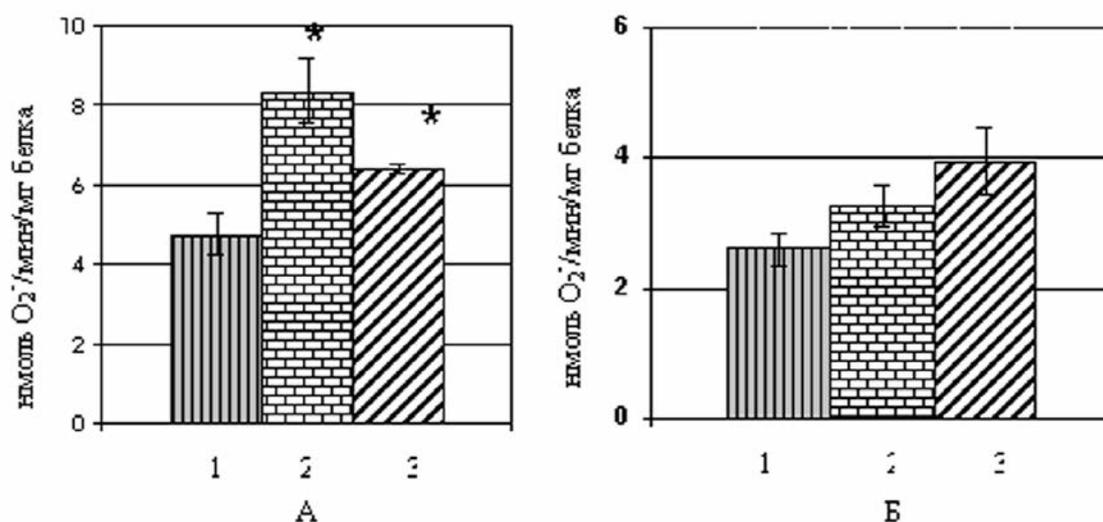


Рисунок 4.

Генерация O<sub>2</sub><sup>-</sup> в митохондриальной (А) и микросомальной (Б) фракциях клеток печени мышей при отсутствии запасов витамина А (M±m, n=10)

\* - статистически достоверно по сравнению с контролем, p≤0,05.

Известно [4], что основными продуцентами O<sub>2</sub><sup>-</sup> в микросомах является пероксо- и гидропероксожелезные комплексы цитохрома P450, возникающие в каталитическом цикле. NO-радикалы конкурируют с O<sub>2</sub> за связывание с гемом, являясь эффективными ингибиторами активности изоформ цитохрома P450 [1]. Вполне вероятно, что снижение активностей цитохрома P450 происходит за счёт активации NO-синтазы и интенсивного продуцирования NO в условиях отсутствия запасов ретиноидов.

**ЗАКЛЮЧЕНИЕ И ВЫВОДЫ.** Отсутствие запасов ретиноидов сопровождается активацией NO-синтазы и интенсификацией генерирования оксида азота, а также супероксидного анион-радикала с одновременным снижением *n*-гидроксилазной активности системы цитохрома P450 в микросомальной фракции печени мышей *Lrat*<sup>-/-</sup>.

## ЛИТЕРАТУРА

1. Ляхович В.В., Вавилин В.А., Зенков Н.К., Меньщикова Е.Б. (2005) Бюллетень СО РАМН, **118**(4), 7–12.
2. Lutz J., Dixit V., Yeung C. et al. (2009) *Biochem. Pharmacol.*, **77**, 258–268.
3. Murray M., Sefton M., Croft D. (2001) *J. Pharmacol.*, **134**, 1487–1497.
4. Cai Y., Dai T., Ao Y. et al. (2003) *Endocrinology*, **144**, 2311–2318.
5. Koerber K., Sass G., Kiemer A. (2002) *Hepatology*, **5**, 1061–1069.
6. Oh G., Pae H. (2001) *Immunopharm. Immunotoxicol.*, **23**, 335–342.
7. Takeuchi K., Hatazava R., Tanigami M. (2007) *Life Sci.*, **80**, 329–336.
8. Sirsjoa A., Gidlofa A. (2000) *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, **270**, 846–851.
9. Хаценко О. (1998) *Биохимия*, **63**, 984–991.
10. Lee Ch., Kim B., Li L. et al. (2008) *J. Biol. Chem.*, **283**, 889–898.
11. Reeves P., Nielsen F., Fahey G. (1993) *J. Nutr.*, **123**, 1939–1951.
12. Марченко М.М., Шмарakov И.А., Пасайлюк М.В. (2009) *Укр. биохим. журн.*, **81**(1), 89–98.
13. O'Byrne S. M., Wongsiriroj N., Libien J. et al. (2005) *J. Biol. Chem.*, **280**, 35647–35657.

14. Weinbach T.C. (1961) *Anal. Biochem.*, **2**, 335–343.
15. Schenkman J.B., Cinti D.L. (1978) *Methods Enzymol.*, **52**, 83–89.
16. Орехович В.Н. (ред.) (1977) *Современные методы в биохимии*. М.: Медицина, 386 с.
17. Mathias M.B., Werner H.B., Wacker E.R. (1991) *FEBS Lett.*, **288**, 187–190.
18. Hwang S., Lopez C.A., Heck D.E. et al. (1994) *J. Biol. Chem.*, **264**, 711–715.
19. Костенко В.А., Цебржинский О.И. (2000) *Физиол. журн.*, **46** (5), 56–61.
20. Lowry O.H., Rosebrough M.J., Farr A.L., Randal R.J. (1951) *J. Biol. Chem.*, **193**, 265–275.
21. Михайлова О.Н., Филиппенко М.Л., Тимофеева О.А., Каледин В.И., Гуляева Л.Ф., Ляхович В.В. (2003) *Биомед. химия*, **49**, 388–393.
22. Curley Jr R. (2012) *Biochim. Biophys. Acta*, **1821**, 3–9.
23. Марченко М.М., Копыльчук Г.П., Кеца О.В. (2010) *Биомед. химия*, **56**, 266–273.
24. Пентюк А.А., Дурнев А.Д., Матвийчук Н.В. и др. (1995) *Вестник РАМН*, №1, 3–9.
25. Shirakami Y., Lee S.A., Clugston R.D., Blaner W.S. (2012) *Biochim. Biophys. Acta*, **1821**, 124–136.
26. Осипов А.Н., Борисенко Г.Г., Владимиров Ю.А. (2007) *Успехи биол. хим.*, **47**, 259–292.
27. Блюм Я.Б., Красиленко Ю.А., Емец А.И. (2009) *Укр. биохим. журн.*, **81**(5), 5–15.
28. Копыльчук Г.П., Шмарakov И.А., Бучковская И.М., Рыбенчук А.А. (2010) *Биологические системы*, **2**(4), 25–28.
29. Szabo S., Ischiropoulos H., Radi R. (2007) *Nature Rev.*, **6**, 662–680.

Поступила: 09. 12. 2011.

**CYTOCHROME P450 SYSTEM COMPONENTS AND NITRIC OXIDE SYNTHASE  
ACTIVITY IN MOUSE LIVER UNDER CONDITIONS OF RETINOID STORES ABSENCE**

**G.P. Kopylchuk<sup>1</sup>, I.A. Shmarakov<sup>1</sup>, I.M. Buchkovska<sup>1</sup>, M.M. Marchenko<sup>1</sup>, W.S. Blaner<sup>2</sup>**

<sup>1</sup>Department of Biochemistry and Biotechnology, Chernivtsi National University, ul. Kotsyubynskogo, 2, Chernivtsi, 58000 Ukraine,

<sup>2</sup>Columbia University, Department of Preventive Medicine and Nutrition, College of Physicians and Surgeons, New York, USA, 10032; e-mail: ivannabuchkovska@mail.ru

*p*-Hydroxylase and N-demethylase activities of cytochrome P450 system, NO-synthase activity and the intensity of nitric oxide and superoxide anion production in mitochondrial, postmicrosomal and microsomal cellular fractions were studied in mouse liver under conditions of retinoid stores absence.

It is determined, that under conditions of retinoid stores absence the activation of NO-synthase is occurring with decreased *p*-hydroxylase activity of cytochrome P450 system. The results of the generation intensity analysis showed the level of NO and O<sub>2</sub><sup>-</sup> in liver mitochondrial fraction of knock-out mice, and changes in NADPH-dependent O<sub>2</sub><sup>-</sup> production in microsomal fraction of mouse liver cells.

**Key words:** NO-synthase, nitric oxide, cytochrome P450, vitamin A, retinoids, liver.