

КЛИНИКО-БИОХИМИЧЕСКИЕ ИССЛЕДОВАНИЯ

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ
УДК 612.015.1:577.152

ЦИТОХРОМ Р-450-ЗАВИСИМОЕ ГИДРОКСИЛИРОВАНИЕ И АКТИВНОСТЬ ГЛУТАТИОНЗАВИСИМЫХ ФЕРМЕНТОВ ПЕЧЕНИ ПРИ ЕЕ ХРОНИЧЕСКОМ ПОРАЖЕНИИ

Б.Н.МАТЮШИН, А.С.ЛОГИНОВ, В.Д.ТКАЧЕВ

ЦНИИ гастроэнтерологии, Москва

На биопсийном материале больных установлено подавление реакций цитохром Р-450-зависимого гидроксилирования и деметилирования в печени при ее хроническом поражении. Предполагается, что ингибирование системы цитохрома Р-450 вызвано окислительной модификацией белков-ферментов в условиях хронического процесса. Одновременно обнаружена активация глутатионзависимых ферментов, то есть усиление процессов конъюгирования и развития, следовательно, компенсаторных механизмов детоксикации при хронических заболеваниях печени.

Ключевые слова: хроническое поражение печени, глутатион-зависимые ферменты, цитохром Р450

Введение. Моноксигеназные ферменты со смешанной функцией или система цитохрома Р450 катализирует окисление эндогенных субстратов (холестерин, стероиды, жирные кислоты, жирорастворимые витамины, эйкозаноиды) и различных неполярных низкомолекулярных соединений, включая лекарственные препараты [1,2,3]. Основным типом реакций на цитохроме Р450 является микросомальное окисление вещества или фаза его гидроксилирования. Образующийся гидроксилированный метаболит и/или иные интермедиаты подвергаются конъюгированию с глутатионом, глюкуроновой или серной кислотой и аминокислотами, что определяется как фаза конъюгации. Указанные реакции в совокупности представляют метаболический механизм защиты клетки и являются, следовательно, важным звеном детоксицирующей системы печени. У человека оценка детоксицирующей функции печени проводится обычно по изучению показателей кинетики известного вещества, что косвенно отражает лишь стадию гидроксилирования и не дает полного представления об особенностях процессов инактивации при патологии гепатобилиарной системы [4].

В настоящей работе с помощью прямых микрометодов исследования материала пункционной биопсии была изучена активность ферментов как микросомального гидроксилирования, так и системы глутатиона при хронических заболеваниях печени, что позволило проанализировать состояние основных метаболических этапов детоксикации и охарактеризовать функциональную способность печени в условиях хронического процесса.

Методика. Обследован 41 больной с хроническими заболеваниями печени вирусного генеза. Изучение ферментов проведено в части материала пункционной биопсии печени (10-15 мг), полученной с диагностической целью. Энзиматическую активность определяли в постмитохондриальной фракции, полученной, как описано

ранее [5,6]. Микросомальное окисление в ткани печени оценивали по НАДФН-зависимому гидроксилированию анилина с образованием *p*-аминофенола и НАДФН-зависимому деметилированию аминопирина с реактивом Nash, рассчитывая активность в нмоль на 1 мг белка в 1 мин продукта реакции [7,8]. Активность глутатионтрансферазы (ГТ, КФ 2.5.1.18 Глутатин-S-алкил(арил)трансфераза) определяли фотометрически по скорости взаимодействия глутатиона с 1-хлор-2,4-динитробензолом, выражая содержание конъюгата в нмоль на 1 мг белка в 1 мин [9,10]. Глутатионпероксидазную активность (ГП, КФ 1.11.1.9 Глутатион: перекись водорода оксидоредуктаза) регистрировали по убыли глутатиона с H_2O_2 в качестве субстрата, а за ед. активности принимали количество фермента, необходимого для окисления 1 мкмоль восстановленного глутатиона на 1 мг белка [11]. Глутатионредуктазу (ГР, КФ 1.6.4.2 NAD(P)H: окислительный глутатион оксидоредуктаза) изучали по скорости окисления НАДФН в мкмоль на 1 мг белка в мин [12]. Содержание восстановленного глутатиона определяли по его конъюгации с реактивом Elmag и выражали в мкмоль на 1 г ткани [13]. Концентрацию белка определяли с реактивом Фолина. Статистическую обработку результатов проводили параметрическим методом с применением критерия Стьюдента.

Результаты и обсуждение. При хроническом поражении печени отмечено в целом уменьшение скорости микросомального гидроксилирования в зависимости от степени активности и выраженности патологического процесса (рис.). Относительно высокая активность гидроксилазы обнаружена при жировой дистрофии печени, а более низкая при активном циррозе печени (снижение на 47%). Отчетливое снижение гидроксилазной реакции выявлено также в группе с хроническим активным гепатитом. Обращает внимание выраженное угнетение гидроксилазы при первичном билиарном циррозе, то есть при нарушении оттока желчи. При этом степень подавления ферментативной активности соответствовала в основном выраженности реакции холестаза или стадии заболевания.

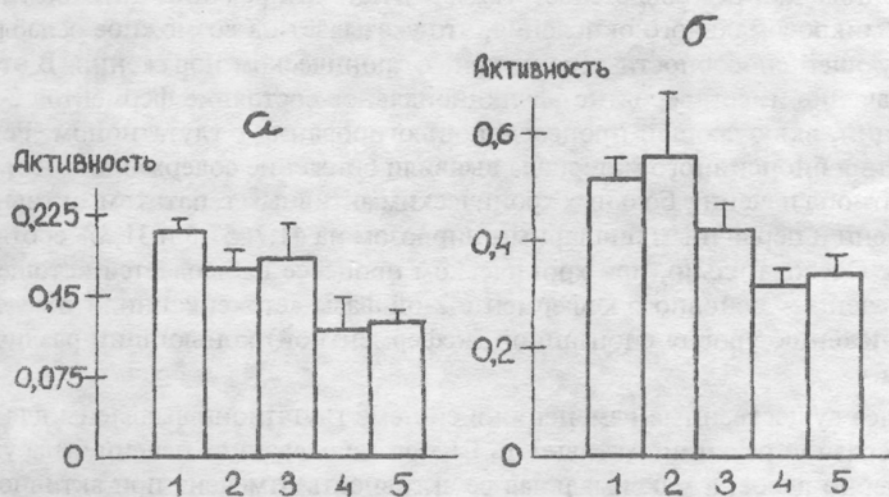


Рис. Активность цитохром Р-450-зависимых гидроксилазы (а) и деметилазы (б) (нмоль на 1 мг белка в 1 мин) печени при ее хроническом поражении

По оси абсцисс: 1 — жировая дистрофия печени; 2 — хронический активный гепатит; 3 — цирроз печени умеренной активности; 4 — цирроз печени активный; 5 — первичный билиарный цирроз

Реакция деметилирования, как известно, входит в систему деалкилирования и часто называется системой метаболизма лекарственных веществ, так как большин-

ство ее субстратов используется в медицинской практике [1]. В отличие от гидроксилазной, деметилазная активность была достоверно снижена только при циррозах печени. Более значительное угнетение процесса деметилирования обнаружено при циррозе печени в активной форме и первичном билиарном циррозе (уменьшение на 40,5 и 34,7% соответственно).

Таблица

Содержание глутатиона восстановленного и активность глутатионзависимых ферментов печени при ее поражении ($M \pm m$)

Группы больных и число наблюдений (n)	Глутатион	ГТ	ГП	ГР
Жировая дистрофия печени (n=7)	1,92±0,209	263±32	0,529±0,039	54,6±3,49
Хронический активный гепатит (n=12)	1,12±0,154*	485±28****	0,860±0,072***	63,9±6,39
Цирроз печени умеренной активности (n=12)	1,56±0,210	513±47***	0,663±0,077	58,0±4,86
Цирроз печени активный (n=4)	1,10±0,102**	634±106**	0,833±0,061***	74,9±9,22*
Первичный билиарный цирроз печени (n=6)	1,32±0,145*	228±39	1,115±0,079****	94,4±4,19****

Примечание. Достоверность различий приведена относительно жировой дистрофии печени

* — $P < 0,05$; ** — $P < 0,02$; *** — $P < 0,01$; **** — $P < 0,001$

Полученные данные свидетельствуют об угнетении реакции цитохром Р-450-зависимого микросомального окисления, что указывает на возможное ослабление детоксицирующей способности печени при ее хроническом поражении. В этой связи особое значение имеет, вероятно, функциональное состояние ферментов 2-ой фазы инактивации, включающей процессы конъюгирования с глутатионом. Результаты исследования биопсийного материала выявили снижение содержания восстановленного глутатиона печени у больных хроническим активным гепатитом, активным циррозом печени и первичным билиарным циррозом на 41,7; 57,3 и 31,3% соответственно (табл.). Следовательно, при хроническом процессе наблюдается истощение глутатиона печени — основного кофермента 2-ой фазы детоксикации, что ведет скорее всего к снижению уровня спонтанной (неферментной) конъюгации различных метаболитов.

Наиболее существенные изменения в системе глутатиона выявлены для глутатионтрансферазной реакции. Активность ГТ при заболеваниях печени была увеличенной примерно вдвое, а максимальная ее активность отмечена при активной форме цирроза (252%). При холестатических формах поражения печени (первичный билиарный цирроз) выявлена отчетливая тенденция угнетения трансферазной активности, что связано, вероятно, с конкурентным ингибированием ГТ билирубином в условиях нарушения желчевыделения [14]. Анализ гистограмм распределения ГТ выявил 3 варианта значений фермента при гепатобилиарной патологии: с низким, умеренно увеличенным и высоким уровнем активности, что соответствовало в целом результатам статистически доказанных различий между отдельными группами.

Активность глутатионпероксидазы (ГП), утилизирующей перекисные соединения (H_2O_2 , липоперекиси) по данным исследования гепатибиоптата больных была достоверно увеличенной при хроническом активном гепатите и активном циррозе печени на 62,6 и 57,5% соответственно. Скорость пероксидазной реакции при первичном билиарном циррозе была увеличена примерно вдвое. Сопоставление гистограмм распределения показателей активности ГП и содержания глутатиона выявило определенный параллелизм между активностью пероксидазной реакции и уровнем содержания глутатиона, что указывает на взаимосвязь изученных параметров в условиях развития хронического процесса.

Данные исследования глутатионредуктазы (ГР), регенерирующей окисленную форму глутатиона в восстановленную и играющей важную роль в функционировании всей системы глутатиона, выявили достоверное увеличение активности ГР при циррозе печени активной формы и первичном билиарном циррозе на 42,7 и 72,9% соответственно.

Полученные результаты свидетельствуют о подавлении реакции цитохром Р-450-зависимого гидроксилирования в печени при ее хроническом поражении. Инактивирование цитохрома Р-450 при вирусном воздействии может быть связано с влиянием интерферона и интерферониндуцирующих агентов [15,16]. Причем уровень снижения содержания цитохрома Р-450 совпадает с повышением активности ксантиноксидазы микросом печени [16]. Отсюда вероятна инактивация цитохрома Р-450 вследствие увеличения продукции радикалов кислорода ксантиноксидазной системой. Нельзя исключить также негативное влияние на окисление субстратов как 1-ого (аминопирин), так и 2-ого (анилин) типа перекиси водорода, накапливающейся при хронических заболеваниях печени [2,5,6]. Есть основания предположить, что подавление системы цитохрома Р-450 вызвано окислительной модификацией и/или дегградацией белков-ферментов в условиях хронического процесса. Активизация глутатионзависимых ферментов (ГП, ГР и особенно трансферазной реакции) печени указывает, вероятно, на развитие адаптационных и компенсаторных процессов, связанных с мобилизацией 2-ой фазы детоксикации, то есть усиленном процессах как конъюгирования, так и утилизации перекисных соединений в условиях угнетения цитохрома Р-450.

ЛИТЕРАТУРА

1. Арчаков А.И. Микросомальное окисление. -М., 1975
2. Карузина И.И., Бачманова Г.И., Арчаков А.И.//Вестник Российской АМН. -1995. N 2. -с.17-29
3. Guengerich F.P.//Ann.Rev.Pharmacol.Toxicol. -1989. -V.29. -P.241-264
4. Логинов А.С., Бендигов Э.А., Кельня Ж.А., Петраков А.В.//Тер.архив. -1987. N 2. -с.84-89
5. Логинов А.С., Матюшин Б.Н., Ткачев В.Д.//Вопр.мед.химии. -1991. -N 1. -с.31-33
6. Матюшин Б.Н., Логинов А.С., Ткачев В.Д.//Пат.физиол. -1992. -N 2. -с.41-42
7. Карузина И.И., Арчаков А.И.//Современные методы в биохимии. -М., 1977. -с.56-57
8. Карузина И.И., Бачманова Г.И., Менгазетдинов Д.Д. и др.//Биохимия. -1979. -Вып.6. -с.1049-1057
9. Habig W.H., Pabst H.J., Jakoby W.B.//J.Biol.Chem. -1974. -Vol.248. -P.7130-7139
10. Ogasawara T., Ohnhauser E.E., Hoensch H.P.//Res.Exp.Med. -1989. -V.189, N 3. -P.195-204

11. *Hafeman D.C., Sunde R.A., Hoekstra W.C.*//J.Nutr. -1974. -V.104, N 5. -P.580-587
12. *Carlberg I., Mannervik B.*//J.Biol.Chem. -1975. -V.1.250. -P.5476-5480
13. *Bauman P.F., Smith T.K., Bray T.M.*//Can.J.Physiol.and Pharmacol. -1988. -V.66, N 8. -P.1048-1052
14. *Percy-Robb I.W.*//Clin.Biochem.Hepatobiliary Diseases: Proc.Int.Satell.Symp.-Bologna. -1989. -P.1-15
15. *Deloria L., Abbot V., Gooderham N. et al.*//Bijchem.biophys.Res.Comm. -1985. -V.131. -P.109-114
16. *Ghezzi P., Bianchi M., Gianera L. et al.*//Cancer Res. -1985. -V.45. -P.3444-3447.

CYTOCHROME P-450-DEPENDENT HYDROXYLATION AND ACTIVITY OF GLUTATHION-DEPENDENT LIVER ENZYMES IN PATIENTS WITH CHRONIC LIVER DISEASES

Matyushin B.N., Loginov A.S., Tkachev V.D.

Central Research Institute of Gastroenterology, Moscow

Repression of cytochrom P-450-dependent hydroxylation and demethylation in liver was demonstrated in biopats of patients with chronic liver diseases. The inhibition of cytochrome P450 system was provoked by oxidative modification of proteins-enzymes in patients with chronic liver changes as was proposed at the same time. The activation of glutathione-dependent enzymes was revealed. So the intensification of conjugation and development processes was revealed as the compensation mechanisms of detoxication with chronic liver diseases.

Key words: chhronic liver disease, glutathione-dependent enzymes, cytochrome P450.