

АКТИВНОСТЬ МОНООКСИГЕНАЗНОЙ И НИТРЕРГИЧЕСКОЙ СИСТЕМ В МИКРОСОМАХ ПЕЧЕНИ ПРИ ДЕЙСТВИИ НА ОРГАНИЗМ ИНДУКТОРОВ И ИНГИБИТОРОВ ЛЕКАРСТВЕННОГО МЕТАБОЛИЗМА

Функциональная активность гепатоцитов определяется состоятельностью ферментов монооксигеназной системы. Однако до сих пор нет ответа на вопрос, каким образом индукторы и ингибиторы монооксигеназы влияют на активность нитрергической системы. Известно, что маркерами активности последней являются оксид азота (NO), эндотелиальная (eNOS) и индуцибельная NOS (iNOS) NO-синтаза и пероксинитрит (ONO₂-). Исследования проводились на 48 белых беспородных крысах-самцах массой 180-250 г, которых разделили на серии и группы в зависимости от условий опыта. Выявленные корреляционные связи между показателями монооксигеназной системы и NOS свидетельствуют об их четкой обоюдной функциональной зависимости, которая, к сожалению, до сих пор не учитывается в экспериментальной и клинической фармакологии, а также при терапии больных, в курс лечения которых назначают индукторы и ингибиторы лекарственного метаболизма.

Ключевые слова: монооксигеназная система, нитрергическая система, лекарственный метаболизм.

В последние годы исследователи проявляют интерес к межсистемным и межорганым взаимосвязям на уровне жизнедеятельности клетки, особенно в органах, ответственных за функционирование всего организма, поддержание его гомеостаза при всевозможных патологических ситуациях, возникающих как внутри организма, так и на фоне привнесенных в него извне причин [1,2]. Из-за особого структурно-функционального положения и значения печени особое место отводится гепатоцитам, поскольку их функционирование подвергается постоянному влиянию эндогенно образующихся и экзогенно поступающих ксенобиотиков [3,4]. Печеночная паренхима обладает способностью нивелировать все эти угрозы. Функциональная активность гепатоцитов определяется состоятельностью ферментов монооксигеназной системы [5,6]. Физиологическая стабильность и гибкая приспособляемость этой системы в полной мере можно оценить и проследить на фоне применения индукторов или ингибиторов лекарственного метаболизма. Доказано, что первые повышают активность монооксигеназ, а вторые, напротив, снижают их активность [7,8]. Однако до сих пор нет ответа на вопрос, каким образом индукторы и ингибиторы монооксигеназы влияют на активность нитрергической системы. Уже известно, что маркерами активности последней являются оксид азота (NO), эндотелиальная (eNOS) и индуцибельная NOS (iNOS) NO-синтаза и пероксинитрит (ONO₂-) [9,10].

Цель исследования – изучение активности монооксигеназы и параметров NO-системы в микросомах гепатоцитов на фоне действия индуктора бензонала и ингибитора циметидина.

Материал и методы. Исследования проводились на 48 белых беспородных крысах-самцах массой 180-250 г, которых разделили на серии и группы в зависимости от условий опыта. Первая серия – группы животных, которым в течение 6 суток внутрижелудочно вводили 1% водную суспензию бензонала в дозах 25, 50 и 100 мг/кг; вторая – группы животных, которым внутрижелудочно вводили 1% водный раствор циметидина в аналогичных дозах. Животные содержались в стандартных условиях вивария и рационе кормления. Забой экспериментальных крыс, находившихся под рауш-наркозом, проводили посредством мгновенной гильотинной декапитации. В выделенных с помощью препаративной ультрацентрифуги VAC-601 (Германия) при 105000g микросомальных фракциях ткани печени определяли на двухлучевом спектрофотометре с компьютерной обработкой типа UV-2100 (Ltd, Китай) содержание цитохромов P-450, P-448, P-420 и b5 классическим методом Т. Omura, R.Sato [11]; активность микросомальных ферментов: НАДФН-цитохром с-редуктазу (НАДФН-цит.с-ред.) по С.Н. Williams, Н. Kamin [12]; бенз(а)пи-ренгидроксилазу (Б(а)ПГ) – по С.Н. Yang, Л.Р. Kicha [13]; N-деметилазу амидопирин (N-АП) – по А. Bast, J. Nordhosck [14]; анилингидроксилазу (АГ) – по А.И. Арчакову и соавт. [15]; глюкоза-6-фосфатазу (Г-6-Фаза) – по N.S. Gnosh, N.C. Kar [24]; микросомальный белок (мг/мл) – по О.Н. Lowry и соавт [16].

Одновременно в выделенных микросомах и в сыворотке крови определяли содержание NO по основным стабильным его метаболитам - NO₂- и NO₃- по методу П.П. Голикова и соавт. [17]; активность eNOS – по В.В. Сумбаевой, И.М. Ясинской [22]; активность iNOS и концентрацию пероксинитрита (ONOO-) – по М.Ю. Раваевой, Е.Н. Чуян [18].

Полученные данные обрабатывали методом вариационной статистики. Достоверными считали результаты, удовлетворяющие $p < 0,05$.

Результаты и обсуждение. Действие бензонала характеризовалось дозозависимым повышением активности всех изучаемых ферментов монооксигеназной системы (Таблица 1).

Одновременно существенно изменялись показатели NO-системы. При этом в дозах 25 и 50 мг уровень NO, активность eNOS повышались, а активность iNOS и содержание ONO₂-, напротив, снижались. В дозах 75 и 100 мг/кг, наряду с повышением уровня NO и активности eNOS, наблюдалось статистически значимое возрастание активности iNOS и содержания ONO₂- (Таблица 2).

При введении животным циметидина, по мере увеличения его дозы с 10 до 100 мг/кг, отмечалось постепенное угнетение количественных показателей цитохромов P-450, b5, активности ферментов N-АП, АГ. Ферменты НАДФН-цит. с-ред и Г-6-Фаза в дозах 10 и 25 мг/кг практически оставались в пределах контрольных значений, а в дозах 75-100 мг/кг снижались (Таблица 2).

При использовании циметидина в дозах 10 и 25 мг/кг уровень NO и активность (eNOS конститутивной) повышались; одновременно увеличивалась экспрессия iNOS и ONO₂-. В дозах 75 и 100 мг/кг при сохранении высокого уровня NO и активности eNOS (на уровне действия препарата в дозе 10-25 мг/кг) активность iNOS и

содержание ONO₂- динамично возрастали. Следовательно, реакция систем цитохрома P-450 и NOS в микросомах печеночной ткани неоднозначна на действие различных по своей химической природе ксенобиотиков.

Таблица 1 - Активность монооксигеназ в микросомах печени крыс при действии бензонала и циметидина, M±m

Серия и группа	Монооксигеназная система						
	цитохром, нмоль/мг			НАДФН-цит. сред., нмоль/мин/мг	АГ, нмоль/мин/мг	Н-АП, нмоль/мин/мг	Г-6-Ф аза, нмоль Р неорг./мин/мг
	P-450	P-420	в 5				
1 сер. Бензонал, мг/кг 25	1,18±0,034*	0,0	0,73±0,024*	131,4±4,865*	1,04±0,026*	6,21±0,199*	90,9±3,654*
50	1,39±0,025*	0,0	0,86±0,026*	150,5±4,358*	1,21±0,017*	7,33±0,192*	103,9±3,772*
75	1,68±0,021*	0,0	0,95±0,025*	178,0±6,942*	1,48±0,033*	8,74±0,203*	120,7±3,987*
100	2,10±0,081*	0,041±0,001	1,11±0,030*	248,7±7,712*	1,93±0,065*	10,92±0,339*	134,7±5,254*
2 сер. Циметидин 10	0,81±0,025*	0,084±0,003*	0,57±0,013*	107,3±3,650	0,71±0,020*	4,03±0,117*	78,6±2,201*
25	0,69±0,027*	0,101±0,002*	0,48±0,011*	105,1±3,473*	0,63±0,016*	3,20±0,106*	77,3±2,423*
75	0,52±0,014*	0,117±0,004*	0,41±0,012*	87,3±2,532*	0,52±0,014*	2,81±0,095*	60,9±1,775*
100	0,43±0,011*	0,156±0,008*	0,34±0,009*	68,1±2,247*	0,371±0,008*	1,77±0,052*	37,3±1,417*
Контрольная	0,97±0,031	0,036±0,001	0,63±0,026	106,9±3,955	0,88±0,023	4,85±0,151	79,8±3,056

Примечание: здесь и далее * - p<0,05 по сравнению с контролем

Таблица 2 - Активность NOS в микросомах печени крыс при действии бензонала и циметидина, M±m

Серия и группа	Нитрергическая система			
	NO, мкмоль/мг	eNOS, мкмоль/мин/мг	iNOS, мкмоль/мин/мг	ONO ₂ , мкмоль/мг
1 сер. Бензонал, мг/кг 25	6,45±0,238*	19,59±0,744*	0,080±0,002*	0,065±0,002*
50	8,17±0,272*	23,16±0,810*	0,070±0,002*	0,060±0,002*
75	9,08±0,306*	28,54±0,828*	0,12±0,003*	0,067±0,002*
100	13,1±0,458*	33,62±1,042*	0,15±0,003*	0,078±0,003*
2 сер. Циметидин 10	7,62±0,223*	20,83±0,558*	0,12±0,003*	0,089±0,002*
25	8,80±0,343*	24,77±0,781*	0,15±0,003*	0,093±0,002*
75	11,59±0,374*	22,90±0,842*	0,21±0,006*	0,105±0,003*
100	16,15±0,531*	25,61±0,721*	0,26±0,006*	0,119±0,003*
Контрольная	5,52±0,164	17,42±0,627	0,10±0,002	0,080±0,0016

Ответные биохимические проявления в этих системах зависят как от фармакологических свойств препарата, так и от введенной дозы. Свойственное бензоналу индуктивное действие на систему цитохрома P-450 [28], а также повышение содержания NO, экспрессия eNOS, проявляющиеся при введении малых доз индуктора (25-50 мг/кг), можно рассматривать с позиций необходимости увеличения контакта активного центра цитохрома P-450 с ксенобиотиками. Для этого необходим приток кислорода, который должен поступить в гепатоцит через механизмы усиления процессов микроциркуляции в печеночной ткани. Поэтому подъем активности eNOS и NO при индукции системы цитохрома P-450, по-видимому, связан с необходимостью усиления экспрессии ферментов монооксигеназной системы. Доказано, что увеличение eNOS и, соответственно, расслабляющего фактора эндотелия сосудов NO приводит к повышению процессов микроциркуляции и более эффективному обеспечению тканей кислородом [19,20]. В дальнейшем, с увеличением активности микросомальных ферментов, возрастает количество продуктов «летального синтеза», одним из элементов реализации которого является возрастание активированных форм кислорода, свободных радикалов, осуществляющих стимуляцию активности iNOS (неконститутивная форма

NOS) [21]. При этом активная зона iNOS с большей готовностью доступна к связыванию с кислородом и образованию радикала ONO₂-, обладающего цитотоксическим и мембранолитическим свойствами [22,23]. ONO₂- угнетает ферментативную активность систем жизнеобеспечения клетки, стимулирует лизосомальные ферменты, процессы ускоренного апоптоза и некроза [24]. Возрастание активности iNOS и ONO₂- в микросомах под действием индукторов лекарственного метаболизма, возможно, связано с истощением запасов аргинина, необходимого субстрата для синтеза NO, с участием изоформ цитохрома P-450 [25] и eNOS [26,27]. При назначении ингибиторов монооксигеназ повышение активности NO и eNOS, несомненно, обусловлено необходимостью обеспечения микросомальных ферментов кислородом. Но вместе с тем, аргинин как субстрат для активирования цитохрома P-450, в большей степени расходуется, по-видимому, для активации как eNOS, так и iNOS. При этом перенасыщение клеток NO и iNOS, возможно, в еще большей степени тормозит реакции ферментов системы цитохрома P-450. Возрастание активности iNOS как следствие гиперэкспрессии NO при высоких концентрациях циметидина (75, 100 мг/кг), происходит на фоне угнетения активности микросомальных ферментов НАДФН-цит. с-редуктазы и Г-6-Фазы – главных лимитирующих факторов функционирования цитохрома P-450 [28].

По-видимому, НАДФН-цит. с-редуктаза и Г-6-Фаза являются основными мессенджерами возможной взаимосвязи между системой цитохрома P-450 и NOS. Чтобы подтвердить эту гипотезу, нами изучены корреляционные отношения между НАДФН-цит. с-редуктазой, Г-6-фазой и цитохромом P-450 и активностью NOS, уровнем NO, активностью eNOS и iNOS и содержанием ONO₂-. Как видно из полученных данных, при назначении бензонала рост содержания цитохрома P-450, НАДФН-цит. с-редуктазы и Г-6-Фазы напрямую коррелирует ($p \leq 0,001$) с увеличением параметров NO и eNOS и противоположно ($p \leq 0,001$) – с экспрессией iNOS и ONO₂-. При назначении циметидина наблюдается отсутствие связи между сниженными параметрами НАДФН-цит. с-редуктазы и Г-6-Фазы и количеством цитохрома P-450 с уровнем NO, активностью eNOS, iNOS и ONO₂- при малых дозах препарата (от 10 до 25 мг/кг), обратная сильная зависимость угнетения активности ферментов монооксигеназ и степенью гиперэкспрессии NOS, ONO₂-, iNOS и прямая с угнетенной активностью eNOS при назначении высоких доз (75 и 100 мг/кг) циметидина.

Заключение. Таким образом, реакция монооксигеназных ферментов и NOS в микросомах при действии индуктора бензонала проявляется в синхронном режиме ее интенсификации. При действии ингибитора монооксигеназной системы циметидина угнетение скорости реакций монооксигеназ характеризуется нарастанием активности NOS как за счет ее конститутивной (eNOS), так и неконститутивной (iNOS) с одновременным повышением в микросомах содержания NO и ONO₂-. Выявленные корреляционные связи между показателями монооксигеназной системы и NOS свидетельствуют об их четкой обоюдной функциональной зависимости, которая, к сожалению, до сих пор не учитывается в экспериментальной и клинической фармакологии, а также при терапии больных, в курс лечения которых назначают индукторы и ингибиторы лекарственного метаболизма

Выводы.

1. Монооксигеназная и NOS- системы синхронно стимулируются в микросомах печени при назначении индуктора лекарственного метаболизма бензонала с увеличением дозы от 25 до 100 мг/кг
2. При назначении ингибитора монооксигеназной системы циметидина снижение экспрессии ферментов системы цитохрома P-450 происходит на фоне экспрессии NO, конститутивной и неконститутивной форм NOS – eNOS и iNOS, значительного увеличения уровня пероксинитрита ONO₂-.
3. Выявленная корреляция между ферментами монооксигеназной системы и NOS свидетельствует об их функциональной зависимости и ответной реакции при действии на организм различных по природе этиологических факторов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- 1 Ванин А.Ф. Оксид азота – регулятор клеточного метаболизма // Соросовский образоват. - 2001. – №11. – С. 7-12.
- 2 Minamiyama Y, Jmaoka S, Takemura S. et al. Escape from tolerance of organic Nitrite by induction of cytochrome P450// Free Radical Biology et Medicine. – 2001. – Vol.31. - №11. – P. 1498-1508.
- 3 Durante W., Johnson F.K., Johnson R.A. Arginase: a critical regulator of nitric oxide synthesis and vascular function// Clin. Exp. Pharmacol. Pgsiol. – 2007. – Vol. 34. - №9. – P. 906-911.
- 4 Kuczeriszka M., Olszynski K.H., Gasioroeska A. et al. Interaction of nitric oxide and the cutochrome P-450 system on blood pressure and renal function in the rat: dependence on sodium intake// ActaPgsiologica. – 2011. – Vol. 201. - №4. – P. 493-502.
- 5 Саратиков А.С., Новожеева Т.П., Венгеровский А.И. Эффективность ферментиндуцирующих средств при экспериментальном поражении печени тетрахлорметанолом// Экспер. и клин.фармакол. – 2003. – №4. – С. 48-49.
- 6 Сивков А.С., Пауков С.В., Рувинов Ю.В., Кулес И.В. Индивидуальная безопасность фармакотерапии при оценке активности изофермента цитохрома P-450 3A4 (CYP3A4)// Клин.мед. – 2010. – №2. – С. 61-67.
- 7 Симон В.А. Цитохром P-450 и взаимодействие лекарственных веществ// Рос.журн. гастроэнтерол., гепатол., колопроктол. – 2002. – №6. – С. 25-30.
- 8 Getz G.S. Arginine/Arginase NO// Arteriosclerosis, Thrombosis and Vascular. Biol. – 2006. – Vol. 26. – P. 237-240.
- 9 Ляхович В.В., Вавилин В.А., Зенков Н.К., Меньщикова Е.Б. Активированные кислородные метаболиты в монооксигеназных реакциях// Бюл. СО РАМН. – 2005. – №4. – С. 7-12.
- 10 Манухина Е.Б., Дауни Х.Ф., Маллет Р.Т., Меньшев И.Ю. Защитные и повреждающие эффекты периодической гипоксии: роль оксида азота// Вестн. РАМН. – 2007. – №2. – С. 25-33.
- 11 Omura T., Sato R. The carbon monoxide-binding pigment liver microsomes. Evidence for its hemoprotein nature// J. Biol. Chem. -1964. -Vol. 230. - № 2. -P. 2370-2378.
- 12 Williams C.H., Kamin H. Microsomal triphosphopyridine nucleotide – cytochrome c-reductases of liver // J. Biol. Chem. - 1961. -Vol. 237. - № 2. -P. 587-595.
- 13 Yang C.H., Kicha L.P. A direct fluorometric assay of benzo(a)pyrene – hydroxylase// Analyt. Biochem. -1978. -Vol.84. – P.154-163.

- 14 Bast A., Nordhook J. Product inhibition during the hepatic N-demethylation of aminopyrine in the rat// Biochem. Pharmacol. -1981. -Vol. 30. - № 1. -P. 19-24.
- 15 Гидроксилирование производных анилина и аминокантипирина (1-фенил-2,3-диметил-аминопиразолон-5) в эндоплазматическом ретикулуме печени/ А.И. Арчаков, И.Н. Карузин, В.Н. Тверитапов, И.С. Кокарева// Биохимия. -1975. - Т.40. - Вып.1. - С.29-32.
- 16 O.H. Lowry, N.G. Rosenbrough, N.J. Farr, R.J. Randall Protein measurement with the Folin phenol reagent // J. Biol. Chem.- 1951.-Vol.193. - N1. - P.265-275.
- 17 Оксид азота и перекисное окисление липидов как факторы эндогенной интоксикации при неотложных состояниях/ П.П. Голиков, Н.Ю. Николаева, И.А. Гавриленко и др.// Пат. Физ. и эксп. тер. - 2000. -№2. - С.6-9.
- 18 Раваева М.Ю., Чуян Е.Н. Изменение активности системы синтеза оксида азота под действием низкоинтенсивного миллиметрового излучения// Ученые записки ТНУ им. В. И. Вернадского. Серия «Биология, химия». - 2011. - Т. 24 (63). - № 4. - С. 260-268.
- 19 Марков Х.М. Молекулярные механизмы дисфункции сосудистого эндотелия// Кардиология. - 2005. - №12. - С. 62-72.
- 20 Моисеев С.В. Лекарственная гепатотоксичность// Клин.фармакология и тер. - 2005. - №14 (1). - С. 10-14.
- 21 Зинчук В.В. Дисфункция эндотелия и кислородсвязывающие свойства гемоглобина// Кардиология. - 2009. - №7-8. - С. 81-89.
- 22 Лукьянова Л.Д. Роль биоэнергетических нарушений в патогенезе гипоксии// Пат.физиол. - 2004. - №2. - С. 2-11.
- 23 Покровский В.И., Виноградов Н.А. Оксид азота, его физиологические и патофизиологические свойства // Тер.арх. - 2005. - №1. - С. 82-87.
- 24 Лукьянова Л.Д., Дудченко А.М., Цыбина Т.А., Германова Э.Л. Регуляторная роль митохондриальной дисфункции при гипоксии и ее взаимодействие с транскрипционной активностью// Вестн. РАМН. - 2007. - №2. - С. 3-13.
- 25 Кукес В.Г., Сычев Д.А., Ших Е.В. Изучение биотрансформации лекарственных средств - путь к повышению эффективности и безопасности фармакотерапии // Врач. - 2007. - №1. - С. 2-5.
- 26 Арчаков А.И., Лисица А.В., Петушкова Н.А., Карузина И.И. Цитохромы Р-450, лекарственная болезнь и персонифицированная медицина. Ч. 1 // Клин.мед. - 2008. - №2. - С. 4-8.
- 27 Кукес В.Г., Сычев Д.А., Гасанов Н.А. Проблемы клинической фармакокинетики на современном этапе// Клин.мед. - 2007. - №2. - С. 58-63.
- 28 Райс Р.Х., Гуляева Л.Ф. Биологические эффекты токсических соединений. - Новосибирск: 2003. - 208 с.

У.Ж.САДЫРХАНОВА, К.Т.БАЙЖАНОВА, Г.Ж. САДЫРХАНОВА, Е.П. НЕСМЕЯНОВА
АҒЗАҒА ДӘРІЛІК МЕТАБОЛИЗМ ИНДУКТОРЛАРЫ МЕН ИНГИБИТОРЛАРЫНЫҢ ӘСЕРІНЕН БАУЫР
МИКРОСОМАЛАРЫНДАҒЫ МОНООКСИГЕНАЗА ЖӘНЕ НИТРЕРГИЯЛЫҚ ЖҮЙЕЛЕРДІҢ БЕЛСЕНДІЛІГІ

Түйін: Гепатоциттердің функциональді белсендігі монооксигеназды жүйенің ферменттік күйімен анықталады. Бірақ осы күнге дейін нитрергиялық жүйенің белсенділігіне монооксигеназаның индукторлары мен ингибиторлары қалай әсер етеді деген сұраққа жауап жоқ. Аталған жүйенің белсендік маркерлеріне азот тотығы (NO), эндотелиальдық (eNOS) мен индуцибельдық NOS (iNOS) NO-синтаза және пероксинитрит (ONO₂-) жататыны белгілі. Зерттеуге салмағы 180-250г құрайтын 48 ақ тексіз егеу құйрық-еркектер қолданылды. Олар тәжірибенің шарттарына тәуелді серия мен топтарға бөлінді.

Монооксигеназа жүйесі мен NOS көрсеткіштері арасында анықталған коррекциялық байланыс нақты функциональдық тәуелділік бар екендігін көрсетеді, өкінішке орай бұл байланыс экспериментальді және клиникалық фармакология, сонымен бірге науқастардың курстық емінде дәрілік метаболизмнің индукторлары және ингибиторларын тағайындауда ескерілмейді.

Түйінді сөздер: монооксигеназды жүйе, нитрергиялық жүйе, дәрілік метаболизм.

U.ZH. SADYRKHANOVA, K.T. BAIZHANOVA, G. ZH. SADYRKHANOVA, E.P. NESMEYANOVA
ACTIVITY OF MONOOKSIGENAZNOY AND NITRERGICHESKOY OF SYSTEMS IN MIKROSOMAKH OF LIVER AT
OPERATING ON ORGANISM OF INDUCTORS AND INHIBITORS OF MEDICINAL METABOLISM

Resume: Functional activity of hepatocitov is determined solvency of enzymes of the monooksigenaznoy system. However until now there is an answer for a question, how inductors and inhibitors of monooksigenaz influence on activity of the nitrergicheskoy system. It is known that by the markers of activity the last it is been oxide of nitrogen (NO), endothelial (enos) and inducibel'naya NOS (inos) No-sintaza and peroksinitrit (Ono₂-). Issledovaniya was conducted on 48 white not thoroughbred rats-males mass of 180-250 grammes which was divided on. The exposed cross-correlation connections between the indexes of the monooksigenaznoy system and NOS testify to their clear mutual functional dependence which, unfortunately, until now not taken into account in experimental and clinical pharmacology, and also at therapy of patients, in the course of treatment of which appoint inductors and inhibitors of medicinal metabolism.

Keywords: monooksigenaznaya system, nitrergicheskaya system, medicinal metabolism.