

НАУКОВІ ЧИТАННЯ
«АКТУАЛЬНІ ПИТАННЯ СУЧАСНОЇ БІОХІМІЇ КРИЗЬ
ПРИЗМУ ЧАСУ», ПРИСВЯЧЕНІ 80-РІЧЧЮ СТВОРЕННЯ
КАФЕДРИ БІОХІМІЇ ТА БІОТЕХНОЛОГІЇ
ЧЕРНІВЕЦЬКОГО НАЦІОНАЛЬНОГО УНІВЕРСИТЕТУ
ІМЕНІ ЮРІЯ ФЕДЬКОВИЧА

УДК 577.152.6:576

<https://doi.org/10.31861/biosystems2024.02.178>

ІНТЕНСИВНІСТЬ ОКИСНО-ВІДНОВНИХ ПРОЦЕСІВ В
ОКСИГЕНАЗНОМУ ТА РЕДУКТАЗНОМУ ЛАНЦЮГАХ
МОНООКСИГЕНАЗНОЇ СИСТЕМИ ПЕЧІНКИ ЩУРІВ З ДІЇ
ДИЕТИЛФТАЛАТУ

І. В. БАНАРЬ, О. В. КЕЦА

Чернівецький національний університет імені Юрія Федьковича
вул. Коцюбинського, 2, Чернівці, 58012
e-mail: o.ketsa@chnu.edu.ua

Проведено дослідження впливу введення різних доз диетилфталату (ДЕФ) на швидкість окислення-відновлення протеїнів оксигеназного та редуктазного ланцюгів мікросомної монооксигеназної системи (МОС) печінки щурів. Метою роботи було оцінити окисно-відновні перетворення цитохрому P450 (СУР) та цитохрому b₅ у мікросомній фракції печінки щурів за дії різних доз ДЕФ. Для дослідження використовували білих безпородних щурів масою 120-160 г, які утримувалися на харчуванні, збалансованому за всіма нутрієнтами із вільним доступом до води. Експериментальних тварин розділили на три групи: I група – інтактні тварини, які склали контрольну групу; II група – щурі, яким щоденно вводили ДЕФ у дозі 2,5 мг на кг маси тіла щурів; III група – щурі, яким щоденно вводили ДЕФ у дозі 5,4 мг на кг маси тіла щурів. У мікросомній фракції печінки визначали швидкість окислення-відновлення СУР та цитохрому b₅. Встановлено, що за умов надходження в організм ДЕФ у дозі 5,4 мг/кг підвищувалося окислення СУР вже на 14-у добу після початку введення ксенобіотика. Водночас, при введенні дози 2,5 мг/кг змін у швидкості окислення-відновлення СУР у цей період не спостерігалось. Триваліше введення ДЕФ (протягом 21-добу) сприяло суттєвішому підвищенню окислення СУР у мікросомній фракції печінки порівняно з двотижневим введенням ксенобіотика за умов введення двох досліджуваних доз. Показано, що на початкових етапах введення ксенобіотика активувалися окисно-відновні перетворення цитохрому b₅. Підвищення дози та термінів введення ДЕФ супроводжувалося зниженням передачі електронів в редуктазному ланцюзі МОС.

Ключові слова: цитохром P450, цитохром b₅, монооксигеназна система, мікросомна фракція, печінка, диетилфталат.

Вступ. Гідроксилування ксенобіотиків ізоформами цитохрому P450 (СУР) залежить від окисно-відновних процесів, які відбуваються в оксигеназному та редуктазному ланцюгах монооксигеназної системи (МОС) (Tursunova et al, 2021). Так, транспорт електронів на СУР здійснюється через NADPH-цитохром P450 редуктазу та цитохром b₅, який переносить електрони на п'ятому етапі монооксигеназного циклу. Будь-які зміни функціонування цитохрому b₅ в редуктазному ланцюзі МОС можуть відобразитися дисфункціонуванням СУР та його переходом у неактивну форму –

цитохром P420. Це, у свою чергу, знизить швидкість гідроксилування ксенобіотиків СУР (Cantú Reinhard et al, 2017).

Метаболізм ксенобіотиків у клітині може призвести до їх детоксикації або, навпаки, токсифікації, що супроводжуватиметься негативною дією утворених токсичних продуктів на компоненти МОС. До таких ксенобіотиків належить диетилфталат (ДЕФ), біотрансформація якого в печінці призводить до утворення токсичнішого метаболіту моноетилфталату (МЕФ), який може проявляти гепатотоксичну дію (James et al, 2023). Оскільки

ДЕФ додають до багатьох споживчих засобів як пластифікатор або ароматичний інгредієнт, то потрапляючи в організм, він може спричинити низку токсичних ефектів (Fioschetti et al, 2021), порушуючи окисно-відновні процеси в оксигеназному та редуцтазному ланцюгах МОС.

Мета роботи – оцінити окисно-відновні перетворення цитохрому P450 та цитохрому b₅ у фракції мікросом печінки щурів при введенні в організм різних доз ДЕФ.

Матеріали та методи. У роботі для дослідження використовували білих щурів, маса яких становила 120-160 г. Тварини утримувалися на харчуванні, збалансованому за всіма нутрієнтами, та мали вільний доступ до води. Усі маніпуляції з щурами здійснювали відповідно до етичних вимог та з врахуванням положень «Європейської конвенції про захист хребетних тварин, що використовуються для дослідних та наукових цілей» (Страсбург, 1986).

Для визначення впливу різних доз ДЕФ експериментальних тварин розділили на три групи: I група – інтактні тварини, які склали контрольну групу; II група – щури, яким щоденно вводили ДЕФ у дозі 2,5 мг на кг маси тіла щурів; III група – щури, яким щоденно вводили ДЕФ у дозі 5,4 мг на кг маси тіла щурів. Ксенобіотик вводили перорально протягом 21 доби. Евтаназію тварин проводили під легким ефірним наркозом через 14 та 21 доби після початку введення ДЕФ.

Швидкість окислення-відновлення цитохрому P450 та цитохрому b₅ визначали в мікросомній фракції печінки, яку виділяли методом низькошвидкісного центрифугування (Schenkman et al, 1978). Швидкість окислення мікросомного СУР та його перехід у цитохром P420 проводили за реєстрацією різних спектрів поглинання відновлених карбоксикомплексів досліджуваного гемопротеїну при довжині хвилі 420 нм і 450 нм. Реєстрацію показників здійснювали через кожні 3 хв протягом 21 хв. Швидкість окислення-відновлення СУР виражали в $\Delta A_{420-450}$ на нмоль цитохрому P450 (Shymanskyi et al, 2018). Інтенсивність відновлення цитохрому b₅ реєстрували за диференційним спектром поглинання при довжині хвилі 424 нм і 475 нм через кожні 30 сек протягом 2,5 хв та виражали в $\Delta A_{424-475}$ на мг протеїну. Визначення вмісту протеїнів у мікросомній фракції проводили за методом Лоурі (Lowry et al, 1951). Для статистичного аналізу результатів використовували t-критерій Стьюдента.

Результати та їх обговорення. Аналіз результатів показав, що введення в організм ДЕФ значною мірою впливає на окисно-відновні

процеси в оксигеназному ланцюзі МОС. Так, порівняльний аналіз введення різних доз ксенобіотика показав, що при введенні в організм ДЕФ у дозі 5,4 мг/кг спостерігалось підвищення окислення СУР вже на 14-у добу після початку введення ксенобіотика. Водночас, при введенні дози 2,5 мг/кг змін у швидкості окиснення-відновлення СУР не спостерігалось порівняно з показниками інтактних тварин (рис.1).

Триваліше введення ДЕФ (протягом 21-доби) сприяло суттєвішому підвищенню окислення СУР у мікросомній фракції печінки порівняно з двотижневим введенням ксенобіотика. Причому, інтенсифікація окислювальних процесів в оксигеназному ланцюзі МОС більшою мірою спостерігалась при введенні вищих доз ДЕФ (5,4 мг/кг). Підвищення окислення СУР супроводжується його конформаційними змінами, у результаті чого він переходить в неактивну форму – цитохром P420. Виявлена нами інтенсифікація окисної модифікації СУР знизить гідроксилювання субстратів I та II типу. Встановлені зміни можуть бути пов'язані зі змінами ліпідного бішару мембран ендоплазматичного ретикулуму (ЕР) печінки за дії ДЕФ (Mondal et al, 2020).

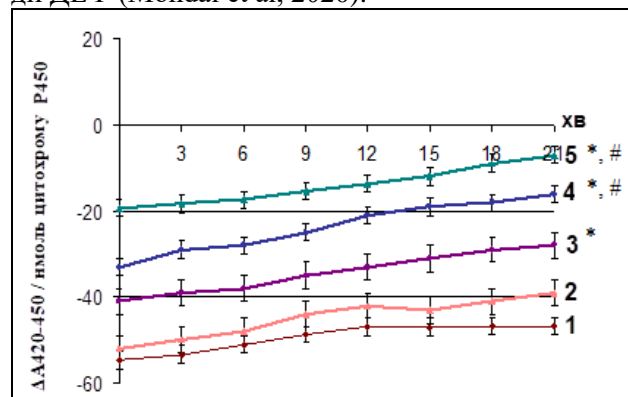


Рис.1. Швидкість інактивації мікросомного цитохрому P450 у печінці щурів за дії диетилфталату

Fig. 1. The rate of microsomal cytochrome P450 inactivation in rat liver under the action of diethylphthalate

Примітка (тут і на рис.2): 1 – контрольна група; 2 та 3 – тварини, яким ДЕФ вводили у дозі 2,5 мг на кг маси тіла тварин протягом 14 та 21 діб відповідно; 4 та 5 – щури, яким вводили ДЕФ у дозі 5,4 мг на кг маси тіла тварин протягом 14 та 21 діб відповідно; * – достовірна різниця у порівнянні з інтактними щурами ($P \leq 0,05$); # – достовірна різниця у порівнянні з показниками щурів, які отримували ДЕФ у дозі 2,5 мг/кг маси тіла тварин ($P \leq 0,05$).

Інтенсивність процесу гідроксилювання субстратів СУР також значною мірою

обумовлюється цитохромом b_5 , який є редокс-партнером у передачі електронів на СYP на п'ятому етапі монооксигеназного циклу.

Аналіз результатів досліджень показав, що в умовах двотижневого надходження ДЕФ у дозі 2,5 мг/кг не спостерігалось змін відновлення цитохрому b_5 , тоді як на 21-шу добу експерименту підвищувалися його окисно-відновні перетворення (рис.2).

Водночас, за дії ДЕФ на організм у дозі 5,4 мг/кг на 14-у добу спостерігалось підвищення швидкості окислення-відновлення цитохрому b_5 порівняно з показниками інтактних тварин, що вказувало на прискорення передачі електронів в редуказному ланцюзі МОС (рис.2). Ці зміни, поряд із прискоренням проходження монооксигеназного циклу можуть мати негативні наслідки, оскільки надлишок потоку електронів у редуказному ланцюзі може сприяти утворенню супероксидного радикала.

На 21-шу добу експерименту спостерігалось зниження швидкості окисно-відновного перетворення цитохрому b_5 за дії ДЕФ у дозі 5,4 мг/кг, що вказує на зниження передачі електронів на СYP (рис.2).

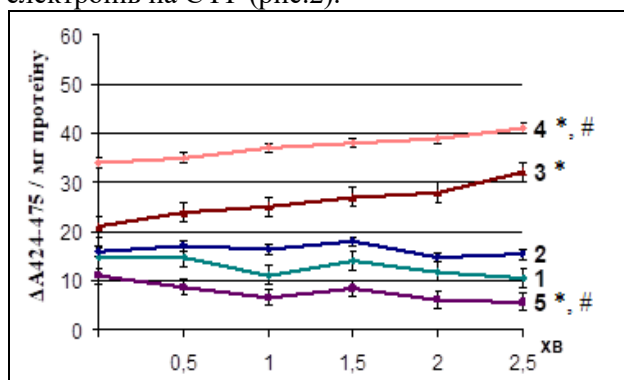


Рис.2. Швидкість окислення-відновлення мікросомного цитохрому b_5 у печінці щурів за дії диетилфталату

Fig. 2. The rate of reduction-oxidation of microsomal cytochrome b_5 in the liver of rats under the influence of diethyl phthalate

Встановлений факт, ймовірно пов'язаний зі структурними змінами в молекулі цитохрому b_5 та з його нездатністю вступати в окисно-відновні процеси за тривалого ведення високих доз досліджуваного ксенобіотика.

Висновки. Введення різних доз ДЕФ призводить до дисфункціонування в оксигеназному та редуказному ланцюгах МОС, яке проявляється підвищенням окислення СYP та його переходом в неактивну форму цитохром P420. На початкових етапах введення

ксенобіотика активуються окисно-відновні перетворення цитохрому b_5 . Водночас, підвищення дози та термінів введення ДЕФ супроводжується зниженням передачі електронів в редуказному ланцюзі, на що вказує зниження швидкості окислення-відновлення мікросомного цитохрому b_5 у печінці щурів.

Конфлікт інтересів. Авторами заявлено, що у дослідженнях відсутні комерційні або фінансові відносини, які можна було б вважати як конфлікт інтересів.

References:

1. Cantú Reinhard, F.G., De Visser, S.P. (2017) Biodegradation of cosmetics products: a computational study of cytochrome p450 metabolism of phthalates. *Inorganics*, 5, 77. <https://doi.org/10.3390/inorganics5040077>.
2. Fiocchetti, M., Bastari, G., Cipolletti, M., Leone, S., Acconcia, F., Marino, M. (2021) The peculiar estrogenicity of diethyl phthalate: modulation of estrogen receptor alpha activities in the proliferation of breast cancer cells. *Toxics*. 2021, 9(10), 237. doi: 10.3390/toxics9100237.
3. James, A.S., Eteng, O.E., Dosumu, O.A., Moses, C.A., Ogbonna, C.U., Adeleye, O.A. et al. (2023) Morin augmented myocardial eNOS/cGMP/PKG signaling pathway and abated oxidative and inflammo-apoptotic responses in diethyl phthalate and bisphenol-s co-exposed male albino rats. *Inflammation*, 46(1), 175-189. doi: 10.1007/s10753-022-01720-2.
4. Lowry, O.H., Rosenbrough, M.J., Farr, A.L., Rendal, R.J. (1951) Protein measurement with the folin phenol reagent. *J Biol Chem*, 193, 265-275.
5. Mondal, S., Mukherjee, S. (2020) Long-term dietary administration of diethyl phthalate triggers loss of insulin sensitivity in two key insulin target tissues of mice. *Hum Exp Toxicol*, 39(7), 984-993. doi: 10.1177/0960327120909526.
6. Schenkman, J.B., Cinti, D.L. (1978) Preparation of microsomes with calcium. *Methods in Enzymology*, 52, part c: 83-89.
7. Shymanskyi, I.O., Ketsa, O.V., Marchenko, M.M., Veliky, M.M. (2018) Liver cytochrome P450-hydroxylation system of tumor-bearing rats under the influence of ω -3 polyunsaturated fatty acids and vitamin D3. *Ukr Biochem J*, 90(4), 36-44. <https://doi.org/10.15407/ubj90.04.036>
8. Tursunova, N.V., Syrov, V.N., Khushbaktova, Z.A., Tomuev, Y.V., Klinnikova, M.G. (2021) Monooxygenase system and NO metabolism in liver microsomes of rats with toxic hepatitis and the effect of sesquiterpene lactones. *Bull Exp Biol Med*, 172(2), 133-136. doi: 10.1007/s10517-021-05349-3.

INTENSITY OF OXIDIZING AND REDUCING PROCESSES IN THE OXYGENASE AND REDUCTASE CHAINS OF THE MONOOXYGENASE SYSTEM OF RATS LIVER UNDER THE ACTION OF DIETHYLPHTHALATE

I. V. Banar, O. V. Ketsa

Yuriy Fedkovych Chernivtsi National University,
Ukraine, 58012, Chernivtsi, Kotsiubynsky 2 Str.
e-mail: o.ketsa@chnu.edu.ua

The paper investigated the effect of different doses of diethyl phthalate (DEF) on the functional state of the components of the oxygenase and reductase chains of the monooxygenase system (MOS) in the microsomal fraction of the liver. The aim of the work was to evaluate redox transformations of cytochrome P450 (CYP) and cytochrome b5 in the microsomal fraction of rat liver under the influence of different doses of DEF. For the study, white outbred rats weighing 120-160 g were used, which were kept on a nutritionally balanced diet with free access to water. Experimental animals were divided into three groups: Group I - control (intact animals); II group – rats that were injected with DEF at a dose of 2.5 mg/kg of animal body weight; Group III - rats that were injected with DEF at a dose of 5.4 mg/kg of animal body weight. The rate of reduction-oxidation of CYP and cytochrome b5 was determined in the liver microsomal fraction. It was established that under the conditions of administration of DEF at a dose of 5.4 mg/kg, CYP oxidation increased already on the 14th day after the start of administration of the xenobiotic. At the same time, when a dose of 2.5 mg/kg was administered, no changes in the rate of reduction-oxidation of CYP were observed during this period. Longer administration of DEF (within 21 days) contributed to a more significant increase in CYP oxidation in microsomal fractions of the liver compared to a two-week administration of the xenobiotic under the conditions of administration of the two tested doses. It was shown that redox transformations of cytochrome b5 were activated at the initial stages of xenobiotic administration. An increase in the dose and timing of DEF administration was accompanied by a decrease in the transfer of electrons in the reductase chain of MOS.

Key words: cytochrome P450, cytochrome b5, monooxygenase system, microsomal fraction, liver, diethyl phthalate

Отримано редколегією 19.10.2024

ORCID ID

Оксана Кеца: <https://orcid.org/0000-0002-2695-1790>