УДК 577.16.02: 616.832-004.2.: 616-002.2

ВИКОРИСТАННЯ ВІТАМІНІВ ДЛЯ КОРЕКЦІЇ ФУНКЦІОНАЛЬНОГО СТАНУ ЦИТОХРОМ Р450-ЗАЛЕЖНИХ СИСТЕМ В УМОВАХ ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНОГО АЛЕРГІЧНОГО ЕНЦЕФАЛОМІЄЛІТУ

Е. П. ПАСІЧНА[1], Г. В. ДОНЧЕНКО[1], А. П. БУРЛАКА[2], В. С. НЕДЗВЕЦЬКИЙ[3], Є. П. СИДОРИК[2], І. І. ГАНУСЕВИЧ[2], Н. В. ДЕЛЕМЕНЧУК[1]

[1]Інститут біохімії ім. О. В. Палладіна НАН України, Київ;
[2]Інститут експериментальної патології, онкології та радіобіології ім. Р. Є. Кавецького НАН України, Київ,
[3]Національний університет імені Олеся Гончара, Дніпропетровськ, Україна;
e-mail: ellapasich@gmail.com

Відомо, що прозапальні цитокіни, рівень яких значно підвищується під час патогенезу розсіяного склерозу (РС), та інтерферон-β, що застосовується для лікування автоімунних захворювань, здатні пригнічувати цитохром Р450-залежні процеси детоксикації та біотрансформації. Неконтрольоване зниження активності цих процесів може негативно позначатися на стані хворих, тому актуальним є вивчення функціонального стану системи цитохрому Р450 та розробка ефективних засобів для його регуляції.

Досліджували дію вітаміну D_3 та ефективність його комплексу з вітамінами B_1, B_2, B_6, PP, E, α-ліпоєвою, α-ліноленовою кислотами та мінеральними речовинами (Mg, Zn, Se) у попередженні змін функціонального стану цитохром Р450- та b_5-залежних систем ендоплазматичного ретикулума в головному мозку та печінці щурів за експериментального алергічного енцефаломієліту (ЕАЕ), моделі РС. Було показано, що за розвитку ЕАЕ відбувається істотне зниження вмісту цитохромів як у мозку, так і в печінці, при цьому в мікросомах мозку відбувається зниження активності NADH- та NADPH-оксидоредуктаз, необхідних для відновлення цих цитохромів і спряжених з монооксигеназами. Ці зміни свідчать про порушення редокс-стану і функціональної здатності цитохромзалежних систем в досліджуваних тканинах тварин. Засосування вітаміну D_3 окремо та у складі експериментально підібраної нами композиції біологічно активних речовин ефективно усуває зниження рівня цитохромів та активності NADH-оксидоредуктази в тканинах хворих тварин. Нормалізація цих порушень, очевидно, пов'язана із антиоксидантними та мембраностабілізаційними властивостями застосованих речовин, відновленням порушеного обміну речовин, а також зі здатністю знижувати активність реакцій запалення і регулювати цитокіновий фон в організмі щурів в умовах ЕАЕ. Досліджуваний комплекс біологічно активних речовин у разі застосування, виявився ефективнішим для нормалізації визначених порушень, ніж вітамін D_3 і тому окремо привертає до себе увагу як композиція для профілактики загострень і поліпшення стану хворих на РС та інші хвороби, що супроводжуються гіперактивацією імунної системи.

Ключові слова: розсіяний склероз, монооксигенази, цитохром Р450, цитохром b_5, вітамін D_3, вітамін Е, нікотинамід, тіамін (вітамін B_1), рибофлавін (вітамін B_2), піридоксин (вітамін B_6), активні форми оксигену, оксидативне пошкодження, запалення, цитокіни, нейроспецифічні антитіла.

Розсіяний склероз (РС) — хронічне запалювальне захворювання центральної нервової системи (ЦНС), що характеризується локально та дифузно розташованими осередками демієлінізації та нейродегенерації [1]. Молекулярні механізми виникнення й розвитку цієї хвороби і досі залишаються нез'ясованими, хоча останнім часом в цьому напрямі зроблено крок уперед завдяки дослідженням *in vivo* на моделі РС, так званому експериментальному алергічному енцефаломієліті (ЕАЕ), що є найадекватнішою моделлю автоімунних захворювань ЦНС людини.

На сьогодні відомо, що захворювання має автоімунну природу, а саме в молекулярних механізмах ушкодження ЦНС центральне місце займає цитокіноопосередкована активація клітин імунної системи та гліальних клітин ЦНС [2], що зумовлює багато патомеханізмів

в умовах РС, включаючи демієлінізацію аксонів та їх деструктивні зміни, а також апоптоз олігодендроцитів і нейронів. При цьому імунологічна атака на компоненти мієліну здійснюється активованими макрофагами, Т-клітинами та специфічними автоантитілами.

Із РС пов'язують підвищену продукцію таких прозапальних цитокінів, як фактор некрозу пухлини-α (TNF-α), інтерлейкіни-1, 2, 6, 11 (IL-1,2,6,11) та інтерферон-γ (IFN-γ) [3]. Саме ці цитокіни, як відомо, мають здатність пригнічувати експресію різних ізоформ цитохром *P*-450-залежних монооксигеназ в ендоплазматичному ретикулумі клітин різного типу [4]. Таку саму інгібуючу здатність виявляє й IFN-β [5], що зазвичай застосовується для імунотерапії РС. При цьому зниження детоксикаційної та біотрансформуючої здатності організму часто не враховують під час лікування РС. Таке неконтрольоване зниження метаболізаційних функцій печінки, а, можливо, й мозку, може призводити до накопичення екзо- і ендотоксинів, особливо в умовах масивної медикаментозної терапії, що позначається на розвитку багатьох ускладнень і погіршенні стану хворих. Отже, виникає нагальна необхідність вивчення на моделях *in vivo* та *in vitro* ролі змін системи цитохрому Р450 у патогенезі РС та можливості модулювати її, використовуючи біологічно активні речовини з метою розробки ефективного препарату, що запобігатиме розвитку загострень та ускладнень під час лікування хворих.

Система цитохром Р450-залежних монооксигеназ, що знаходиться в ендоплазматичному ретикулумі клітин евкаріот, включає в себе цитохром Р450 та спряжений з ним ланцюг транспорту електронів. Цитохром Р450 є унікальним гемопротеїном, що забезпечує зв'язування молекули субстрату безпосередньо з активованим оксигеном, призводячи до утворення окисленого, більш гідрофільного продукту та молекули води. Активація і включення оксигену в молекулу субстрату відбувається внаслідок циклічних окислювально-відновних перетворень іонів заліза у складі гему цитохрому Р450, електрон до якого передається через флавопротеїн NADPH-P450-редуктазу та цитохром b_5 [6]. Завдяки своїм унікальним властивостям цитохром Р450-залежні монооксигенази є однією з найважливіших гомеостатичних систем в організмі, що виконують дві основні функції: біотрансформації ксенобіотиків та окислювальної біотрансформації (біосинтез чи біодеградація) ендогенних ліпофільних молекул-ендобіотиків – стероїдів, арахідонатів та інших жирних кислот, холестеролу, жовчних кислот, вітамінів (A, D, PP), нейротрансмітерів, простагландинів та ін. Тому зниження їхньої активності може спричинити небажані зміни метаболізму в умовах хвороби. Зокрема, утворення активної форми вітаміну D_3 відбувається за участю цитохрому Р450 і недостатність гідроксилюючої здатності печінки й нирок може призводити до D-гіповітамінозу в організмі хворих.

Інгібіторний ефект більшості прозапальних цитокінів на цитохром Р450 в основному реалізується на претрансляційному рівні, тобто вони опосередковано знижують рівень мРНК, що кодує його апоензимну частину [4, 7–8]. Крім того, цитокіни призводять до значного зростання рівня активних метаболітів оксигену (АМО) та нітрогену в макрофагах, астроглії і гепатоцитах, що також здатні блокувати цитохром Р450 як на претрансляційному, так і посттрансляційному рівні. Вплив цитокінів не обмежується лише регуляцією експресії апоензиму цитохрому Р450. Вони також інгібують синтез амінолевулінової кислоти, що бере участь у синтезі гемової частини цитохрому, а, можливо, і утворення протогему гемсинтетазою [9].

Активація окисного стресу в умовах запалення може призводити до ушкодження мітохондрій клітин та порушення метаболізму деяких вітамінів, зокрема, тіаміну, рибофлавіну та ліпоєвої кислоти, недостатність яких, у свою чергу, посилює генерацію мітохондріями токсичних АМО (O_2^-, $^1O_2$, H_2O_2, $OH^\cdot$, $NO^\cdot$ та ін.), що спричинюють окислювальну модифікацію та деградацію ДНК, ліпідів та протеїнів (у тому числі й цитохрому Р450) і тому сприяють патогенезу хвороби.

До того ж цитохром Р450 може сам виступати джерелом генерації АМО. Особливо стрімко зростає ризик генерації цитохромом Р450 активних радикалів оксигену на різних етапах монооксигенації в умовах надлишку NADPH та NADH внаслідок інтенсивної роботи гексозомонофосфатного шунта [10], що спостерігається за активації клітин. У зв'язку з цим інгібіторний вплив цитокінів на систему цитохрому Р450 та інших пов'язаних з ним цитохромів в умовах активації імунної та гострофазової відповіді може мати фізіологічне значення як адаптаційний контроль активності цитохрому в умовах активації окисного стресу і розглядається як тонкий механізм саморегуляції в організмі, що склався в процесі еволюції. Зокрема, вважається, що цей механізм є необхідним для забезпе-

чення адекватного рівня глюкокортикоїдів, що беруть участь у регуляції запалення та імунної відповіді [11]. Тому втручання в цей механізм, а саме безконтрольна індукція монооксигенації, в умовах запалення є «ненебезпечною» для організму, оскільки підвищує ризик альтернативних процесів, зокрема обумовлених вільнорадикальними механізмами. Так, надмірна індукція цитохрому Р450 може спричинювати гіперпродукцію прозапальних цитокінів, підвищувати чутливість організму до бактеріальних ендотоксинів, вірусних інфекцій, сенсибілізувати гліальні чи інші клітини до рецепторіндукованого та нерецепторного апоптозу. З огляду на це контроль за цими системами в умовах РС є необхідним у комплексі з контролем рівня АМО, або стану пероксидного окислення ліпідів (ПОЛ), та рівня активації імунної відповіді. Це стає особливо актуальним за вивчення впливу біологічно активних речовин і їх комплексів на розвиток захворювання для розробки адекватних засобів його попередження і лікування.

Відомо, що з РС часто асоціюється знижений рівень вітаміну D_3, однак роль його в механізмах захворювання залишається нез'ясованою. При цьому існують дані про позитивний вплив вітаміну на стан хворих та здатність полегшувати перебіг ЕАЕ та попереджувати його розвиток. Вважається, що позитивний вплив вітаміну D_3 на розвиток хвороби обумовлюється його здатністю регулювати проліферацію енцефалітогенних клітин (Th1-лімфоцитів) і продукцію ними про- і протизапальних цитокінів [12] та інгібувати реакції запалення в організмі. Зважаючи на це, а також його потенційну здатність до субстратної індукції цитохрому Р450, вивчення впливу вітаміну D_3 на систему цитохрому Р450 в умовах активації імунної системи є досить актуальним.

В наших попередніх дослідженнях і дослідженнях інших авторів було встановлено порушення обміну і функціонування деяких інших вітамінів та мінералів в умовах ЕАЕ та РС. Так, було показано, що в умовах ЕАЕ в організмі тварин відбувається зниження вмісту NAD, що є активною формою вітаміну РР [13], вітаміну Е [14], B_1 [15], B_2, B_6, а також деяких мінеральних речовин (Mg, Zn, Se) [16], що мають значення в механізмах антиоксидантного захисту. Внаслідок розвитку оксидативного стресу та зниження рівня тіаміну в клітинах може порушуватися також метаболізм ліпоєвої кислоти та жирних кислот.

Оскільки активність цитохрому Р450 залежить від активності процесів ПОЛ в організмі, доповнення дії вітаміну D_3 речовинами, що потенційно здатні регулювати ці процеси, є надзвичайно корисним для нормалізації обміну речовин в організмі хворих на РС та стабілізації їх стану. У зв'язку з цим нами було підібрано групу біологічно активних речовин (БАР), що мають значення у механізмах розвитку патології, до складу якої, поряд із вітаміном D_3, увійшли вітаміни B_1, B_2, B_6, РР, Е, α-ліпоєва, α-ліноленова кислоти та мінеральні речовини (Mg, Zn, Se) в оптимальних, експериментально підібраних ефективних дозах. У попередніх дослідженнях нами було отримано позитивні результати комплексного використання цих речовин для нормалізації функціональної здатності мітохондрій [17], стану ПОЛ та обміну деяких ліпідів [18]. Тому логічно було дослідити комплексну дію цих речовин на стан цитохром Р450-залежних систем порівняно з дією вітаміну D_3, що є відомим імуномодулятором. Дослідження дії цієї композиції може стати підґрунтям комплексного підходу до терапії РС. Метою роботи було дослідити вплив вітаміну D_3 та вищезазначених біологічно активних речовин (БАР) на вміст цитохромів Р450 та b_5, активність функціонально зв'язаних з ними ензимів у тканинах головного мозку й печінки щурів, стан ПОЛ у мозку і рівень мієлінотоксичних автоантитіл у крові в умовах ЕАЕ в щурів.

Матеріали і методи

В дослідах використовували щурів-самців з масою тіла 200–250 г лінії Wistar, яких розподіляли на близькі за масою 4 групи по 5–10 тварин у кожній. Тварин імунізували в подушечки задніх або передніх кінцівок сумішшю, що складалася з очищеного гомологічного мієліну і повного ад'юванту Фрейнда (Sigma, США). Контрольна група щурів отримувала відповідний об'єм фізіологічного розчину. Всі тварини знаходились на збалансованому раціоні віварію і одержували воду *ad libitum*.

У звичайній постановці експерименту одна із груп імунізованих тварин із 8-ї доби отримувала перорально кожного дня протягом 13 діб вітамін D_3 окремо в дозі 5 мкг на 1 кг маси тіла, інша група – суміш біологічно активних речовин, що, окрім вітаміну D_3 у відповідній дозі, містила (мг на кг маси тіла): вітамін B_1 (тіаміну бромід) – 1,25; вітамін B_2 (рибофлавін) – 1,2; піридоксин (B_6) – 1,5; нікотинамід – 3,5; вітамін Е (α-токоферолу ацетат) – 6,5; α-ліпоєву – 2,5 та α-ліноленову кислоти – 0,1 г, а також $MgCl_2$ – 3, $ZnCl_2$ – 1,5; SeO_2 – 9 мкг. Стан тварин щоденно оцінювали

на наявність характерних клінічних симптомів, таких як втрата маси тіла, млявість, знижений тонус хвоста й задніх кінцівок та їхній частковий парез, мимовільне сечовипускання, судороги кінцівок тощо. Дослідження проводили в період розвинутих клінічних ознак на 21-у добу після декапітації з урахуванням вимог Міжнародної конвенції з правил гуманного поводження з дослідними тваринами.

Інша постановка експерименту передбачала вивчення вмісту не тільки цитохрому P450, але й b_5, а також активності функціонально зв'язаних з ними оксидоредуктаз у мікросомній фракції мозку в більш ранній термін розвитку захворювання (14 діб), який характеризується появою в деяких тварин перших неврологічних симптомів та детекцією в їхній крові автоантитіл проти протеїнів мієліну. В цьому експерименті тварин розподілили на 5 груп (по 5 тварин в кожній), ідентичних до тих, що і в звичайному експерименті, за виключенням додаткової групи тварин, що отримували БАР складу (мг на кг маси тіла): вітамін D_3 – 5 мкг, α-токоферол – 10 мг, вітамін С – 100 мг. При цьому введення БАР починали з 1-ої доби експерименту.

Для дослідження рівня цитохрому P450 печінку щурів перфузували охолодженим розчином 0,9% NaCl, після чого тканину *ex tempore* заморожували в спеціальних прес-формах у скрапленому нітрогені. Вміст металопротеїнів у клітинах тканин визначали на комп'ютеризованому ЕПР-спектрометрі «Radiopan» в потоці газоподібного гелію при температурі 16–20 K. [19]. Режим роботи приладу: потужність мікрохвильового поля — 5 мВт, робоча частота – 9075–9095 МГц, магнітна індукція – 260–360 мТл (розгортка поля 100 мТл), амплітуда модуляції — 0,8 мТл, стала часу — 0,5 с, час розгортки – 4 хв. Для якісної та кількісної оцінки спектрів визначали положення сигналу ЕПР (g-фактор) та вимірювали його амплітуду, яку відносили до амплітуди стандарту. Як стандарт використовували рубін, розташований в робочому полі резонатора. Рівень активної форми цитохрому P450 з тривалентним гемовим залізом оцінювали за амплітудою парамагнітного центру с g-фактором = 2,25 та 2,42. Рівень цитохрому P450 та b_5 досліджували спектрофотометричним методом також у мікросомах мозку [20].

Мікросоми головного мозку щурів виділяли за методом [21]. Для визначення активності NADH- та NADPH-оксидоредуктаз у мікросомах мозку використовували 2,6-дихлорфеноліндофенол (ДХФІФ) як штучний акцептор електронів [21]. Інтенсивність процесів ПОЛ оцінювали за вмістом вторинних продуктів окислення ліпідів – тіобарбітуратпозитивних (ТБК-позитивних) продуктів, до яких, зокрема, належить малоновий діальдегід [20].

Для визначення загальної автоантигенної активності та антитілоутворення до основних протеїнів мієліну використовували метод імуноблотингу. Мієлін із білої речовини інтактних щурів виділяли за методом Norton W. T. [22], підсушували при кімнатній температурі, ресуспендували в п'яти об'ємах ацетону та центрифугували при 75 000 g 45 хв. Утворений протеїновий осад висушували, розчиняли в буфері [23], після чого протеїни мієліну розділяли за допомогою електрофорезу в градієнтному поліакриламідному гелі (PAAG) у присутності додецилсульфату натрію (DSNa) за методом Leammli (1970) із модифікаціями [23]. Модифікації полягали у використанні двошарового носія з різним розміром пор і пари буферів, що відрізняються між собою за складом і за значенням pH, що забезпечує концентрування досліджуваних речовин у вузькій стартовій зоні. Для визначення загального протеїну частину осаду розчиняли в 50 мМ трис-HCl буфері з 0,1% DSNa, pH 7,4, на один трек наносили 50 мкг протеїну. Імуноблотинг антитіл у крові інтактних і імунізованих тварин до протеїнів мієліну проводили за методом [24]. Антитіла, що зв'язалися з відповідними зонами, виявляли в сироватці тварин за допомогою вторинних антитіл, кон'югованих із пероксидазою хрону в кольоровій реакції утворення пероксидних сполук молібдену в реакції з молібдатом натрію. Кількісне обчислення блотограм проводили за допомогою програми Gelpro. Для визначення загальної кількості антитіл обчислювали суму результатів інтенсивності забарвлення зв'язаних з антитілами поліпептидних зон та відносили її до кількості загального протеїну у фракціях.

Вміст загального протеїну визначали за методом Лоурі [25]. Статистичну обробку результатів проводили методом дисперсійного аналізу нерівночислених комплексів для малих вибірок. Відносний вміст досліджених параметрів виражали у вигляді середньої величини ± стандартна похибка середньої, вірогідну різницю між групами оцінювали із застосуванням *t*-критерію Стьюдента ($P < 0,05$) після перевірки гіпотези про нормальність розподілення та різницю між генеральними дисперсіями [26].

Результати та обговорення

Аналіз спектрів ЕПР печінки щурів показав, що на 21-шу добу розвитку ЕАЕ рівень цитохрому Р450 знижується на 40% порівняно з інтактними тваринами (рис. 1, *А*). При цьому виявлено, що рівень цитохрому Р450 у тканині мозку також є достовірно зниженим (рис. 1, *Б*). Відомо, що мозок вищих тварин і людини характеризується досить низьким рівнем цього гемопротеїну, однак, як виявилося останнім часом, він виконує в цій тканині особливі і дуже важливі функції. Зокрема, деякі його ізоформи беруть участь у метаболізмі ейкозаноїдів, похідних арахідонової кислоти, у ω-гідроксилюванні жирних кислот, метаболізмі холестеролу, стероїдних гормонів та вітаміну D_3, що важливо для регуляції судинного кровотоку і реакцій запалення в мозку [27].

Внаслідок наших досліджень виявилося, що як вітамін D_3 окремо, так і досліджувана суміш БАР частково запобігають зниженню рівня цитохрому в печінці і в мозку. При цьому результати комплексної дії БАР вірогідно вищі, ніж в контрольній групі хворих тварин (рис. 1).

Поява автоантитіл у крові деяких тварин спостерігається вже на ранній стадії розвитку ЕАЕ (14 діб, дані не наведено). Дослідження рівня цитохромів Р450 і b_5 в мікросомах мозку на цій стадії захворювання показало зниження цих показників більш ніж у два рази (рис. 2). Одержані дані можуть свідчити про порушення процесів мікросомного окислення в мозку та печінці тварин за таких умов. Зниження рівня цитохрому Р450 може відбуватися внаслідок його конверсії в неактивну форму Р420 в умовах активації процесів вільнорадикального ПОЛ. Тому логічно припустити, що знижується не тільки кількість його активної форми, а й функціональна активність пов'язаних з ними ензимних систем, що беруть участь у процесах біотрансформації ендо- та екзогенних сполук.

Експериментальні дані з вивчення впливу досліджуваних біологічно активних речовин на рівень цитохромів показали, що застосування вітаміну D_3 окремо не впливало на їх рівень у мікросомах мозку. Додавання до вітаміну D_3 антиоксидантних вітамінів Е та С позначається деякою нормалізацією рівня цитохрому Р450, але не b_5. А застосування суміші вітамінів сприяє підвищенню вмісту як цитохрому Р450, так і b_5 у мікросомах мозку на 14-ту добу розвитку захворювання (рис. 2).

В процесі п'ятиетапного окислення субстрату цитохром Р450-вмісними монооксигеназами в ендоплазматичному ретикулумі необхідним є циклічне відновлення заліза гему за допомогою NADH- та NADPH-оксидоредуктаз. Ці ензими входять до редокс-ланцюгів, що спряжені з монооксигеназами, і тому від їхньої активності залежить нормальне функціонування окислювальних і детоксикаційних систем клітини. Відомо, що NADPH-оксидоредуктаза бере участь у відновленні цитохрому Р450 і переносі електронів до цієї системи, а NADH-оксидоредуктаза — у відновленні цитохрому b_5.

Активність окремих ензимів редокс-ланцюгів може бути виміряна за допомогою акцепторів електронів, що додаються в реакційне середовище, редокс-потенціал яких дозволяє їм взаємодіяти з певними перенос-

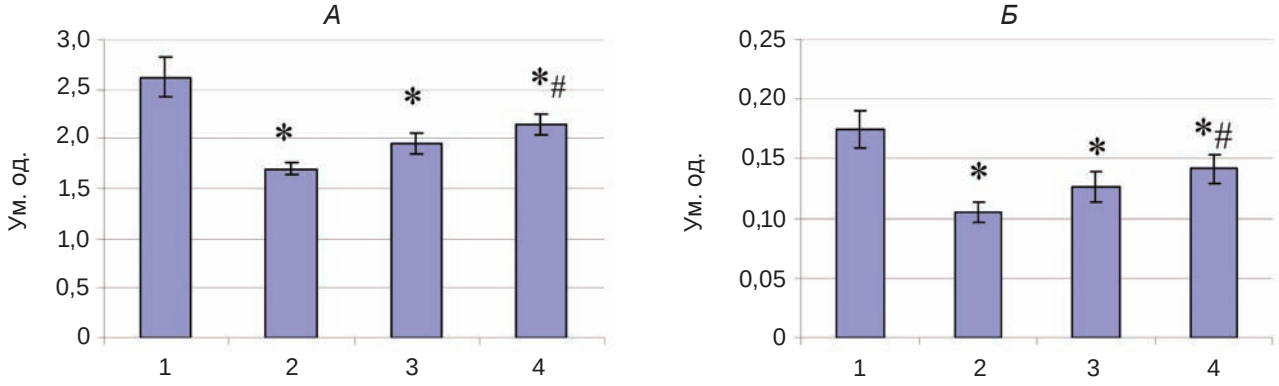

*Рис. 1. Вміст цитохрому Р450 в печінці (А) та мозку (Б) щурів на 21-шу добу розвитку експериментального алергічного енцефаломієліту (ЕАЕ) за введення біологічно активних сполук, M ± m, n = 5–10, P < 0,05. Тут і на рис. 5 на осі абсцис: 1 – інтактні тварини; 2 – ЕАЕ, 21-ша доба розвитку; 3 – ЕАЕ+D_3; 4 – ЕАЕ+суміш БАР. *Зміни вірогідні відносно інтактних, # зміни вірогідні відносно хворих тварин без лікування*

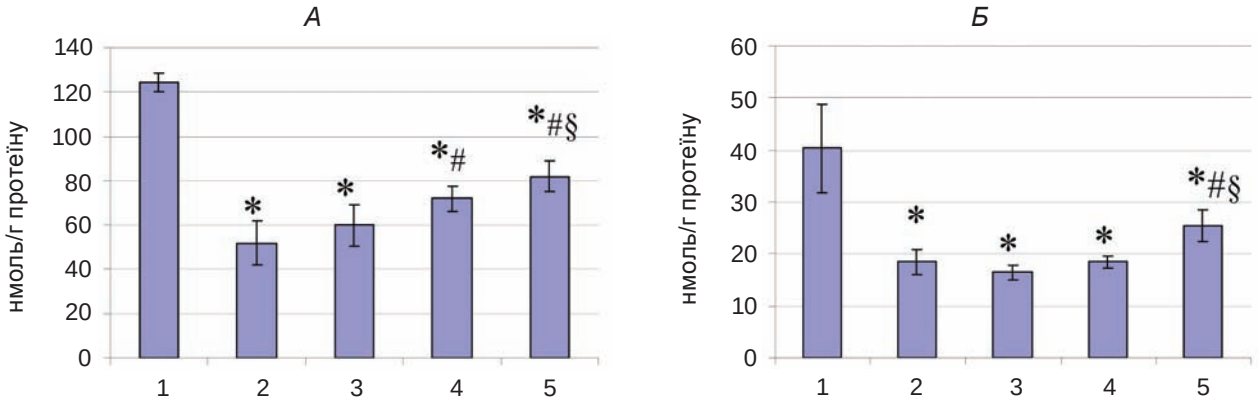

*Рис. 2. Вміст цитохрому P450 (А) і b_5 (Б) у мікросомах мозку щурів на 14-ту добу розвитку експериментального алергічного енцефаломієліту (ЕАЕ) за введення біологічно активних сполук, M ± m, n = 5–10, P < 0,05. Тут і на рис. 3 на осі абсцис: 1 – інтактні тварини; 2 – ЕАЕ, 14-та доба після імунізації; 3 – ЕАЕ+D_3; 4 – ЕАЕ+D_3+Е+С; 5 – суміш БАР. Тут і на рис. 3–5: *зміни вірогідні відносно інтактних; # зміни вірогідні відносно хворих тварин без лікування; § зміни вірогідні відносно лікування вітаміном D_3*

никами. У роботі ми використовували модельну систему зі штучним акцептором електронів ДХФІФ.

Було показано, що на стадії початку розвитку клінічних симптомів ЕАЕ (14 діб) спостерігається зниження активності оксидоредуктаз (рис. 3). Ці дані є підтвердженням про порушення окисно-відновних процесів в мікросомах мозку, і, очевидно, активності процесів детоксикації і біотрансформації речовин, що здійснюються монооксигеназами.

Застосування вітаміну D_3 як окремо, так і в композиції з вітамінами Е і С, як видно з рис. 3, на цій стадії розвитку захворювання вірогідно не впливає на виявлені функціональні зміни ендоплазматичного ретикулума мозку, в той час як досліджувана нами суміш БАР дещо запобігає зниженню активності NADH-оксидоредуктази.

Як вже зазначалося, зниження активності процесів мікросомного окислення може бути наслідком активації імунної відповіді проти екзогенних чи ендогенних чинників, що супроводжується інтенсивними реакціями запалення в організмі та підвищенням рівня прозапальних цитокінів та вільнорадикальних процесів.

Стан активації імунної системи та наявність процесів автоімунного запалення в організмі тварин в умовах ЕАЕ характеризували за рівнем специфічних автоантитіл до протеїнів мієліну ЦНС. Рівень таких

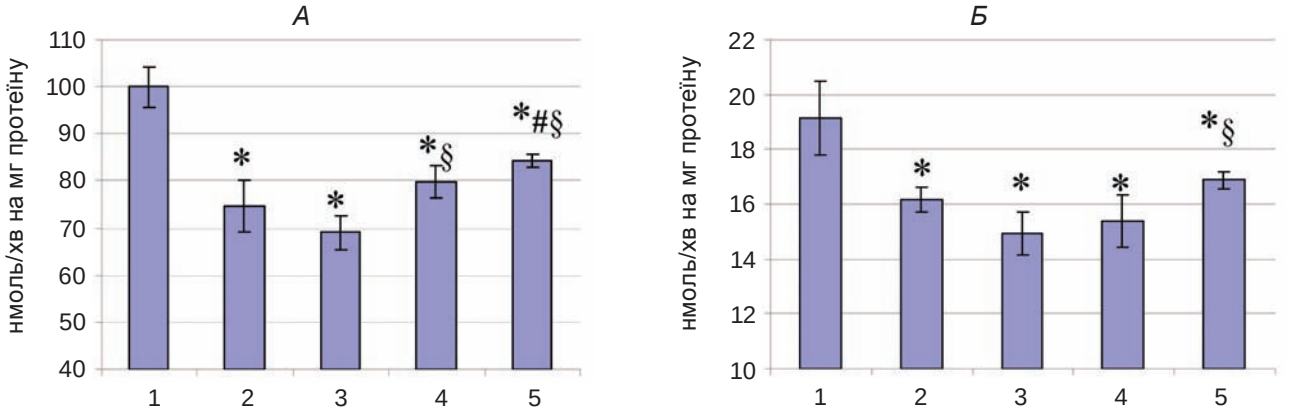

Рис. 3. Активність NADH: ДФГФ оксидоредуктази і NADPH: ДХФІФ-оксидоредуктази в мікросомах мозку щурів на 14-ту добу розвитку експериментального алергічного енцефаломієліту за введення біологічно активних сполук, M ± m, n = 5–10, P < 0,05

антитіл, як відомо, корелює з рівнем прозапальних цитокінів, оскільки цитокіни активують процес диференціації та проліферації В-лімфоцитів, що продукують антитіла, ініціюючи запальні реакції та деструкцію мієліну. Багато авторів зазначають, що високий рівень як прозапальних цитокінів, так і антитіл є відображенням активності та тяжкості патологічного процесу.

Аналіз результатів імуноблотингу показав наявність мієліноспецифічних антитіл у сироватці крові імунізованих тварин, що свідчить про наявність інтенсивного автоімунного процесу в організмі цієї групи щурів (рис 4, *А*, смужки *3–5*). Як відомо, в процесі розвитку ЕАЕ та РС можуть продукуватися антитіла до різних протеїнів мієліну, зокрема MBP (МОП), MOG, MAG, PLP, CNP, S100 та ін. У тварин, яким вводили вітамін D_3 (смужки *6–7*) спостерігається зниження загального рівня антитіл майже у 2 рази (рис. 4, *Б*) відносно цього показника у хворих тварин без введення вітаміну, а рівень антитіл у тварин, яким вводили суміш D_3+E+C (смужки *8–9*) і досліджувану суміш вітамінів (смужки *10–12*) – більше ніж у 2 рази (рис. 4, *Б*).

Одним із головних компонентів мієлінових мембран є основний протеїн мієліну (МОП), що розташований на їхній поверхні та підтримує зв'язок між ламелами мієліну. Цей протеїн, маса якого становить 17–20 кДа, є дуже лабільним та одним із перших залучається до патологічного процесу. В крові та цереброспинальній рідині хворих на РС виявляється підвищений рівень антитіл проти МОП в активній фазі розвитку захворювання [28].

На імуноблотограмах чітко ідентифікується зона протеїнів мієліну масою 20 кДа, що виявляли реакцію зв'язування з антитілами в сироватці хворих тварин. Це може свідчити про активність процесу антитілоутворення до МОП, демієлінізації та дезінтеграції мієлінових структур. Як засвідчують одержані

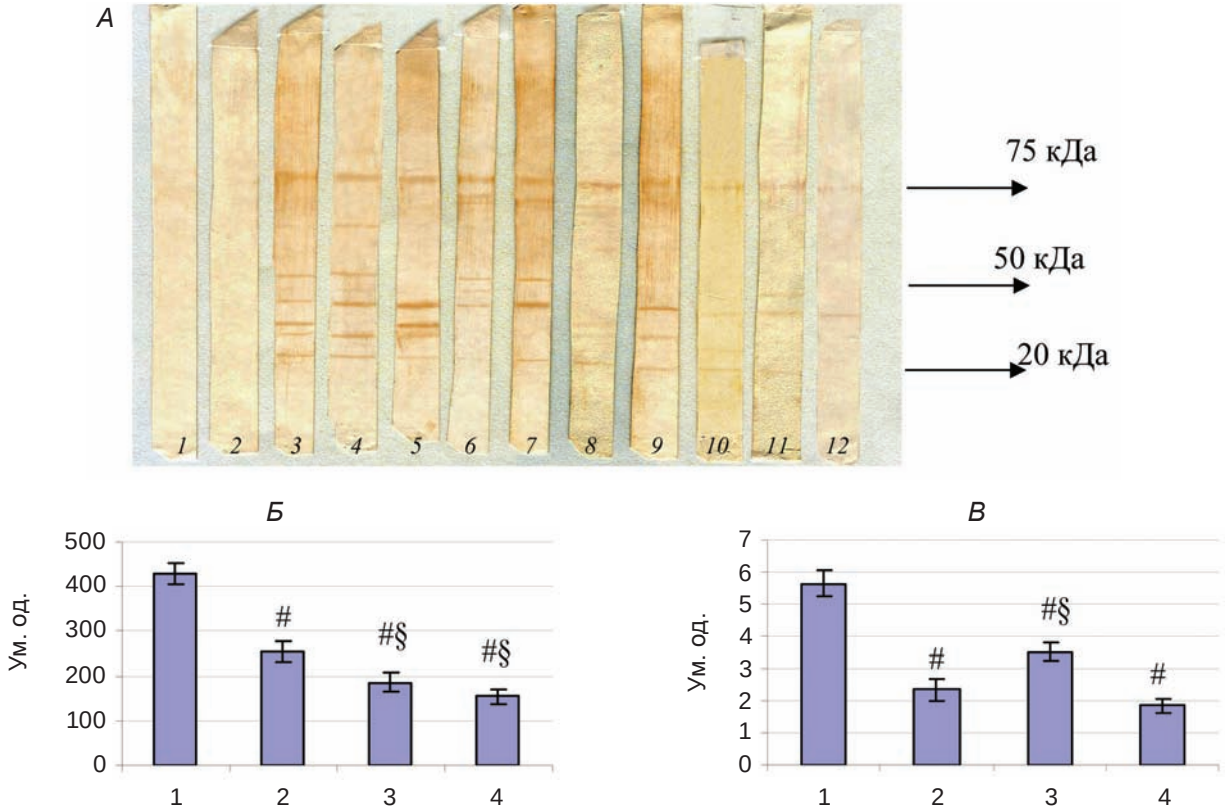

Рис. 4. Імуноблот-аналіз нейроспецифічних антитіл у сироватці крові щурів на 21-шу добу розвитку експериментального алергічного енцефаломієліту (ЕАЕ). А – На імуноблотограмі: 1–2 – інтактні; 3–5 – ЕАЕ; 6–7 – ЕАЕ+D_3; 8–9 – ЕАЕ+D_3+C+E, 10–12 – ЕАЕ+ суміш БАР. Б – Загальний рівень утворення автоантитіл. В – Рівень автоантитіл до протеїнів масою 20 кДа. На Б і В: 1–ЕАЕ, 21-ша доба розвитку; 2 – ЕАЕ+D_3; 3 – ЕАЕ+D_3+C+E; 4 – ЕАЕ+суміш БАР

дані, застосування вітаміну D_3 ефективно впливає на рівень цих антитіл, знижуючи їх рівень більше ніж у 2 рази, а застосування суміші вітамінів — майже у 3 рази (рис. 4, *В*). Таким чином, виявилося, що досліджувана суміш вітамінів найефективніше запобігає автоімунному антитілоутворенню і процесам запалення в ЦНС імунізованих тварин.

Відомо, що за порушення метаболізму АМО за різних патологічних умов та неконтрольовано підвищеного утворення вільних радикалів в організмі, так званого оксидативного стресу, відбувається посилення процесів пероксидації ліпідів (ПОЛ), наслідком чого є порушення властивостей біологічних мембран та функціонування клітин. Як відомо, за умов РС та ЕАЕ відбувається активація процесів ПОЛ, що супроводжується зниженням активності ензимних систем антиоксидантного захисту. Нами раніше було показано, що ці порушення в організмі тварин відбуваються, починаючи з 2–3-го тижня розвитку захворювання, поступово зростаючи [29].

Як видно з рис. 5, вміст ТБК-активних продуктів, що є вторинними продуктами ПОЛ, у мозку щурів на 21-шу добу розвитку ЕАЕ вірогідно підвищується. Внаслідок експерименту з'ясувалося, що у разі застосування як вітаміну D_3, так і досліджуваної комплексної вітамінно-мінеральної суміші вміст продуктів ПОЛ вірогідно знижується, при чому найефективніше у разі застосування останньої.

Нормалізацію рівня і активності цитохромів та посилення опору організму тварин проти оксидативного навантаження під впливом вітаміну D_3 можна пояснити його регуляторним впливом на цитокіновий фон та реакції запалення. Однак також відомо, що його функціональний метаболіт $1,25(OH)_2D_3$, має здатність знижувати внутрішньоклітинний рівень кальцію та експресію індуцибельної NO-синтази, а також стимулювати експресію γ-глутамілтранспептидази в клітинах [30, 31], що може сприяти зменшенню утворення дуже реактивних АМО, таких як пероксинітрит ($ONOO^-$), моноксид та діоксид нітрогену ($NO^\cdot$, $NO_2^\cdot$), а також збільшенню рівня відновленого глутатіону та активації глутатіонової антиоксидантної системи в астроцитах.

Відносно Nam існують дані, що він також здатен знижувати гіперпродукцію моноксиду нітрогену та захищати DNA клітин від ушкодження вільними радикалами [32]. Окрім того, він має здатність інгібувати експресію факторів клітинної адгезії та антигенів головного комплексу гістосумісності II класу

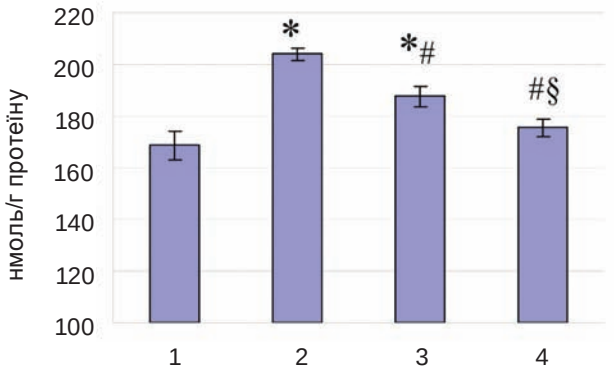

Рис. 5. Вміст ТБК-активних продуктів у мозку щурів на 21-шу добу розвитку експериментального алергічного енцефаломієліту (M ± m)

in vitro [33]. Тому вважаємо, що стимуляторний вплив цих біологічно активних сполук на систему цитохромів P450 та b_5 в умовах активації імунної системи може зумовлюватися не лише прямою індукцією, а й великою мірою базується на їхній здатності природним чином зменшувати оксидативне навантаження і регулювати цитокіновий фон, зменшуючи інтенсивність запалення й імунологічної атаки на компоненти мієліну. Дія цих речовин може бути надзвичайно цінною для хворих на РС, оскільки вони здатні вирішувати одночасно багато проблем під час терапії захворювання.

Ефективніша дія суміші вітамінів на рівень цитохромів зумовлюється не лише дією Nam, а й інших компонентів. Відомо, що вітаміни Е та С, а також ліпоєва кислота виявляють антиоксидантні властивості [34], а макро- та мікроелементи, такі як Mg, Zn та Se входять до каталітичних центрів ензимної складової антиоксидантного захисту. Важливими в умовах патології є також речовини, що здатні підтримувати цілісність мітохондрій, порушення яких призводять до потужної генерації супероксидних радикалів та NO. Такими речовинами, окрім вітаміну PP або Nam, є вітаміни групи В, а саме тіамін (B_1), рибофлавін (B_2), піридоксин (B_6), оскільки вони беруть безпосередню участь в енергетичних процесах та у функціонуванні мітохондріального апарату [35]. Вони також необхідні для підтримки антиоксидантної дії вітаміну Е та глутатіону [36], а також деякі з них (B_1, B_6) мають антинітрозативні властивості [37], що можуть доповнювати дію вітаміну D_3 та Nam.

Таким чином, властивості досліджуваних біологічно активних речовин роблять їх дуже

перспективними сполуками для лікування та стабілізації стану хворих на РС і, можливо, інших автоімунних захворювань. Особливо перспективним може бути використання їх разом із β-IFN, що є на сьогодні одним з найефективніших засобів для лікування хворих на РС.

Отже, результати досліджень показали, що за активації процесів автоімунної деструкції протеїнів мієліну та процесів ПОЛ при ЕАЕ в організмі щурів відбувається порушення цитохром Р450-залежних систем ендоплазматичного ретикулума. Зокрема, спостерігається істотне зниження вмісту цитохромів Р450 і b_5, як у печінці, так і в мозку, при цьому в мікросомах мозку відбувається зниження активності NADH- та NADPH-оксидоредуктаз, що необхідні для відновлення цитохромів і спряжені із монооксигеназами. Ці зміни свідчать про порушення редокс-стану і функціональної здатності детоксикаційних і біотрансформуючих систем ендоплазматичного ретикулума в цих тканинах тварин.

Дослідження показали також, що застосування окремо вітаміну D_3 на тлі розвитку захворювання ефективно сприяє зниженню рівня специфічних автоантитіл у крові тварин, впливаючи при цьому на рівень цитохрому Р450 як у печінці, так і в мозку на 21-шу добу захворювання, однак на 14-ту добу розвитку ЕАЕ в мікросомах мозку ефект дії вітаміну не спостерігається. Застосування разом із вітаміном D_3 вітамінів-антиоксидантів Е та С позначилося деяким впливом на цитохром Р450-залежну систему мікросом мозку, в той час як доповнення раціону тварин композицією вітамінів і мінеральних речовин виявляється ефективнішим для нормалізації порушень цієї системи як на 14-ту, так і на 21-шу добу ЕАЕ, а також стану ПОЛ в обох тканинах тварин, знижуючи при цьому рівень автоантитіл як до МОП, так і до інших компонентів мієліну. Розроблена композиція біологічно активних речовин, зокрема, ефективно сприяє підвищенню рівня цитохромів Р450 та b_5 у тканинах щурів та активності NADH-оксидоредуктази в тканині мозку, сприяючи нормалізації ланцюга транспорту електронів мікросом.

Стимуляторний вплив застосованих у комплексі біологічно активних сполук на систему цитохромів Р450 та b_5 в умовах активації імунної системи, очевидно, зумовлюється здатністю їх природним чином зменшувати оксидативне навантаження і регулювати цитокіновий фон, зменшуючи інтенсивність запалення та імунологічної атаки на компоненти мієліну.

Таким чином, досліджувана нами композиція біологічно активних речовин виявляє антиоксидантний та протекторний ефект на клітини головного мозку та печінки щурів в умовах ЕАЕ і може бути корисною для профілактики загострень та покращення стану хворих на РС та інші хвороби, що супроводжуються гіперактивацією імунної системи. Особливо перспективним може бути її застосування разом із терапією β-інтерфероном. Однак це питання потребує подальших досліджень.

ИСПОЛЬЗОВАНИЕ ВИТАМИНОВ ДЛЯ КОРРЕКЦИИ ФУНКЦИОНАЛЬНОГО СОСТОЯНИЯ ЦИТОХРОМ Р450-ЗАВИСИМЫХ СИСТЕМ ПРИ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОМ АЛЛЕРГИЧЕСКОМ ЭНЦЕФАЛОМИЕЛИТЕ

Э. П. Пасичная[1], Г. В. Донченко[1], А. П. Бурлака[2], В. С. Недзвецкий[3], Е. П. Сидорик[2], И. И. Ганусевич[2], Н. В. Делеменчук[1]

[1]Институт биохимии им. А. В. Палладина НАН Украины, Киев;
[2]Институт экспериментальной патологии, онкологии и радиобиологии им. Р. Е. Кавецкого НАН Украины, Киев;
[3]Национальный университет имени Олеся Гончара, Днепропетровск;
e-mail: ellapasich@gmail.com

Известно, что провоспалительные цитокины, уровень которых значительно повышается при патогенезе рассеянного склероза (РС), и интерферон-β, который применяется для лечения аутоиммунных заболеваний, способны подавлять цитохром Р450-зависимые процессы детоксикации и биотрансформации. Неконтролируемое снижение активности этих процессов может негативно сказываться на состоянии больных, поэтому актуальным является изучение функционального состояния системы цитохрома Р450 и разработка эффективных средств для его регуляции.

Исследовали действие витамина D_3 и эффективность его комплекса с витаминами B_1, B_2, B_6, PP, E, α-липоевой, α-линоленовой кислотами и минеральными веществами (Mg, Zn, Se) в предотвращении изменений функционального состояния цитохром Р450- и b_5-зависимых систем эндоплазматического ретикулума в головном мозгу и печени крыс при экспериментальном аллергическом энцефаломиелите (ЭАЭ), модели РС. Показано, что при развитии ЭАЭ происходит существенное

снижение содержания цитохромов как в мозгу, так и в печени, при этом в микросомах мозга происходит снижение активности NADH и NADPH-оксидоредуктаз, необходимых для восстановления данных цитохромов и сопряженных с монооксигеназами. Эти изменения свидетельствуют о нарушении редокс-состояния и функциональной активности цитохромзависимых систем в исследуемых тканях животных. Применение витамина D_3 отдельно и в экспериментально подобранной нами композиции биологически активных веществ эффективно устраняло снижение уровня цитохромов и активности NADH-оксидоредуктазы в тканях больных животных. Нормализация этих нарушений, очевидно, связана с антиоксидантными и мембраностабилизирующими свойствами применяемых веществ, восстановлением нарушенного обмена веществ, а также со способностью снижать активность реакций воспаления и регулировать цитокиновый фон в организме крыс при ЭАЭ. Исследованный комплекс биологически активных веществ оказался эффективнее для нормализации наблюдаемых при патологии нарушений по сравнению с витамином D_3, применяемым отдельно, и поэтому может представлять определенный интерес для профилактики обострений и улучшения состояния больных РС и другими заболеваниями, сопровождающимися гиперактивацией иммунной системы.

Ключевые слова: рассеянный склероз, монооксигеназы, цитохром P450, цитохром b_5, витамин D_3, витамин E, никотинамид, тиамин (витамин B_1), рибофлавин (витамин B_2), пиридоксин (витамин B_6), активные формы кислорода, оксидативное повреждение, воспаление, цитокины, нейроспецифичные антитела.

USE OF VITAMINS FOR CORRECTION OF THE FUNCTIONAL STATE OF CYTOCHROME P450 SYSTEMS AT EXPERIMENTAL ALLERGIC ENCEPHALOMYELITIS

E. P. Pasichna[1], G. V. Donchenko[1], A. P. Burlaka[2], V. S. Nedzvetskiy[3], E. P. Sidorik[2], I. I.Ganusevich[2], N. V. Delemenchuk[1]

[1]Palladin Institute of Biochemistry, National Academy of Sciences of Ukraine, Kyiv;
[2]Kavetsky Institute of Experimental Pathology, Oncology and Radibiology, National Academy of Sciences of Ukraine, Kyiv;
[3]Honchar National University, Dnipropetrovsk, Ukraine;
e-mail: ellapasich@gmail.com

It is known that inflammatory cytokines, which level is significantly increased in the pathogenesis of multiple sclerosis (MS), as well as interferon-β, which is used to treat autoimmune diseases, can inhibit cytochrome P450-dependent processes of detoxification and biotransformation. The uncontrolled decrease of the activity of these processes may have a negative affect on the state of patients, so it is urgent to study the functional state of the cytochrome P450 system and to develop effective means for its regulation in these conditions.

The effect of vitamin D_3 and efficiency of its composition with vitamins B_1, B_2, B_6, PP, E, α-lipoic, α-linolenoic acid and mineral substances (Mg, Zn, Se) in prevention of a functional state changes of cytochrome P450- and b_5-dependent systems of the rat brain and liver endoplasmic reticulum at EAE are investigated. It has been shown that the essential decrease of the level of these cytochromes is observed both in the brain and liver. In addition the level of activity of NADH-

and NADPH-oxidoreductases, which are part of microsomal electron transport chain components and coupled with monooxigenases, was reduced. These changes confirm the disturbances of a redox state and functional activity of detoxication and biotransformation systems in the studied animal tissues. Supplement of vitamin D_3 as well as the composition of biologically active substances, which we developed earlier, effectively eliminated the decrease of the level of cytochromes and activities of NADH-oxidoreductase in immunised rat tissues. Normalization of these disturbances can be explained by antioxidant and membrane-stabilizing properties of applied substances, and also by the ability to reduce the activity of inflammatory reactions by regulation of the level of inflammatory cytokines in rat organism at EAE. Thus the studied vitamin-mineral composition appeared to be more effective to normalize the found disturbances and it can be useful for prevention of exacerbations and for improvement of a status of patients with multiple sclerosis and other diseases, which are accompanied with hyperactivation of immune system.

Key words: multiple sclerosis, monooxygenase, cytochrome P450, cytochrome b_5, vitamin D_3, vitamin E, nicotinamide, thiamine (vitamin B_1), riboflavin (vitamin B_2), pyridoxine (vitamin B_6), reactive oxygen species, oxidative damage, inflammation, cytokines, neurospecific antibody.

1. *Lassmann H., Brück W, Lucchinetti C. F.* // Brain Pathol. – 2007. – **17**, N 2 – P. 210–218.
2. *Mustafa M., Vingsbo C., Olsson T., Ljungdahl A. et al.* // Eur. J. Immunol. – 1993. – **23**, N 12. – P. 3089–3095.
3. *Schmitz T., Chew L. J.* // Scientific World Journal. – 2008. – **8**. – P. 1119–1147.
4. *Morgan E.* // Drug. Metab. Dispos. – 2001. – **29**. – P. 207–212.
5. *Okuno H., Takasu M., Kano H. et al.* // Hepatology. – 1993. – **17**. – P. 65–69.
6. *Ляхович В. В., Вавилин В. А., Зенков Н. К., Меньшикова Е. Б.* // Бюл. СО РАМН. – 2005. – **118**, № 4, С. 7–12.
7. *Nadin L., Butler A., Farrel G., Murray M.* // Gastroenterology. – 1995. – **109**. – P. 198–205.
8. *Wright K., Morgan E.* // Mol. Pharmacol. – 1991. – **39**. – P. 468–474.
9. *Сибиряк С. В.* // Цитокины и воспаление – 2003. – **2**, № 2. – С. 12–22.
10. *Davydov D.* // Trends Biochem. Science. – 2001. – **26**. – P. 155–160.
11. *Hermann M., Scholmerich J., Straub R.* // Ann. NY Acad. Sci. – 2002. – **966**. – P. 166–186.
12. *Pedersen L. B., Cantorna M. T., Hayes C. E., DeLuca H. F.* // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. – 1996. – **93**. – P 7861–864.
13. *Пасічна Е. П., Морозова Р. П., Чехівська Л. І., Донченко Г. В.* // Укр. біохім. журн. – 2004. – **76**, № 6. – С. 88–94.
14. *Морозова Р. П., Пасічна Е. П., Донченко Г. В. та ін.* // Укр. біохім. журн. – 2007. – **79**, № 1. – С. 104–111.
15. *Gibson G. E., Zhang H.* // Neurochem. Int. – 2002. – **40**, N 6. – P. 493–504.
16. *Johnson S.* // Med. Hypotheses. – 2000. – **55**, N 3. – P. 239–41.
17. *Пасічна Е. П., Донченко Г. В., Бурлака А. П., Делеменчук Н. В.* // Лаб. діагностика. – 2012.– **61**, № 3. – С. 23–30.
18. *Пасічна Е. П., Донченко Г. В., Морозова Р. П.* // Біологія тварин (Львів). – 2010. – **12**, № 1. – С. 204–211.
19. *Бурлака А. П., Сидорик Є. П., Ганусевич І. І. и др.* // Новоутворення. Наук.-практ. журн. Донецького обласного протипухлинного центру. – 2009. – № 3–4. – С. 247–253.
20. *Современные* методы в биохимии / Под ред. В. Н. Ореховича. – М.: «Медицина», 1977. – 392 с.
21. *Методы* биохимических исследований. Учеб. Пособие. / Под ред. М. И. Прохоровой. – Л. Изд-во Ленингр. ун-та. – 1982. – 272 с.
22. *Norton W. T., Cammer W.* / Myelin. – Plenum Press, N-Y. – 1984. – P. 147–195.
23. *Karlsson J. O., Ostwald K., Kabjörn C., Andersson M.* // Anal. Biochem. – 1996. – **219**, N 1. – P. 144–146.
24. *Peferoen M.* Blotting with plate electrodes / Methods in Molecular Biology. New York: Humana, Clifton. 1988. – N 2. – P. 395–402.
25. *Lowry O. H., Rosebrough N. J., Farr A. L., Randall R. J.* // J. Biol. Chem. – 1951. – **193**, N 1. – P. 265–275.
26. *Лакин Г. Ф.* Биометрия. – М.: Высшая школа, 1990. – 352 с.
27. *Haining R. L., Nichols-Haining M.* // Pharmacol. Ther. – 2007. – **113**, N 3. – P. 537–545.
28. *Duan H., Luo Y., Hao H. et al.* // Neuroscience. – 2013. – **235**. – P. 16–26.
29. *Пасічна Е. П., Морозова Р. П., Донченко Г. В. та ін.* // Укр. біохім. журн. – 2007. – **79**, № 5. – С. 92–101.
30. *Garcion E., Wion-Barbot N., Montero-Menei C. N. et al.* // Trends Endocrinol. Metab. – 2002. – **13**, N 3. – P. 100–105.
31. *Garcion E., Sindji L., Leblondel G. et al.* // J. Neurochem. – 1999. – **73**, N 2. – P. 859–66.
32. *Andersen H. U., Jorgersen K. H., Edenberg J. et al.* // Diabetes. – 1994. – **43**, N 6. – P. 770–776.

33. *Kim K. A., Kim S., Chang I. et al.* // Diabetologia. – 2002. – **45**, N 3. – P. 385–393.
34. *Harrison F. E., May J. M.* // Free Radic. Biol. Med. – 2009. – **46**, N 6. – P. 719–730.
35. *Depeint F., Bruce W. R., Shangari N. et al.* // Chem. Biol. Interact. – 2006. – **163**, N 1–2. – P. 94–112.
36. *Johnson S., Lake M.* // Medical. Hypotheses. – 2000. – **55**, N 3. – P. 239–241.
37. *Gary E.* // Neurochem. International. – 2002. – **40**. – P. 493–504.

Отримано 23.01.2013