

УДК 577.1:619

**Федець О.М.**, к.с.-г.н., доцент (olehfedets@yahoo.com), **Макух Є.М.**, к.б.н., доцент, **Вигнан Д.С.**, к.б.н., доцент, **Красневич А.Я.**, к.б.н., доцент<sup>©</sup>

*Львівський національний університет ветеринарної медицини та біотехнологій імені С.З.Гжицького*

## ОХРАТОКСИН ТА ГЛУТАТІОН-ЗАЛЕЖНІ ЕНЗИМИ

*В огляді узагальнені дані про механізми впливу охратоксину на глутатіонову систему організму тварин та захисну роль цієї системи.*

**Ключові слова:** охратоксин, глутатіон, глутатіонтрансфераза, глутатіонпероксидаза, глутатіонредуктаза.

Охратоксин (ОТ) потрапляє в організм тварин при згодовуванні кормів уражених грибами (*Penicillium verrucosum* Dierckx та *Aspergillus ochraceus* Berkeley & Curtis [25]), що виробляють цей токсин. Виявлено кілька форм та похідних ОТ [17, 25, 39], найпоширеніший з них є ОТА.

Після всмоктування у верхніх відділах шлунково-кишкового тракту ОТА в плазмі крові зв'язується з альбуміном. У альбумін-дефіцитних щурів концентрація ОТА в жовчі та сечі і швидкість його екскреції у цих рідинах була у 20-70 разів вища, ніж у нормальних щурів. Тобто, альбумін затримує ліквідацію ОТА, обмежуючи його поступлення в печінкові та ниркові клітини [21].

Спорідненість до ОТА білків плазми крові у різних видів організмів різна. ОТВ легше виводиться з крові та має меншу спорідненість до білків плазми крові, що частково може пояснити його меншу токсичність [16]. У людини ОТА має меншу спорідненість до  $\alpha$ -,  $\beta$ - та  $\gamma$ -глобулінів ніж до сироваткового альбуміну [40].

Більшість ОТА з током крові потрапляє у печінку. Тут він піддається біотрансформації [44] або в менш токсичні 4R- та 4S-гідроксипохідні, або в форму хінону (ОТQ) та гідрохінону (ОТНQ). Швидкість формування 4R- та 4S-гідроксиОТА була лінійна протягом 10 хвилин при відсутності глутатіону (GSH) і залежала від концентрації білка та наявності NADPH. У термічно денатурованих мікросомах ці процеси не відбуваються. У присутності GSH (5 мМ) швидкість реакції була ідентична, але реакція була лінійна протягом 40 хвилин, що свідчить про захисний ефект GSH. Проте не виявлено утворення кон'югатів GSH, а також формування 10-гідроксиОТА, який утворювався при метаболізмі ОТА у мікросомах печінки кроля. При інкубації мікросом печінки з глутатіонтрансферазою (GST), NADPH та GSH (5 мМ) не спостерігали утворення метаболітів крім 4R- і 4S-гідроксиОТА. Під дією пероксидаз також не спостерігали утворення метаболітів ОТА. Тобто, припускають, що ці дві ензиматичні системи мають лише дуже малу потужність до біотрансформації ОТА. ОТQ може ковалентно зв'язуватись з GSH з утворенням кон'югату ОТQGSH, що веде до виснаження клітинного GSH та збільшує токсичність ОТА. Тобто, ОТА реагує з

© Федець О.М., Макух Є.М., Вигнан Д.С., Красневич А.Я., 2011

GSH [11]. Також OTHQ і OTQ здатні викликати пошкодження шляхом алкілювання/відновлення, що є одним з шляхів окисного пошкодження токсином [13]. Може утворюватись і більш токсичний лактон відкритий ОТА [17]. GSH відіграє, головним чином, захисну роль проти реактивних метаболітів, які він зв'язує і, таким чином, поглинає. У свою чергу, багато хімічних сполук демонструють підвищену токсичність, коли рівень GSH є вичерпаний [10]. Проте є і протилежні дані, які показують, що в умовах *in vitro* пониження рівня GSH незначно збільшує цитотоксичність індуковану ОТА, але механізми залучені в зниження токсичності, що настає при виснаженні GSH, ще нез'ясовані [12].

Формування та виведення ендogenous кон'югатів і ксенобіотиків з GSH мають життєво важливе значення в детоксикації і клітинному гомеостазі. Широка субстратна специфічність насоса експорту кон'югатів дозволяє видаляти безліч сполук, які формуються у I і II фазах метаболізму ендogenous речовин і ксенобіотиків в гепатоцитах. Ця система експорту в гепатоцитах включає локалізований в латеральній мембрані MRP1 та в апікальній мембрані MRP2. Експресія останнього зменшена у щурів при холестази, що свідчить про регуляцію цього білка при патології [19]. При холестази понижений і рівень GSH печінки [27].

Як відомо [38], при охратоксикозі уражується печінка, що, зокрема, проявляється в пониженні синтезу альбуміну, рівень якого в сироватці крові стає менший, як і загального білка. Також в сироватці крові буде підвищена активність амінотрансфераз, що є маркерами руйнування гепатоцитів.

У морської свинки за дії ОТА концентрація загального білка сироватки крові зменшилась із 53,3 до 50,0 г/л, альбуміну з 29,60 до 28,98 г/л,  $\alpha_1$ -глобуліну з 3,98 до 2,81 г/л,  $\alpha_2$ -глобуліну з 10,41 до 9,86 г/л,  $\beta$ -глобуліну з 4,44 до 3,60 г/л,  $\gamma$ -глобуліну з 4,90 до 4,75 г/л [29]. Концентрація альбуміну та загального білка зменшились і у сироватці крові курей [2, 5, 22, 30, 33, 42] та свиней [34].

У сироватці крові щурів, які споживали ОТА-забруднені продукти, було значне зниження концентрації загального білка (контроль  $72,3 \pm 3,2$  г/л, ОТА  $54,2 \pm 2,8$ ) і альбуміну (контроль  $34,6 \pm 2,9$  г/л, ОТА  $12,3 \pm 0,3$ ). Це зниження може бути пов'язано з гальмуванням тРНК-синтез, що супроводжується зниженням синтезу білка [1]. Проте інші дані вказують на зростання концентрації загального білка в сироватці крові щурів, які 10 днів споживали ОТА в дозі 0,5, 1 і 2 мг/кг [15].

Концентрація білка в сироватці крові кіз знизилась з 75 до 75 г/л при згодовуванні ОТА в дозі 1 мг/кг живої маси та зростала з 64 до 74 г/л і з 70 до 98 г/л при згодовуванні ОТА відповідно в дозі 2 і 3 мг/кг живої маси. Активність аспаратамінотрансферази зросла у всіх випадках і корелює з гепатоцелюлярними дегенеративними змінами [28]. В сироватці крові курей [22, 42] та свиней [34] теж зросла активність аспарат- та аланінамінотрансферази. Підвищення активності  $\gamma$ -глутамілтрансферази за дії ОТА встановлене у сироватці крові щурів [1] та курей [33, 42].

Внутрішньоклітинний статус GSH є чутливим показником загального стану середовища та його здатності протидіяти токсинам. Зниження концентрації GSH може бути пов'язане з безперервним нападом вільних радикалів. Зниження в

клітині активності неензиматичних антиоксидантів збільшує сприйнятливість до травми внаслідок перекисного окиснення [8]. Пероксид-індуковане зниження GSH пояснюється споживанням цього антиоксиданту і відсутністю субстратів для його синтезу [3].

При згодовуванні мишам ОТА в дозі 1,5 та 3 мг/кг живої маси, концентрація GSH в печінці знизилась із 74,63 до 34,18 та 42,45 мкг/100 мг тканини [8]. За іншими даними [4] концентрація GSH під впливом ОТА знизилась з 38 до 20 нмоль/мг. У печінці поросят [6] таке зниження відбувається з 1,82 до 0,99 мкмоль/г білка. Проте така зміна є дозозалежна. У первинних гепатоцитах щура під впливом ОТА в дозі 1,5 мкМ концентрація GSH зросла на 35%, а вже коли доза ОТА була 3 та 6 мкМ кількість GSH знизилась на 20 і 45% [7]. Під впливом ОТА знижується рівень GSH в сім'яниках мишей [41], у культурах клітин Нер G2 і Vero [14] та нирки свині [20].

Оскільки GSH є важливий антиоксидант, зменшення його внутрішньоклітинної концентрації значно послаблює захист клітини від окиснювальної травми. Інгібування експресії інших ензимів з захисними властивостями може в подальшому збільшувати негативний вплив ОТА-опосередкованого зменшення GSH [7]. Багато генів, які регулюються ОТА, очевидно беруть участь у детоксикації та транспортних процесах. Вони включають в себе зокрема кілька GST-аз [24]. Наприклад, експресія субодиниці GSTP1 була знижена після введення ОТА. GSTP1, як вважають, грає роль в детоксикації продукту перекисного окиснення ліпідів 4-гідроксиноненалу шляхом сполучення з GSH. 4-гідроксиноненал є реактивна хімічна сполука, яка зв'язується з макромолекулами, зокрема ДНК. Зниження експресії GSTP1 може призвести до зниження детоксикації та екскреції ОТА, або інших ксенобіотиків. Підвищена концентрація різних ксенобіотиків в клітині може призвести до синергістичної токсичності, зокрема між ОТА та інші мікотоксинами. У культурі первинних гепатоцитів щура під впливом ОТА крім змін ізоформи GSTP1 також знижується експресія ізоензимів GSTM1 і GSTA5. ОТА-індуковане виснаження цього клітинного механізму антиоксидантного захисту може призвести до збільшення окисних пошкоджень і цитотоксичності [7].

У тварин, які були інфузовані пероксидами, була вища відносна вага печінки, ніж у контролі, що свідчить про патогенетичну роль перекисів або вільних радикалів. Інфузія пероксидів індукує атаку вільних радикалів на мембрани, що може призвести до перекисного окиснення ліпідів в них [9].

Існує різниця у потенціалі виживання між базальною і апікальною частиною клітин, що збігається з істотно нижчим рівнем GSH в базальній частині клітин в порівнянні з апікальною. Це дозволило припустити, що базальні частини можуть бути більш уразливі для вільних радикалів, ніж апікальні [31].

Якщо пероксида спричиняють внутрішньоклітинне окиснення, то можна очікувати зменшення окисненого глутатіону (GSSG). Для підтримки окисно-відновного стану він утилізується глутатіонпероксидазою (GP<sub>x</sub>) і активно експортується з клітини [19]. Пероксид-індуковане зниження GSH пояснюється споживанням цього антиоксиданту і відсутністю субстратів для його синтезу. H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>

і терт-бутилгідропероксид є потужними стимуляторами виділення GSSG з жовчю [3].

Se-залежна GPx у печінці морської свинки становить приблизно 15% загальної активності, а при гель-фільтрації появляється як фракція більшої молекулярної маси ніж фракція GST активності. У печінці морської свинки велика GPx активність належить ізоензиму GSTA2. Ця ізоформа не утилізує  $H_2O_2$ , але печінка морської свинки має високу активність каталази (у 5 разів вища ніж у щура). Таким чином, у печінці морської свинки функція GSTA2 фізіологічно “прибирати” органічні гідропероксида, а каталази та Se-залежної GPx — пероксид Гідрогену [26].

При охратоксикозах зниження активності цих ензимів може бути у зв'язку з низкою факторів. Перш за все, токсини знижують швидкість біосинтезу білка шляхом конкурентного інгібування фенілаланін-тРНК-синтетази, що зменшує виробництво цих ензимів (про цю дію згадувалось при обговоренні зниження концентрації білка в сироватці крові). По-друге, токсин виробляє активні форми кисню (АФК), які прямо або побічно взаємодіють з білками, ДНК і РНК, та змінюють їх активність, що відбивається на загальному виробництві ензимів [8].

ОТА сприяє виробництву вкрай руйнівних гідроксильних радикалів. Одним з кількох можливих наслідків цього процесу є формування перекисів ліпідів. Це породжує радикали супероксиду аніону  $i$ , отже, перекису водню ( $H_2O_2$ ). Відсутність адекватних кількостей NADPH і GSH перешкоджає утилізації  $H_2O_2$  GSH-залежною GPx і NADPH-залежною глутатіонредуктазою (GR) [18]. У статті Hoehler D. et al., 1997 наведена схема цього процесу [18].

Рівні антиоксидантних ензимів GPx, GR і GST були значно нижчі в мишей оброблених охратоксином, ніж в контролі. Супероксидні радикали ( $O_2^-$ ) були зареєстровані в ряді патологічних порушень. GR перетворює GSSG в GSH. GPx перетворює  $H_2O_2$  в  $H_2O$  шляхом окиснення GSH. Зниження в GPx збільшить концентрацію  $H_2O_2$ , що є сигналом збільшення надалі окисного стресу. АФК збільшують рівень GST, що засвоює токсичні продукти перекисного окиснення ліпідів. Зменшення активності GST призведе до збільшення активності АФК [8].

При згодовуванні мишам ОТА в дозі 1,5 та 3 мг/кг живої маси, активність GST знизилась з 51,82 до 41,33 і 24,26 U/г білка, GPx з 0,41 до 0,27 і 0,15 U/г білка, GR з 3,13 до 2,43 і 1,69 U/г білка [8]. Використання протягом семи тижнів кормів забруднених низьким рівнем ОТА викликає зниження активності GPx у гомогенаті печінки свиней з 2,02 до 0,88 U/г білка [6]. Подібні зміни виявили і у печінці щурів [37]. У морської свинки активність цього ензиму за дії ОТА зменшується з 5,32 до 3,41 U [1]. В первинних гепатоцитах щура під впливом ОТА знижується експресія ізоензимів GSTP1, GSTM1 та GSTA5 [7]. В сім'яниках мишей яким згодовували ОТА зменшена активність GST, GPx і GR [41].

Проте згідно окремих даних [32] активність GPx у щура за дії ОТА навпаки зростає. Можливо причиною такого стану є низька доза токсину. Подібний ефект був у первинних гепатоцитах щура з концентрацією GSH, яка зростала при малій дозі ОТА та знижувалась при високих дозах [7]. Тобто, при проведенні експериментів [32] доза токсину була настільки незначна, що вона лише викликала

стимулюючий ефект на глутатіонову систему клітин. Це при тому, що щур є моногастричною твариною і у нього ОТА не перетворюється у нетоксичну  $\alpha$ -форму до всмоктування в кров, як у тварин з багатокамерним шлунком [24]. Після всмоктування в кров ОТА потрапляє в печінку де проявляється його токсична дія [38], та можливе лише часткове його знешкодження [35, 36, 43]. А перетворення у ОТа у щурів відбувається за дії мікрофлори сліпої та ободової кишок [23]. Схема обміну ОТА в організмі наведена у статті Marquardt R.R. & Frohlich A.A., 1992 [25].

Після двох тижнів впливу ОТА в печінці мишей спостерігався апоптоз. При цьому було виявлено зниження концентрації GSH, який є один з найбільш поширених антиоксидантів в клітинах. Була висунута гіпотеза, що GSH відіграє роль у порятунку клітини від апоптозу. Такі зміни можуть бути в результаті окиснення GSH в GSSG, або екструзії внутрішньоклітинного GSH, яка викликана активацією різних GSH-транспортерів. Ці механізми будуть сприяти виснаженню GSH. Після обробки печінки антиоксидантами проти токсичної дії ОТА тканина отримує опосередкований захист, шляхом активації печінкового статусу GSH, але не шляхом інгібування метаболізму ОТА. Для ефективного запобігання апоптозу інгібітор повинен мати декілька якостей і здатність нейтралізувати радикали кисню є важливою. Клітинний окисно-відновний стан та (або) рівновага між АФК, породженими ОТА, та їх детоксикація по антиоксидантному механізму може вплинути на ранні стадії апоптозу [4].

#### Література

1. Abdel-Wahhab M.A. et al. // *J.Pineal Res.* - 2005. - V.38. - P.130-135.
2. Agawane S.B., Lonkar P.S. // *J. Vet. Sci.* - 2004. - V.5, N.4. - P.359-367.
3. Akerboom T.P.M. et al. // *J.Biol.Chem.* - 1984. - V.259, N.9. - P.5838-5843.
4. Atroshi F. et al. // *J.Pharm.Pharmaceut.Sci.* - 2000. - V.3, N.3. - P.281-291.
5. Bailey C.A. et al. // *Poult.Sci.* - 1989. - V.68, N.12. - P.1664-1671.
6. Balogh K. et al. // *Acta Vet.Hung.* - 2007. - V.55, N.4. - P.463-470.
7. Cavin C. et al. // *Toxicol.Sc.* - 2007. - V.96, N.1. - P.30-39.
8. Chakraborty D., Verma R. // *Int.J.Occ.Med.Env.H.* - 2010. - V.23, N.1. - P.63-73.
9. Chessex Ph. et al. // *J.Pediatr.Gastroenterol.Nutr.* - 2001. - V.32, N.3. - P.316-321.
10. Commandeur J.N.M. et al. // *Pharmacol.Rev.* - 1995. - V.47, N.2. - P.271-330.
11. Dai. J. et al. // *Chem.Res.Toxicol.* - 2002. - V.15, N.12. - P.1581-1588.
12. Doorten A.Y.S. et al. // *Toxicol.Vitro.* - 2004. - V.18. - P.271-277
13. Gillman I.G. // *Chem.Res.Toxicol.* - 1999. - V.12, N.11. - P.1066-76.
14. Hassen W. et al. // *Toxicol.* - 2007. - V.242, N.1-3. - P.63-70.
15. Hatey F., Galtier P. // *Ann.Rech.Vet.* - 1977. - V.8, N.1. - P.7-12.
16. Hedelberg S. et al. // *J.Appl.Toxicol.* - 1989. - V.9, N.2. - P.91-96.
17. Hoehler D. et al. // *J.Biol.Chem.* - 1996. - V.271, N.44. - P.27388-27394.
18. Hoehler D. et al. // *Can.J.Anim. Sci.* - 1997. - V.77. - P.287-292.
19. Keppler D., Konig J. // *FASEB J.* - 1997. - V.11. - P.509-516.
20. Klarić M.S. et al. // *Basic Clin.Pharm.Toxicol.* - 2007. - V.100, N.3. - P.157-164.
21. Kumagai S. // *Food Chem.Toxicol.* - 1985. - V.23, N.10. - P.941-943.
22. Kumar A. et al. // *Avian Dis.* - 2003. - V.47, N.2. - P.415-424.

23. Madhyastha M.S. et al. // *Arch.Envir.Cont.Tox.* - 1992. - V.23, N.4. - P.468-472.
24. Marin-Kuan M. et al. // *Toxicol.Sc.* - 2006. - V.89, N.1. - P.120-134.
25. Marquardt R.R., Frohlich A.A. // *J.Anim.Sci.* - 1992. - V.70. - P.3968-3988.
26. Oshino R. et al. // *J.Biochem.* - 1990. - V.107. - P.105-110.
27. Panozzo M.P. et al. // *Clin.Exp.Pharm.Physiol.* - 1995. - V.22, N.4. - P.266-271.
28. Ribelin W.E. // *Can.J.Comp.Med.* - 1978. - V.42, N.4 — P.172-176.
29. Richard J.L. et al. // *Appl.Microb.* - 1975. - V.29, N.1. - P. 27-29.
30. Sakthivelan S.M., Rao G.V.S. // *Vet.Med.Int.* - 2010. - P.1-4.
31. Sha S.H. et al. // *Hear Res.* - 2001. - V.155, N.1-2. - P.1-8.
32. Soyoz M. et al. // *Cell.Biol.Toxicol.* - 2004. - V.20, N.4. - P.213-219.
33. Sreemannarayana O. et al. // *Arch.Envir.Cont.Tox.* - 1989. - V.18, N.3. - P.404-410.
34. Stoev S.D. et al. // *Exp.Toxicol.Pathol.* - 2011 (в друці).
35. Storen O. et al. // *Appl.Environ.Microb.* - 1982. - V.44, N.4. - P.785-789.
36. Stormer F.C. et al. // *Appl.Environ.Microb.* - 1983. - V.45, N.4. - P.1183-1187.
37. Sutken E. et al. // *Int.J.Toxicol.* - 2007. - V.26, N.1. - P.81-87.
38. Szczech G.M., Hood R.D. // *Amer.J.Pathol.* - 1978. - V.91, N.3. - P.689-692.
39. Tozlovanu R. et al. // *Chem.Res.Toxicol.* - 2006. - V.19. - P.1241-1247.
40. Uchiyama S., Saito Yu. // *J.Food Hyg.Soc.Jap.* - 1987. - V.28, N.6. - P.453-460.
41. Verma R., Chakraborty D. // *Acta.Pol.Pharm.* - 2008. - V.65, N.2. - P.187-194.
42. Wang G.H. et al. // *Poultry Sc.* - 2009. - V.88. - P.504-510.
43. Wu Q. et al. // *Curr.Drug.Metab.* - 2011. - V.12, N.1. - P.1-10.
44. Zepnik H. et al. // *Toxicol.Sc.* - 2001. - V.59. - P.59-67.

#### Summary

**Fedets O.M., Makukh Ye.M., Vyhnan D.S., Krasnevych A.Ya.**

***S.Z.Gzhytskyj Lviv National University of Veterinary Medicine and Biotechnologies***

#### **OCHRATOXIN AND GLUTATHIONE-RELATED ENZYMES**

*The data have been summarized on the mechanisms of action of ochratoxin on glutathione system of animals and the protective role of this system.*

**Key words:** *ochratoxin, glutathione, glutathione transferase, glutathione peroxidase, glutathione reductase.*

Рецензент – д.б.н., проф. Калачнюк Г.І.