ISSN 0233-7657. Биополимеры и клетка. 1996. Т. 12. № 6

Мембранотропный эффект бензола в микросомах печени крыс

А. Л. Суходуб

Харьковский государственный университет
310077, Харьков, пл. Свободы, 4

В работе изучено влияние бензола на некоторые параметры, характеризующие структурно-функциональное состояние микросомных мембран. Показано, что двукратное введение бензола крысам-самцам линии Вистар не приводит к существенным изменениям в содержании микросомных гемопротеидов, однако наблюдается достоверное длинноволновое смещение максимума поглощения дифференциального спектра цитохрома Р-450, а также инактивация глюкозо-6-фосфатной активности (Г-6-Фазы) и увеличение степени тушения флюоресценции АНС ионами Cu(II). Инкубация микросомной суспензии в условиях in vitro приводила к повышенному накоплению малонового диальдегида (МДА) и к инактивации Г-6-Фазы. Инкубация в аналогичных условиях, но в присутствии бензола также вызывала уменьшение содержания Г-6-Фазы, однако интенсивность накопления МДА была значительно меньше, чем в варианте без добавок. Добавка в среду инкубации помимо бензола НАДФН существенно ослабляла инактивирующее действие ксенобиотика на Г-6-Фазу. Высказано предположение о том, что введение ксенобиотика приводит к одновременному протеканию в мембранах микросом процессов распада определенных изоформ цитохрома Р-450 и синтеза новых, при этом происходят определенные изменения в организации фосфолипидного бислоя. Результаты опытов in vitro позволяют сделать вывод о том, что активация процессов метаболизма бензола существенно ослабляет его мембранотропное действие.

Введение. Большинство чужеродных соединений, попадающих в организм, подвергается первичному метаболизму в мембранах эндоплазматического ретикулума с участием цитохрома Р-450 [1]. Известно [1], что бензол и его производные относятся к числу промышленных ядов, в основе токсических эффектов которых лежат первичные изменения физико-химических свойств липидного бислоя биомембран. С другой стороны, соединения бензола в зависимости от дозы могут быть как индукторами, так и ингибиторами цитохрома Р-450 [2]. Целью настоящей работы было изучение влияния бензола на цитохром Р-450 и структурно-функциональное состояние мембраны микросом в условиях *in vivo* и *in vitro*.

Материалы и методы. Опыты выполнены на крысах-самцах линии Вистар массой 150—180 г. Бензол вводили в дозе 40 мг/100 г массы тела в течение двух дней. Микросомы печени выделяли, как описано [3]. В опытах *in vitro* реакционная среда объемом 1,2 мл содержала 100 мМ трис-HCl, pH 7,4, 7 мг микросомного белка, 1 мМ аскорбат, а также 150 мМ бензол (варианты 1 и 2) и 1,5 мМ НАДФН (вариант 1). После инкубации при 37 °С в течение 30 мин в закрытых сосудах пробы помещали на лед, затем отбирали аликвоты для определения исследуемых параметров. Содержание

© А. Л. СУХОДУБ, 1996

цитохромов Р-450 и b_5 определяли по [4], используя коэффициенты молярной экстинкции 91 и 164 $мМ^{-1}см^{-1}$ соответственно. Положение максимума поглощения гемопротеида, спектральную полуширину и калибровку шкалы спектрофотометра устанавливали согласно [5]. Глюкозо-6-фосфатазную активность определяли по методу [6]; количество образующегося малонового диальдегида (МДА) — по реакции с тиобарбитуровой кислотой [7]. Содержание белка регистрировали по методу Лоури и соавт. в модификации Миллера [8]. Статистическую обработку результатов проводили, используя *t*-критерий Стьюдента.

Результаты и обсуждение. Из результатов табл. 1 видно, что введение ксенобиотика в условиях *in vivo* не приводило к существенным изменениям в содержании цитохромов Р-450 и b_5, однако наблюдалось достоверное длинноволновое смещение максимума поглощения дифференциального спектра цитохрома Р-450, при этом форма спектра, характеризуемая спектральной полушириной ($\Delta\nu$) [5], достоверно не изменялась (см. табл. 1). Вполне вероятно, что наблюдаемое смещение максимума поглощения цитохрома Р-450 обусловлено образованием новых изоформ гемопротеида. Известно [9], что бензол индуцирует биосинтез изоформы IIE1 цитохрома Р-450, максимум поглощения СО-дифференциального спектра которой находится на 452 нм [10]. Можно предположить, что введение ксенобиотика стимулирует протекание двух противоположно направленных и взаимокомпенсирующихся процессов: с одной стороны, происходит деградация определенных изоформ цитохрома Р-450, с другой — синтез новых, таких как IIE1. Общий регистрируемый пул гемопротеида при этом не изменяется (см. табл. 1).

Таблица 1
Влияние введения бензола в условиях in vivo на некоторые показатели структурно-функционального состояния мембраны микросом печени крыс (n = 5—6)

Исследуемый параметр	Контроль	Опыт
Цитохром Р-450:		
пмоль/мг	432±30	345±40
λ_{max}, нм	450,4±0,11	451,04±0,11*
$\Delta\nu$, $см^{-1}$	856±50	772±40
Цитохром b_5, пмоль/мг	388±12	332±32
Глюкозо-6-фосфатаза, $нмоль \cdot мг^{-1} \cdot мин^{-1}$	92±2	67±8*
F_0/F	1,056±0,01	1,107±0,02*

*P < 0,05 по сравнению с контролем.

Весьма важным параметром, характеризующим структурно-функциональное состояние биомембран, является вязкость фосфолипидного бислоя. Один из способов оценки микровязкости мембран — определение интенсивности тушения флюоресценции мембраносвязанных зондов ионами тяжелых металлов, при этом чем выше микровязкость мембраны, тем эффективность тушения выше [11]. В табл. 1 представлены результаты определения степени тушения флюоресценции АНС 20 мкМ $CuCl_2$ (F_0/F). Как видно, под влиянием бензола происходит достоверное увеличение параметра F_0/F, что должно означать увеличение микровязкости мембраны. В микросомах крыс, получавших бензол, также отмечается достоверное падение глюкозо-6-фосфатазной активности, что может свидетельствовать о существенных изменениях в свойствах фосфолипидного бислоя [12].

Таблица 2
Влияние бензола на некоторые показатели структурно-функционального состояния микросомных мембран печени крыс при различных вариантах инкубации в условиях in vitro (n = 4—5)

Исследуемый параметр	Контроль	Вариант инкубации		
		1	2	3
Цитохром Р-450, пмоль/мг	500±25	609±30	432±43	552±42
Цитохром b_5, пмоль/мг	360±30	211±32 278±20***	362±24	357±36
Глюкозо-6-фосфатаза, нмоль·мг$^{-1}$·мин$^{-1}$	98,3±4,6	32,5±7,6*,**	9,5±1,1*	69,4±6,1
МДА, нмоль/мг	0,15±0,05	1,93±0,20*	2,26±0,24*	6,70±0,31

*P < 0,05 по сравнению с вариантом 3; **P < 0,05 по сравнению с вариантом 2; ***после продувки воздуха через контрольную кювету в течение 1 мин.

Инкубация в условиях *in vitro* (табл. 2) не приводит к значительным изменениям в содержании цитохромов Р-450 и b_5 во всех вариантах, в то время как глюкозо-6-фосфатазная активность достоверно уменьшается в вариантах 1—3 относительно контроля. Интенсивность накопления МДА была максимальной в варианте 3, в то время как добавка в среду инкубации бензола (варианты 1, 2) ингибировала процесс образования МДА. Данные результаты позволяют высказать предположение, что в основе инактивации глюкозо-6-фосфатазной активности в варианте 3 и в вариантах 1, 2 лежат различные механизмы. Так, в варианте 3 падение активности фермента, по-видимому, — это результат свободнорадикального повреждения молекулы каталитического белка, а в вариантах 1 и 2, скорее всего, — следствие прямого мембранотропного действия бензола. Важно отметить, что при инкубации микросом с бензолом и НАДФН (вариант 1) степень инактивации глюкозо-6-фосфатазы достоверно меньше, чем в варианте 2 (инкубация без НАДФН). Данный факт свидетельствует о том, что активация микросомного метаболизма бензола за счет добавления в среду НАДФН снижает его мембраноповреждающее действие. Логично предположить, что образующиеся продукты гидроксилирования бензола обладают менее выраженными мембранотропными свойствами, чем исходное вещество.

Таким образом, полученные в настоящей работе данные свидетельствуют об определенных структурно-функциональных перестройках, происходящих в мембранах микросом при введении бензола, что выражается в инактивации глюкозо-6-фосфатазы, увеличении микровязкости мембраны и в длинноволновом смещении максимума поглощения цитохрома Р-450. Результаты опытов *in vitro* позволяют сделать вывод о том, что в реализации мембранотропного действия бензола существенную роль играет интенсивность его метаболизма микросомной монооксигеназной системой.

А. Л. Суходуб

Мембранотропний ефект бензолу в мікросомах печінки щурів

Резюме

У роботі досліджено вплив бензолу на деякі параметри, що характеризують структурно-функціональний стан мікросомних мембран. Показано, що дворазове введення бензолу щурам-самцям лінії Вістар не призводить до суттєвих змін у вмісті мікросомних гемопротеїдів, проте спостерігається достовірне довгохвильове зміщення максимума поглинання диференційного

спектра цитохрому Р-450, а також зниження глюкозо-6-фосфатазної активності (Г-6-Фази) та збільшення ступеня гасіння флюоресценції АНС іонами Cu(II). Інкубація мікросомної суспензії в умовах in vitro приводила до підвищеного накопичення малонового діальдегіду (МДА) та до інактивації Г-6-Фази. Інкубація в аналогічних умовах, але у присутності бензолу також викликала інактивацію Г-6-Фази, але інтенсивність накопичення МДА була значно меншою, ніж у варіанті без добавок. Додавання у середовище інкубації, окрім бензолу, НАДФН суттєво послаблювало інактивуючу дію ксенобіотика на Г-6-Фазу. Висунуто припущення стосовно того, що введення ксенобіотика призводить до одночасного протікання у мембранах мікросом процесів розпаду окремих ізоформ цитохрому Р-450 та синтезу нових, при цьому мають місце деякі зміни в організації фосфоліпідного бішару. Результати дослідів in vitro дозволяють зробити висновок, що активація процесів метаболізму бензолу значно послаблює його мембранотропну дію.

A. L. Sukhodub

Benzene membranotropic action in rat liver microsomes

Summary

Benzene influence on some microsomal membranes characteristics was carried out. It has been shawn, that benzene incorporation cause decrease in glucose-6-phosphatase activity and membrane fluidity. It was obtained the longwave shift in cytochrome P-450 absorption spectra maximum, without changes in the content of hemoprotein. Studies in vitro has shawn, that membranotropic benzene action is largely decreased after NADPH addition in the medium.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Губский Ю. И., Долго-Сабуров В. В., Храпак В. Б.* Химические катастрофы и экология.—Киев: Здоровье, 1993.—224 с.
2. *Голиков С. Н., Саноцкий И. В., Тиунов Л. А.* Общие механизмы токсического действия.—Л.: Медицина, 1986.—280 с.
3. *Лемешко В. В.* Система микросомального окисления при развитии и старении организма // Биохимия.—1980.—**45**, № 11.—С. 1964—1969.
4. *Omura T., Sato R.* The carbon monoxide binding pigment of liver microsomes // J. Biol. Chem.—1964.—**239**, N 7.—P. 2379—2385.
5. *Паперно Т. Я., Поздняков В. П., Смирнова А. А., Елагин Л. М.* Физико-химические методы исследования в органической и биологической химии.—М.: Просвещение, 1977.—176 с.
6. *Рыбальченко В. К., Коганов М. И.* Структура и функции мембран.—Киев: Вища школа, 1988.—300 с.
7. *Владимиров Ю. А., Арчаков А. И.* Перекисное окисление липидов в биологических мембранах.—М.: Наука, 1972.—252 с.
8. *Miller G. I.* Protein determination for large numbers of samples // Anal. Chem.—1959.—**31**, N 5.—P. 964—966.
9. *Kato S., Onda M., Matsukara M. et al.* Cytochrome P4502E1 (CYP2E1) genetic polymorphism in a case-control study of gastric cancer and liver disease // Pharmacogenetics.—1995.—**5**, Sp. Iss.—P. S141—S144.
10. *Саприн А. Н.* Детоксикация ксенобиотиков в организме.—М.: ВИНИТИ, 1990.—Вып. 22.—С. 31—122.
11. *Лакович Дж.* Основы флюоресцентной спектроскопии.— М.: Мир, 1986.—496 с.
12. *Губский Ю. И.* Коррекция химического поражения печени.—Киев: Здоровье, 1989.—168 с.

УДК 577.336; 57.044

Поступила в редакцию 10.10.96