

Научно-исследовательский институт биомедицинской химии имени В.Н.Ореховича

Архив журнала

## Вопросы медицинской химии

*ISSN 0042-8809*

1985

**Внимание!** Распознавание текста проведено в автоматическом режиме для облегчения работы поисковых систем. Будьте внимательны при копировании, возможны ошибки и неточности. Используйте сканированный графический вариант.

Archive of journal

## Voprosy meditsinskoj khimii

*ISSN 0042-8809*

1985

**Attention!** OCR has been performed automatically for search engines only. Be careful when copying, errors are possible. Use scanned picture as standard.

<http://pbmc.ibmc.msk.ru>

ТОМ XXXI

ВЫПУСК 5

СЕНТЯБРЬ — ОКТЯБРЬ

Двухмесячный научно-теоретический журнал

Основан в 1955 г.

ВОПРОСЫ  
МЕДИЦИНСКОЙ  
ХИМИИ



МОСКВА. МЕДИЦИНА. 1985



РЕДАКЦИОННАЯ КОЛЛЕГИЯ:

Главный редактор С. С. ДЕБОВ

В. И. МАЗУРОВ (зам. главного редактора), Т. Т. БЕРЕЗОВ, Е. Н. ГЕРАСИМОВА, В. З. ГОРКИН, И. Б. ЗБАРСКИЙ, А. Н. КЛИМОВ, Б. Ф. КОРОВКИН, Л. А. ЛОКШИНА, В. Н. ОРЕХОВИЧ, Л. Ф. ПАНЧЕНКО, М. Ш. ПРОМЫСЛОВ, Е. Л. РОЗЕНФЕЛЬД, Ю. А. РОМАКОВ (ответственный секретарь), В. А. САКС, С. Е. СЕВЕРИН, В. Б. СПИРИЧЕВ

РЕДАКЦИОННЫЙ СОВЕТ:

БАЕВ А. А. (Москва)	ТРОИЦКИЙ Г. В. (Симферополь)
БЕЛИЦЕР В. А. (Киев)	ТАРАҚУЛОВ Я. Х. (Ташкент)
БЫЧКОВ С. М. (Москва)	ТЯХЕПЫЛЬД Л. Я. (Тарту)
КОНСТАНТИНОВ А. А. (Хабаровск)	УТЕВСКИЙ А. М. (Харьков)
КУДРЯШОВ Б. А. (Москва)	ШАПОТ В. С. (Москва)
ЛЯХОВИЧ В. В. (Новосибирск)	ЯКОВЛЕВ Н. Н. (Ленинград)
ПАСХИНА Т. С. (Москва)	ЯСАЙТИС А. А. (Вильнюс)

Адрес редакции журнала:

Москва, Солянка, 14

АМН СССР

Тел. 297-16-44

Зав. редакцией Л. А. Фирсова

1983

hosphate. PPase I dephosphorylated trimethaphosphate or casein. The enzyme molecular forms were different from each other by the value of specific activity and sensitivity to heat treatment. Two protein inhibitors eluted

by buffers of different ionic strength — 0.2 M and 1.6 M — were identified. One of them was inactivated during heat treatment (95°, 5 min), while the second inhibitor maintained completely its activity in these conditions.

УДК 612.351.11:577.152.11.014.46:615.214.24:547.854.5

*Л. Ф. Гуляева, В. М. Мишин*

## ИССЛЕДОВАНИЕ АКТИВНОСТИ МОНООКСИГЕНАЗНОЙ СИСТЕМЫ ПЕЧЕНИ КРЫС ПРИ ИНДУКЦИИ ФЕНОБАРБИТАЛОМ В РАННЕМ НЕОНАТАЛЬНОМ ПЕРИОДЕ

Отдел физиологии и патологии клетки Института клинической и экспериментальной медицины СО АМН СССР, Новосибирск

Особенности функционирования микросомной системы метаболизма ксенобиотиков печени в онтогенезе представляют большой интерес как с теоретической, так и с практической точки зрения. Ряд работ в этом направлении показал количественные и качественные различия между новорожденными и взрослыми особями [11, 15, 18]. В исследованиях, посвященных индукции монооксигеназной системы печени фетальных и неонатальных крыс, показано, что у эмбрионов нет чувствительности к индукции фенобарбиталом, в то время как 3-метилхолантрен индуцирует бенз(а)пирен гидроксилазную активность [3]. Однако в печени фетальных и неонатальных животных фенобарбитал индуцирует цитохром P-450, иммунологически идентичный цитохрому взрослых крыс [2]. Показано, что 3-метилхолантрен (типичный индуктор цитохрома P-448) у фетальных животных индуцирует цитохром P-450, характерный для индукции фенобарбиталом, хотя в печени матери регистрируется цитохром P-448 [9].

В настоящее время считается доказанным, что специфичность и активность метаболизма ксенобиотиков микросомной печени определяются набором множественных форм цитохрома P-450 [4]. Однако исследованию этого аспекта микросомной монооксигеназы у новорожденных животных посвящены лишь единичные и противоречивые сообщения. По-видимому, отмеченные выше различия могут быть обусловлены индукцией (или отсутствием индукции) множественных форм цитохрома P-450, отличающихся по количеству или каталитической активности от свойственных печени взрослых животных.

Применение иммунохимических методов с использованием антител к опреде-

ленным формам цитохрома P-450 позволяет определить не только качественный уровень индукции, но и выяснить вклад определенной формы цитохрома P-450 в метаболизм того или иного субстрата [17].

Нами исследована индукция ферментов монооксигеназной системы с точки зрения функционирования множественных форм цитохрома P-450 в раннем неонатальном периоде и предпринята попытка определить их участие в метаболизме некоторых ксенобиотиков.

### Методика

Объектом исследования служили новорожденные крысы линии Вистар (6--7, 17--18 дней). Индукцию микросомальных ферментов вызывали внутрибрюшинным введением фенобарбитала (80 мг на 1 кг массы), в течение 4 дней. Микросомы выделяли общепринятым методом дифференциального центрифугирования. Содержание цитохромов  $b_5$  и P-450 определяли, как описано ранее [10], содержание НАДФН-цитохром с редуктазы — по восстановлению цитохрома с [12]. Цитохром P-450 и P-448 из ткани взрослых животных выделяли, как описано в литературе [5], используя в качестве ионообменника ДЭАЭ-сефацель. Антитела к полученным цитохромам получали иммунизацией беспородных кроликов [6]. Сыворотку крови животных получали через 10 дней после разрешающего внутривенного введения антигена. Фракцию IgG выделяли из сыворотки крови фракционированием сульфата аммония. Скорость гидроксилирования бенз(а)пирена определяли флуоресцентным методом [11], скорость N-деметилирования бензфетаминна — методом Наш [16]. В качестве ингибитора реакции N-деметилирования бензфетаминна использовали антитела к цитохрому P-450 (анти-P-450) и цитохрому P-448 (анти-P-448). N-деметилирующую активность микросом в присутствии антител определяли после прешкубации в течение 10 мин. Эффект ингибирования антител рассчитывали, принимая за 100% максимальную скорость процесса в отсутствие антител. Белок определяли методом Лоури и соавт. [7], используя в качестве стандарта

Индукция	Возраст, дни	Активность НАДФН-цитохром с редуктазы, мкмоль/мин/мг	Количество цитохрома $b_5$ , нмоль/мг	Количество цитохрома P-450, нмоль/мг	Количество формы P-450ФБ, %	Каталитическая активность			
						бенз(а)пирен, нмоль 3-ОН бенз(а)пирена/мин/мг		бензфетамин, нмоль формальдегида/мин/мг	
Контроль	7—8	0,10	0,3	0,5	Не определяется	0,21	0,42	0,62	1,24
Фенобарбитал	7—8	0,15	0,3	0,6	18	0,90	1,40	1,10	1,80
Контроль	16—17	0,10	0,3	0,5	Не определяется	0,20	0,40	0,60	1,20
Фенобарбитал	16—17	0,25	0,4	1,6	20	1,30	1,00	1,60	1,10
Контроль	60—70	0,10	0,6	0,8	Не определяется	0,40	0,57	0,80	1,00
Фенобарбитал	60—70	0,28	0,6	2,2	50	0,60	0,25	4,00	1,82

бычий сывороточный альбумин. Реакцию двойной иммунодиффузии по Оухтерлони проводили, как рекомендовано [14]. Количественное определение цитохрома P-450 в микросомах проводили методом ракетного иммуноэлектрофореза [13].

### Результаты и обсуждение

В таблице представлены общие данные о микросомальных переносчиках электронов, участие которых в метаболизме ксенобиотиков считается доказанным [8]. Содержание цитохрома P-450, определенное по СО-восстановленному состоянию, и активность НАДФН-цитохром с редуктазы в микросомах контрольных животных в течение первых 3 нед жизни достаточно велики и сравнимы с этими показателями у взрослых животных. На рис. 1 представлен дифференциальный спектр цитохрома P-450 микросом печени новорожденных крыс, индуцированных фенобарбиталом, 7—8-дневного и 16—17-дневного возраста. Максимум поглощения СО-восстановленного спектра равен 450 нм, что соответствует

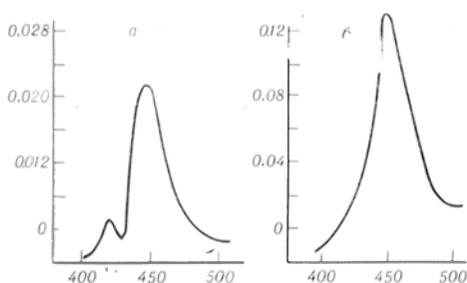


Рис. 1. Дифференциальный спектр цитохрома P-450 микросом печени крыс разного возраста, индуцированных фенобарбиталом.

*a* — 7—8-дневные крысы; *b* — 16—17-дневные крысы. По оси абсцисс — длина волны (в нм); по оси ординат — оптическая плотность. Микросомы содержат 1 мг белка в 1 мл буфера.

максимуму поглощения СО-восстановленного цитохрома взрослых животных, индуцированных фенобарбиталом. Индуцирующий эффект фенобарбитала на общее количество цитохрома P-450 не выявляется при введении этого индуктора крысам 1-й недели жизни и весьма отчетливо выражен на 16—17-й день развития. Однако индуцирующий эффект фенобарбитала на активность НАДФН-цитохром с редуктазы зарегистрирован на всех сроках развития. Содержание цитохрома  $b_5$  постепенно увеличивается в процессе развития, введение фенобарбитала не увеличивает его содержания на 1 мг микросомального белка.

Как известно, бензфетамин — наиболее специфичный субстрат для формы цитохрома P-450, индуцируемой фенобарбиталом в микросомах печени взрослых животных (P-450ФБ). Бенз(а)пирен является субстратом, специфически метаболизирующимся другой формой цитохрома P-450, а именно цитохромом P-448, индуцируемым метилхолантреном (P-448МХ). Поэтому для характеристик метаболизирующей активности микросом печени новорожденных крыс в качестве субстратов были выбраны эти два ксенобиотика.

Скорость N-деметилирования бензфетамин микросомами контрольных животных всех возрастов практически постоянна (см. таблицу). Индуцирующий эффект фенобарбитала проявляется при его введении животным. При расчете скорости на 1 мг белка видно, что с возрастом индуцирующий эффект увеличивается. Как видно из таблицы, у контрольных животных 7—8- и 16—17-дневного возраста наблюдается низкий уровень метаболизма бенз(а)пирена. При

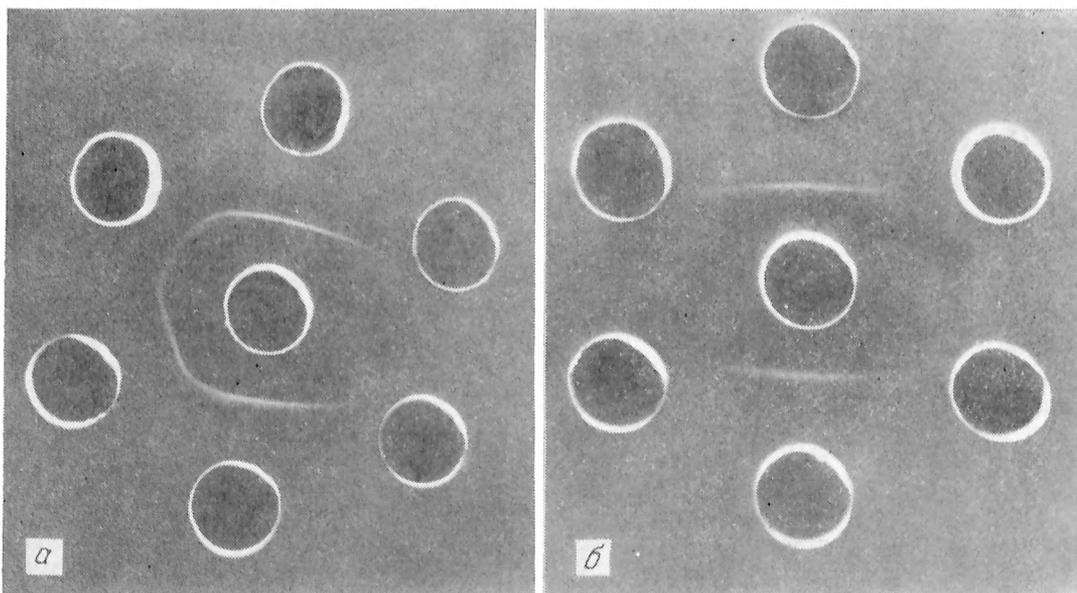


Рис. 2. Тест двойной иммунодиффузии по Оухтерлони.

В центральных лунках — иммуноглобулины анти-P-450ФБ (15 мг/мл) — *a* и анти-P-448МХ (9 мг/мл) — *б*. В лунках 1, 4 — цитохром P-450ФБ (1 нмоль/мл) — *a* и цитохром P-448МХ (1 нмоль/мл) — *б*; в лунке 2 — микросомы контрольных 16–17-дневных крыс (5 мг/мл), в лунке 5 — микросомы индуцированных 16–17-дневных крыс (5 мг/мл); в лунке 6 — микросомы индуцированных 7–8-дневных крыс (5 мг/мл).

индукции скорость его гидроксильирования увеличивается в несколько раз, причем при расчете скорости на 1 нмоль цитохрома (молекулярная активность) у 7–8-дневных крыс она максимальна, хотя количество цитохрома P-450, определенное по СО-восстановленному состоянию, практически не меняется. Этот факт, вероятно, может свидетельствовать об участии в метаболизме этого субстрата других форм цитохрома P-450, но не цитохрома P-448МХ, который, как следует из теста двойной иммунодиффузии по Оухтерлони, отсутствует как у контрольных, так и индуцированных животных (рис. 2). Вполне возможно, что формы цитохрома P-450, которые участвуют в метаболизме бенз(а)пирена, обладают максимальной молекулярной активностью, которая заметно снижается с возрастом.

С целью выяснения наличия определенной формы цитохрома, индуцируемой в исследуемом промежутке времени, мы использовали иммунохимические методы с применением антител к характерным для взрослых животных формам цитохрома: P-450ФБ и P-448МХ. Методом двойной иммунодиффузии по Оухтерлони установлено, что микросомы печени крыс первых недель жизни, индуцированных фенobarбиталом, образу-

ют полосу преципитации с анти-P-450ФБ и эти полосы сливаются с полосою, образованной преципитацией «взрослого» цитохрома P-450, чего не наблюдается для контрольных микросом (см. рис. 2).

Для количественной оценки индукции был применен метод ракетного иммуноэлектрофореза. Содержание цитохрома P-450ФБ, измеренное этим методом, в микросомах печени новорожденных крыс невелико и составляет 20% от общего содержания цитохрома, определенного по СО-восстановленному состоянию, в отличие от взрослых, где оно равно 50% (см. таблицу). Таким образом, из данных иммунохимического анализа следует, что у крыс раннего неонатального периода фенobarбитал индуцирует форму цитохрома P-450ФБ, которая индуцируется и у взрослых крыс.

Мы проверили участие этой формы в метаболизме бензфетаминна. Как видно из рис. 3, ингибирование метаболизма этого соединения антителами к цитохрому P-450ФБ взрослых животных наблюдается для всех возрастов, причем степень ингибирования различна для каждого возраста. Неполное ингибирование метаболизма бензфетаминна у крыс первых недель жизни, видимо, свидетельствует, что в деметилировании этого субстрата участвуют другие формы ци-

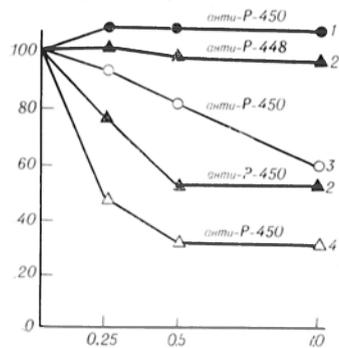


Рис. 3. Ингибирование метаболизма бензфетамина в микросомах новорожденных крыс различными антителами.

По оси абсцисс — количество IgG (в мг на 0,1 нмоль цитохрома P-450); по оси ординат — максимальная скорость (в %). 1 — микросомы контрольных 16—17-дневных крыс; 2 — микросомы индуцированных 16—17-дневных крыс; 3 — микросомы индуцированных 7—8-дневных крыс; 4 — микросомы взрослых индуцированных крыс.

тохрому P-450, кроме P-450ФБ, характерные для новорожденных крыс. У взрослых животных в метаболизме бензфетамин участвует преимущественно форма P-450ФБ, что следует из картины ингибирования. У контрольных крыс метаболизм этого субстрата одинаков для всех возрастов и нечувствителен к антителам, что также свидетельствует об участии в этом процессе других форм цитохрома P-450, но не P-450ФБ. Вполне возможно, что это те же формы, которые участвуют в метаболизме бензфетамин у индуцированных животных и представляют собой так называемые конститутивные формы цитохрома P-450. С возрастом их участие в деметилировании бензфетамин подавляется. Следует отметить, что антитела к цитохрому P-448 не ингибируют метаболизм этого соединения. Таким образом, данный гемопроген не участвует в указанной реакции. Известно, что у 7—8-дневных индуцированных животных скорость N-деметилирования этого субстрата увеличивается в 2 раза по сравнению с контролем, хотя заметного увеличения содержания цитохрома P-450, определенного по СО-восстановленному состоянию, не наблюдается. В то же время содержание цитохрома P-450ФБ, определенное иммунохимически, составляет 18% от общего содержания цитохрома P-450 в микросомах. Небольшое количество цитохрома P-450 и в то же время его относительно высокая каталитическая активность у индуцированных животных 1-й недели жизни

ни могут свидетельствовать о высокой молекулярной активности фермента по сравнению с животными более позднего возраста.

Таким образом, исследование активности монооксигеназной системы микросом печени крыс в онтогенезе позволяет сделать вывод о временной регуляции активности некоторых форм цитохрома P-450. Иммунохимический анализ демонстрирует количественное увеличение цитохрома P-450ФБ среди общего пула цитохрома P-450, но не цитохрома P-448, который индуцируется у крыс при введении им некоторых полициклических углеводородов (метилхолантрена,  $\beta$ -нафтофлавона).

Исследование каталитической активности ферментов метаболизма ксенобиотиков показало, что введение фенобарбитала крысам раннего неонатального возраста индуцирует бензфетамин-N-деметилазную и бенз(а)пирен-гидроксилазную активности. Анализ ингибирования метаболизма этих субстратов антителами к некоторым формам цитохрома P-450 показал, что в этих реакциях участвует несколько форм цитохрома, характерных для цитохромов новорожденных крыс и отличающихся от цитохромов взрослых животных.

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Цырлов И. Б., Ляховиц В. В.— Биохимия, 1979, т. 44, с. 1172—1183.
2. Grestleil T., Provost E., Flinois J.-P. et al.— Biochem. biophys. Res. Commun., 1982, v. 106, p. 823—830.
3. Guehlthner T. S., Mannering G. J.— Biochem. Pharmacol., 1977, v. 26, p. 567—575.
4. Guengerich F. P.— J. biol. Chem., 1977, v. 252, p. 3970—3979.
5. Guengerich F. P., Martin M. V.— Arch. Biochem., 1980, v. 205, p. 365—379.
6. Kamataki T., Belcher D. H., Neal R. A. Molec. Pharmacol., 1976, v. 12, p. 921—932.
7. Lowry P. H., Rosebrough N. J., Farr A. L. et al.— J. biol. Chem., 1951, v. 19, p. 265—275.
8. Lu A. Y. H., Levin W.— Biochim. biophys. Acta, 1974, v. 344, p. 205—240.
9. Misokami K., Sunuichi M., Inoue K. et al.— Biochem. biophys. Res. Commun., 1982, v. 107, p. 6—11.
10. Omura T., Sato R.— J. biol. Chem., 1964, v. 239, p. 2379—2385.
11. Pacifici G. M., Davies D. S., Whyte C. et al.— Xenobiotica, 1982, v. 2, p. 591—598.
12. Phillips A. V., Langdon R. G.— J. biol. Chem., 1962, v. 237, p. 2652—2660.
13. Pickell C. B., Jeter R. L., Morin J. et al.— Ibid., 1981, v. 256, p. 8815—8820.

14. Ryan D. E., Thomas P. E., Levin W.—*Ibid.*, 1980, v. 255, p. 7941—7955.
15. Schwab G. E., Norman R. L., Muller-Eberhard U. et al.—*Molec. Pharmacol.*, 1979, v. 17, p. 218—224.
16. Smucler E. A., Arrhenius E., Hultin T.—*Biochem. J.*, 1967, v. 103, p. 55—64.
17. Thomas P. E., Korzeniowski D., Ryan D. et al.—*Arch. Biochem.*, 1979, v. 192, p. 524—532.
18. Wiebel F. J., Gelboin H. V.—*Biochem. Pharmacol.*, 1975, v. 24, p. 1511—1515.

Поступила 24.04.84

ACTIVITY OF THE LIVER TISSUE MONOOXYGENASE SYSTEM AFTER INDUCTION BY MEANS OF PHENOBARBITAL AT EARLY NEONATAL AGE IN RATS

*L. F. Guljaeva, V. M. Mishin*

Department of Cell Physiology and Pathology, Institute of Clinical and Experimental

Medicine, Siberian Branch of the Academy of Medical Sciences of the USSR, Novosibirsk

Activity of enzymes participating in metabolism of xenobiotics was studied after their induction by means of phenobarbital in rats of Wistar strain within first weeks of life. After administration of phenobarbital into the neonatal rats content of cytochrome P-450 and activity of NADPH-cytochrome c reductase were increased in liver microsomes. The rates of N-demethylation of benzphetamine and benz( $\alpha$ )pyrene hydroxylation were also increased after administration of the inducing agent. Immunochemical studies with antibodies towards some forms of cytochrome P-450 showed that enzymatic forms of cytochrome P-450 PB were induced; this enzymatic form is predominant in adult animals treated with phenobarbital. When the metabolism of benzphetamine and benz( $\alpha$ )pyrene was inhibited by antibodies, several forms of cytochrome P-450, involved in these metabolic reactions were found in neonatal rats, whereas in the adult animals only one form of the enzyme exhibited activity towards these substrates.

УДК 612.35.015.32:547.915

*Д. Г. Пичин, В. Н. Титов, М. П. Василева-Димова, В. М. Санфирова*

**ДЕЙСТВИЕ АДРЕНОКОРТИКОТРОПНОГО ГОРМОНА  
НА БИОСИНТЕЗ СОСТАВНЫХ КОМПОНЕНТОВ  
ГЛИЦЕРОЛИПИДОВ В ПЕЧЕНИ КРЫС**

ВКНИЦ АМН СССР, Москва, Институт гастроэнтерологии и питания Медицинской академии, София, НРБ

Однократное введение аденокортикотропного гормона (АКТГ) подопытным животным приводит к накоплению в печени липидов, преимущественно триацилглицеридов [27, 32]. Натуральные и синтетические глюкокортикоиды оказывают действие, сходное с АКТГ, вызывая липоидоз гепатоцитов [18]. Влияние АКТГ на обмен липидов, с одной стороны, связано с тем, что гормон индуцирует липолиз в жировой ткани, активизирует приток жирных кислот (ЖК) к печени и их последующую этерификацию в триацилглицериды [24, 43]. При этом одновременно с ЖК усилена этерификация в триацилглицериды и ( $^{14}\text{C}$ )-глицерина [13, 21]. Не исключено, что действие АКТГ в более поздние сроки связано со стимуляцией коры надпочечников и выбросом в кровь синтезированных глюкокортикоидов, кортизола или кортикостерона [4, 17, 29]. Возможно, что жировая инфильтрация печени является именно следствием гиперпродукции глюкокортикоидов. Известно, что повышение в крови уровня кортизола при болезни Иценко — Кушинга и али-

ментарном ожирении сопровождается накоплением в организме триацилглицеридов [12]. У мышей с наследственным ожирением (линии С57В1/6J) содержание АКТГ и кортикостерона в крови повышено в 5—6 раз по сравнению с таковым у животных других линий. В условиях экспериментального гиперкортицизма, индуцированного введением пролонгированного АКТГ, скорость липогенеза значительно возрастает [34].

В ранее выполненных исследованиях определено влияние гормонов на суммарный липогенез (включение меченого предшественника в пул триацилглицеридов или ЖК печени). Поскольку регуляция биосинтеза отдельных компонентов общих фосфолипидов (ОФ) и триацилглицеридов осуществляется разными механизмами, мы сочли целесообразным исследовать влияние АКТГ раздельно на биосинтез индивидуальных ЖК и глицериновой части глицеролипидов. В целях получения информации о механизмах регуляции АКТГ биосинтеза липидов и возможной роли в этом процессе специфических белков, в ряде