

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 1995

УДК 616.13-004.6-07:616.153.963,915-02:577.152.11092.9

М.И.ДУШКИН, Н.К.ЗЕНКОВ, Е.Б.МЕНЬШИКОВА,
Е.Н.ПИВОВАРОВА, Г.Ю.ЛЮБИМОВ, Н.Н.ВОЛЬСКИЙ

ВЛИЯНИЕ ИНГИБИТОРОВ ЦИТОХРОМА Р-450 НА ОКИСЛИТЕЛЬНУЮ МОДИФИКАЦИЮ ЛИПОПРОТЕИНОВ НИЗКОЙ ПЛОТНОСТИ МАКРОФАГАМИ

Институт общей патологии и экологии человека СО РАМН, Новосибирск

В патогенезе атеросклероза важная роль отводится окисленным липопротеинам низкой плотности (ЛПН) [23]. Было показано, что перитонеальные макрофаги, так же, как и макрофаги, выделенные из атеросклеротически поврежденных сосудов, способны окислять ЛНП [26]. Эта клеточная окислительная модификация ЛНП ингибируется антиоксидантами: пробуколом, аскорбатом, убихинолом, флавоноидами, витамином Е, уратом, что убедительно доказывает участие свободнорадикальных реакций в окислительной модификации ЛНП [13]. Действительно, в силу своих функциональных особенностей фагоцитирующие клетки содержат ферментативные комплексы, активация которых сопровождается резким усилением генерации активированных кислородных метаболитов (АКМ). К ним относятся мембранно-связанная НАДФН-оксидаза, генерирующая супероксидный анион-радикал $O_2^{\cdot -}$; индуцибельная NO-синтетаза, источник NO-радикала, который в свою очередь, взаимодействует с O_2 и $O_2^{\cdot -}$, образует сильные окислители NO_2^{\cdot} , NO_3^{\cdot} и пероксинитрит; миелопероксидаза, высвобождение которой приводит к синтезу гипогалоидов [4]. В неактивированных фагоцитах эффективными источниками АКМ являются митохондриальная оксидаза, микросомальные монооксигеназы, а также реакции окисления арахидоновой кислоты [4, 9].

Проведенные исследования механизмов окислительной модификации ЛНП показали, что активация НАДФН-оксидазы в моноцитах при их культивировании с ЛНП увеличивает содержание в последних органических перекисей [10], однако в результате выполненного W.Jessup и соавт. [17] тщательного исследования сделан вывод о том, что продукция $O_2^{\cdot -}$ макрофагами не связана с их способностью окислять ЛНП. Результаты работы [17] подтверждаются отсутствием окислительной модификации ЛНП в среде, содержащей ксантин/ксантинооксидазу [14]. Одновременное образование в бесклеточной среде $O_2^{\cdot -}$ и NO^{\cdot} вызывало окислительную модификацию ЛНП [11], однако ингибирование NO^{\cdot} -синтазы и наработки NO^{\cdot} в макрофагах не только не снижало окисление ЛНП, а, напротив, усиливало его [16]. Подавление активности 5- и 15-липоксигеназ снижает клеточное окисление ЛНП [19], вместе с тем анализ концентрации эффективности и специфичности применяемых ингибиторов свидетельствует об их скорее антиоксидантном, нежели антилипоксигеназном действии [22]. Таким образом, в настоящее время нет однозначного ответа на вопрос, какие механизмы лежат в основе окисления ЛНП макрофагами *in vivo*.

В резидентных макрофагах эффективным источником АКМ являются микросомальные оксигеназы [9]. Поэтому мы исследовали влияние ин-

гибиторов цитохрома Р-450 кетоконазола [15, 18], метоксалена [25] и α -нафтофлавона [18] на окисление ЛНП резидентными и бенз[α]пирен-индуцированными перитонеальными макрофагами.

Методика. ЛНП (1,019 — 1,055 г/мл) выделяли из плазмы доноров с нормальными липидными показателями методом ультрацентрифугирования [6]. ^{125}I -ЛНП получали йодмонохлоридным методом с последующим удалением непрореагировавших низкомолекулярных продуктов хроматографией на сефадексе G-25, как описано нами ранее [2].

Резидентные перитонеальные макрофаги получали от мышей C57Bl/6J массой 16 — 18 г. Брюшную полость мышей промывали охлажденной средой 199, клетки дважды отмывали и ресуспендировали в концентрации $1,5 \cdot 10^6$ клеток/мл в среде RPMI-1640 (НПО "Вектор", Новосибирск) с добавлением 20% эмбриональной телячьей сыворотки и 50 мкг/мл гентамицина. Суспензию клеток разливали по 2 мл в пластиковые чашки диаметром 40 мм, после 4 ч. инкубации клетки удаляли двукратным промыванием, к полученному монослою макрофагов добавляли 2 мл культуральной среды и инкубировали в течение ночи при 37°C и 95% влажности в атмосфере 5% CO_2 . Полученные таким образом монослои клеток использовали для изучения окислительной модификации ЛНП, исследования деградации ^{125}I -ЛНП и хемилюминесцентного анализа.

Индукцию бенз[α]пиренгидроксилазы в макрофагах осуществляли, инкубируя клетки в течение 24 ч в среде RPMI-1640, содержащей 10% сыворотки крупного рогатого скота, 50 мкг/мл гентамицина и 4 мкг/мл бенз[α]пирена ("Sigma", США), добавляемого в 5 мкл диметилсульфоксида. Индукцию бенз[α]пиренгидроксилазы определяли флюорометрически (возбуждение при 466 нм и регистрация при 522 нм) [12], используя в качестве стандарта 3-гидроксibenз[α]пирен [1].

Для проведения клеточной окислительной модификации ЛНП монослой макрофагов инкубировали в среде, содержащей 50 мкг/мл гентамицина, 0,01% липопротеиндефицитной сыворотки и 200 мкг/мл ЛНП или 50 мкг/мл ^{125}I -ЛНП, при 37°C в течение 24 ч. Аутоокисление ЛНП (280 мкг/мл) или ^{125}I -ЛНП (250 мкг/мл) проводили в среде Дульбеко без Ca^{2+} и Mg^{2+} в присутствии 10 мкМ CuSO_4 или 10 мкМ FeSO_4 при 37°C в течение 6 ч. Ингибиторы цитохром-Р-450-зависимых ферментов кетоконазол, метоксален, α -нафтофлавон ("Sigma", США) добавляли в инкубационную среду в растворе этанола в объеме 5 мкл на 1 мл среды. Окисление ЛНП останавливали добавлением бутирилгидрокситолуола в метаноле до конечной концентрации 20 мкМ. Окислительную модификацию ЛНП оценивали, определяя продукты, реагирующие с тиобарбитуровой кислотой (ТБК-реактивные продукты) [21]; скорость деградации ^{125}I -ЛНП в свежем монослое макрофагов, культивируемых при 37°C в течение 5 ч. [24], и скорость миграции ЛНП в агарозном геле определяли, как подробно описано ранее [2,3].

Хемилюминесценцию (ХЛ) измеряли на хемилюминометре "Фотон" производства СОПКТБ СО ВАСХНИЛ по методу [5]. Для этого пластиковые чашки с монослоем дважды промывали средой Хенкса без фенолового красного, добавляли 2 мл 10^{-4} М раствора люцигенина ("Reanal") в среде Хенкса и помещали в термостатированную при 37°C ячейку хемилюминометра. В течение 3 мин. регистрировали спонтанную ХЛ, затем добавляли 10 мкл этанольного раствора соответствующего ингибитора или

10 мкл этанола (контроль) и регистрировали изменение свечения в течение 3 мин, после чего макрофаги стимулировали добавлением 0,2 мл суспензии (20 мг/мл) зимозана (Олайнский завод биопрепаратов), опсонизированного сывороткой мышей. После добавления измеряли интенсивность ХЛ макрофагов до наступления максимума свечения.

Статистическую обработку данных 3—5 независимых экспериментов проводили с использованием *t*-критерия Стьюдента.

Результаты и обсуждение. Инкубирование ЛНП с макрофагами в среде с низким содержанием сыворотки (меньше 0,01%) приводило к увеличению содержания в них ТБК-реактивных продуктов (рис. 1) и скорости деградации ^{125}I -ЛНП макрофагами ($1,14 \pm 0,2$ и $6,22 \pm 1,5$ мкг белка ^{125}I -ЛНП на 1 мг клеточного белка при инкубации ЛНП в среде без клеток и с макрофагами соответственно), что находится в соответствии с данными других авторов [17,19]. Анализ действия ингибиторов цитохрома Р-450 на клеточное окисление ЛНП показал, что кетоконазол дозозависимо ингибирует, а метоксален и α -нафтафлавон в концентрациях до 80 мкМ не влияют на накопление ТБК-реактивных продуктов (см. рис. 1). Культивирование ^{125}I -ЛНП с макрофагами в присутствии 40 мкМ кетоконазола также снижало скорость их последующей деградации свежей культурой макрофагов с $5,76 \pm 0,8$ до $2,57 \pm 0,9$ мкг белка ^{125}I -ЛНП на 1 мг клеточного белка, в то время как метоксален (20 мкМ) и α -нафтафлавон (50 мкМ) не влияли на скорость деградации ^{125}I -ЛНП.

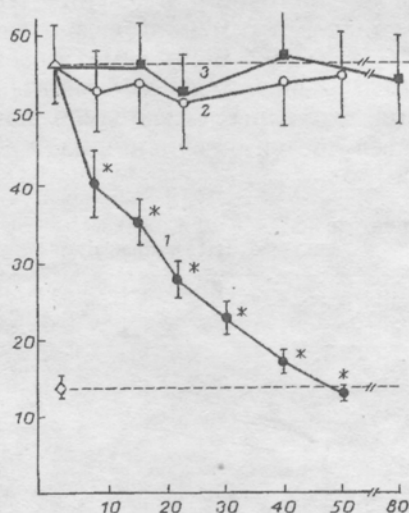


Рис. 1. Действие ингибиторов цитохрома Р-450 кетоконазола (1), метоксалена (2) и α -нафтафлавона (3) на окисление ЛНП перитонеальными макрофагами.

Треугольником (клеточный контроль) и верхней пунктирной линией обозначено содержание ТБК-реактивных продуктов в ЛНП, культивируемых с макрофагами в отсутствие ингибиторов, ромбом и нижней пунктирной линией — в ЛНП, культивируемых в бесклеточной среде. Звездочка — отличие от клеточного контроля достоверно при $p < 0,001$. По оси ординат — здесь и на рис. 2 — содержание в ЛНП ТБК-реактивных продуктов, нмоль МДА на мг белка ЛНП, по оси абсцисс — концентрация ингибитора, мкМ.

Инкубация макрофагов с бенз[а]пиреном (4 мкг/мл) приводила к индукции микросомальных монооксигеназ, что проявлялось в 2,2-кратном повышении активности бенз[а]пиренгидроксилазы (с $73,2 \pm 0,61$ в контроле до $161,38 \pm 1,44$ пМ 3-гидроксибенз[а]пирена в час на 1 мг белка). Ингибиторы цитохрома Р-450 кетоконазол (20 мкМ), метоксален (20 мкМ) и α -нафтафлавон (50 мкМ) снижали активность бенз[а]пиренгидроксилазы в 2,3, 2,5 и 2,8 раза соответственно. Индукция монооксигеназ приводила к усилению окислительной модификации ЛНП: на 41% повышалась концентрация ТБК-реактивных продуктов и на 98% — скорость деградации ^{125}I -ЛНП (см. таблицу). Ингибиторы цитохрома Р-450 кетоконазол, метоксален и α -нафтафлавон отменяли данный эффект. При этом кетоконазол был наиболее эффективен и в концентрации 40 мкМ снижал накопление ТБК-реактивных продуктов и скорость деградации ^{125}I -ЛНП до значений, которые были меньше величин, полученных для резидентных макрофагов (см. таблицу).

Таким образом, полученные результаты показывают, что среди изученных ингибиторов цитохрома Р-450 только кетоконазол ингибирует окислительную модификацию ЛНП резидентными макрофагами. Индукция микросомальных монооксигеназ бенз[а]пиреном приводит к усилению окисления ЛНП клетками, и в этом случае проявляется ингибиторный эффект метоксалена и α -нафтафлавона. Данный факт позволяет поставить вопрос о возможности участия ксенобиотиков в атерогенезе посредством индукции клеточной окислительной модификации ЛНП.

Обязательным условием клеточного окисления ЛНП является присутствие в среде ионов металлов переменной валентности [24]. В высоких концентрациях ионы Cu^+ и Fe^{2+} могут сами индуцировать окисление ЛНП, при этом ионы Cu^+ — значительно эффективнее, чем ионы Fe^{2+} [13]. С целью изучения возможных механизмов действия ингибиторов цитохрома Р-450 мы исследовали их влияние на окисление ЛНП, инду-

Действие ингибиторов цитохром-Р-450-зависимых ферментов на окислительную модификацию ЛНП макрофагами

Условия инкубации ЛНП	ТБК-реактивные продукты, нмоль МДА на 4 мг белка	Деградация, мкг белка ^{125}I -ЛНП на 1 мг белка клеток
Неинкубированные нативные ЛНП	$3,9 \pm 1,9^*$	$0,29 \pm 0,1^*$
ЛНП+среда инкубации	$14,3 \pm 2,7^*$	$0,74 \pm 0,3^*$
ЛНП+резидентные макрофаги	$49,2 \pm 2,4$	$5,76 \pm 0,8$
ЛНП+бенз[а]пирениндуцированные макрофаги	$69,4 \pm 3,6^*$	$11,44 \pm 3,2^*$
ЛНП+бенз[а]пирениндуцированные макрофаги +20мкМ кетоконазола	$40,9 \pm 2,3^{**}$	$4,86 \pm 1,2^{**}$
ЛНП+бенз[а]пирениндуцированные макрофаги +40мкМ кетоконазола	$26,1 \pm 2,4^{**}$	$2,57 \pm 0,9^{**}$
ЛНП+бенз[а]пирениндуцированные макрофаги +20мкМ метоксалена	$52,6 \pm 3,6^{**}$	$6,37 \pm 4,2^{**}$
ЛНП+бенз[а]пирениндуцированные макрофаги +50мкМ α -нафтафлавона	$46,8 \pm 2,6^{**}$	$6,31 \pm 3,9^{**}$

Примечание: Одна звездочка — отличие от значений, полученных при инкубации с резидентными макрофагами, достоверно ($p < 0,01$); две — отличие от значений, полученных при инкубации с бенз[а]пирениндуцированными макрофагами ($p < 0,05$).

цированное ионами меди и железа. Ни метоксален (20 мкМ), ни α -нафтафлавон (50 мкМ) не оказывали значимого действия на Cu^+ и Fe^{2+} -индуцированное окисление ЛНП, в то время как кетоконазол дозозависимо ингибировал накопление ТБК-реактивных продуктов, индуцированное ионами железа, и вместе с тем слабо влиял на Cu^+ -индуцированное окисление липопротеинов (рис. 2).

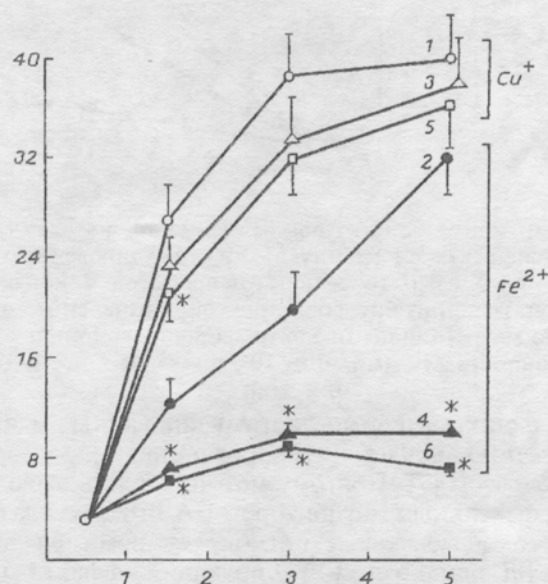


Рис. 2. Действие кетоконазола на окисление ЛНП, катализируемое ионами Cu^+ и Fe^{2+} .

Концентрации ионов Cu^+ и Fe^{2+} — 10 мкМ, кетоконазола — 0 (1, 2), 20 мкМ (3, 4) и 40 мкМ (5, 6). Звездочка — отличие от контроля достоверно при $p < 0,05$. По оси абсцисс — время инкубации, ч.

Данные об участии супероксидного анион-радикала в клеточном окислении ЛНП противоречивы: с одной стороны, индукция зимозаном НАДФН-оксидазы и продукция O_2^- не приводила к усилению окислительной модификации ЛНП макрофагами; с другой стороны, специфический ингибитор НАДФН-оксидазы дифенилениодоний, который связывается с гемовой частью цитохрома b_{558} , существенно ингибировал этот процесс [17]. Мы исследовали влияние ингибиторов цитохрома Р-450 на генерацию O_2^- макрофагами, определяемую с помощью люцигенинзависимой ХЛ. Кетоконазол (40 мкМ), метоксален (40 мкМ) и α -нафтафлавон (5 мкМ) достоверно снижали спонтанную ХЛ резидентных макрофагов (рис. 3, а). В отношении зимозанстимулированной ХЛ макрофагов эффект препаратов был не столь однозначным. Если кетоконазол значительно снижал зимозанстимулированную ХЛ (до $18 \pm 14\%$ контроля), то эффект α -нафтафлавона был менее выражен ($73 \pm 22\%$ от контроля), а

действие метоксалена было недостоверным (рис. 3, б).

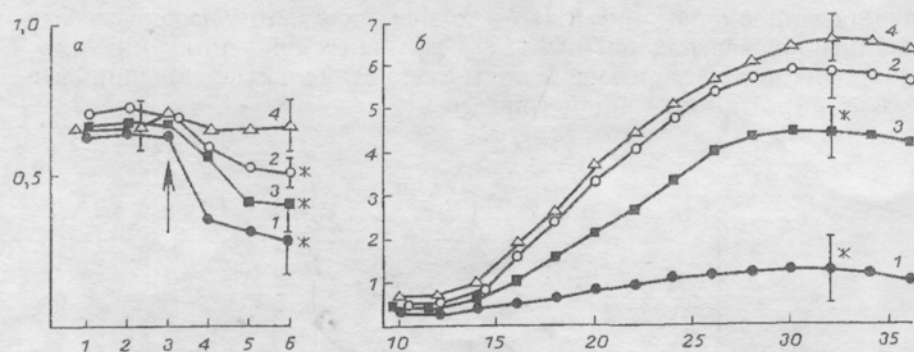


Рис. 3. Действие ингибиторов цитохрома Р-450 кетоконазола (1), метоксалена (2) и α -нафтафлавона (3) на спонтанную (а) и стимулированную зимозаном (б) люцигенинусиленную ХЛ перитонеальных макрофагов. 4 (контроль) — интенсивность ХЛ в отсутствие ингибиторов; стрелкой обозначен момент добавления ингибитора. Звездочка — отличие от контроля достоверно при $p < 0,05$. По оси ординат — интенсивность ХЛ, $\text{имп/мин} \cdot 10^3$; по оси абсцисс — время регистрации, мин.

Люцигенинусиленная ХЛ зимозанстимулированных макрофагов отражает преимущественно внеклеточную продукцию O_2^- мембранно-связанной НАДФН-оксидазой [7]. Поэтому можно сделать вывод, что кетоконазол является эффективным ингибитором НАДФН-оксидазы. Ранее было показано, что кетоконазол также ингибирует люминол+зависимую ХЛ клеток селезенки [8], однако его ингибирующий эффект был менее выражен. Это, по-видимому, связано с тем, что свечение люминола зависит от образования H_2O_2 , гипогалоидов, наличия пероксидаз, в то время как ХЛ люцигенина более специфично отражает наработку O_2^- [7]. Так как метоксален и α -нафтафлавон ингибируют спонтанную ХЛ резидентных макрофагов (см. рис. 3, а), но не влияют на окисление ЛНП (см. рис. 1), это косвенно подтверждает вывод работы [17] о том, что O_2^- прямо не участвует в окислении ЛНП.

Различие действия кетоконазола, метоксалена и α -нафтафлавона на окислительную модификацию ЛНП макрофагами можно объяснить различием механизмов их действия на ферменты. Известно, что кетоконазол действует на гемовую часть микросомальных и митохондриальных цитохромов [15,20]. Это действие связано с его хелаторными свойствами, которые определяются наличием имидазольной группы, что подтверждается его способностью ингибировать Fe^{2+} -индуцированное окисление ЛНП (см. рис. 2). По-видимому, действие кетоконазола на НАДФН-оксидазу также реализуется через ингибирование составной части фермента — гемового цитохрома b_{558} . Многие противоречивые данные об участии НАДФН-оксидазы и O_2^- в окислении ЛНП макрофагами, а также высокую ингибиторную активность кетоконазола (см. рис. 1), дифенилениодония, нативных и инактивированных препаратов супероксиддисмутазы [17] можно объяснить, если предположить, что в окислении ЛНП участвует не сам фермент НАДФН-оксидаза и ее основной продукт O_2^- , а

гемовый цитохром b₅₅₈, который может выступать своеобразным мембранно-связанным реактивом Фентона. Это предположение значимо еще и потому, что мембранно-связанные компоненты НАДФН-оксидазы выявляются в моноцитах, нейтрофилах, эндотелиоцитах, лимфоцитах, которые, как известно из литературы, также способны окислять ЛНП. Кроме того, оно может объяснить некоторые особенности цитотоксического действия макрофагов, поэтому, на наш взгляд, нуждается в дальнейшем подтверждении экспериментальными и клиническими исследованиями.

Данная работа выполнена благодаря финансовой поддержке Международного научного фонда (грант N RAЕ000).

ЛИТЕРАТУРА

1. Душкин М.И., Мандрикова Е.В., Любимов Г.И. и др. // Биохимия. — 1990. — Т. 55, вып. 9. — С. 1607-1615.
2. Душкин М.И., Корнюш Е.А., Поляков Л.М. и др. // Там же. — 1992. — Т. 57, вып. 8. — С. 1181-1191.
3. Душкин М.И., Зыков А.А., Пивоварова Е.Н. // Бюл. exper. биол. — 1993. — N 10. — С. 393-395.
4. Зенков Н.К., Меньщикова Е.Б. // Успехи соврем. биол. — 1993. — Т. 113, вып. 3. — С. 286-296.
5. Зенков Н.К., Душкин М.И., Любимов Г.Ю., Меньщикова Е.Б. // Вопр. мед. химии. — 1994. — т. 40, N 1. — С. 2-4.
6. Современные методы в биохимии / Под ред. В.Н.Ореховича. — М., 1977. — С. 248-253.
7. Aasen T.B., Bolann B., Glette J. et al. // Scand J. clin. Lab. Invest. — 1987. — Vol. 30. — P. 673-681.
8. Abruzzo G.K., Giltinan D.M., Capizzi T.P., Fromtling R.A. // J. antimicrob. Chemother. — 1986. — Vol. 29. — P. 602-607.
9. Bagchi M., Hassoun E.A., Bagchi D., Stohs S.J. // Free Radical Biol. Med. — 1993. — Vol. 14. — P. 149-155.
10. Cathcart M.K., McNally A.K., Morel D.W., Chisolm G.M. // J. Immunol. — 1989. — Vol. 142. — P. 1963-1969.
11. Darley-Usmar V.M., Hogg N., O'Leary V.J. et al. // Free Radical Res. Commun. — 1992. — Vol. 17. — P. 9-20.
12. Dehnen W., Tomingas R., Roos I. // Analyt. Biochem. — 1973. — Vol. 53. — P. 373-383.
13. Esterbauer H., Gebicki J., Puhl H., Jurgens G. // Free Radical Biol. Med. — 1992. — Vol. 13. — P. 341-390.
14. Heinecke J.W. // Ibid. — 1987. — Vol. 3. — P. 65-81.
15. Higashi Y., Omura M., Suzuki K. et al. // Endocr. Jap. — 1987. — Vol. 34. — P. 105-115.
16. Jessup W., Mohr D., Gieseg S.P. et al. // Biochim. biophys. Acta. — 1992. — Vol. 1180. — P. 73-82.
17. Jessup W., Simpson J.A., Dean R.T. // Atherosclerosis. — 1993. — Vol. 99. — P. 107-120.
18. Murray M., Reidy G.F. // Pharmacol. Rev. — 1990. — Vol. 42. — P. 85-101.
19. Rankin S.M., Parthasarathy S., Steinberg D. // J. Lipid Res. — 1991. — Vol. 32. — P. 449-456.
20. Rodrigues A.D., Lewis D.F.V., Ioannides C., Parke D.V. // Xenobiotica. — 1987. — Vol. 17. — P. 1315-1327.
21. Schuh J., Fairclough G.F., Haschemeyer R.H. // Proc. nat. Acad. Sci. USA. — 1978. — Vol. 75. — P. 3173-3177.
22. Sparrow C.P., Olszewski J. // Ibid. — 1992. — Vol. 89. — P. 128-131.
23. Steinberg D. // Atherosclerosis. Rev. — 1991. — Vol. 23. — P. 115-121.
24. Steinbrecher U.P., Parthasarathy D.S., Leake S.L. et al. // Proc. Nat. Acad. Sci. USA. — 1984. — Vol. 81. — P. 3883-3887.
25. Tinel M., Belghiti J., Descatoire V. et al. // Biochem. Pharmacol. — 1987. — Vol. 36. — P. 951-955.
26. Yla-Herttuala S. // Ann. Med. — 1991. — Vol. 23. — P. 561-567.

Поступила 20.09.94

EFFECTS OF CYTOCHROME INHIBITORS ON MACROPHAGE-INDUCED
OXIDATIVE MODIFICATION OF LOW-DENSITY LIPOPROTEINS

*M. I. Dushkin, N. K. Zenkov, Ye. B. Menshchikova, Ye. N. Pivovarova, G. Yu. Lyubimov,
N. N. Volsky*

Institute of General Pathology and Human Ecology, Siberian Branch of the Russian Academy
of Medical Sciences, Novosibirsk

Unlike other cytochrome P450-dependent oxygenase inhibitors, ketoconazole has been shown to suppress the murine macrophage-mediated oxidative modification of human low-density lipoproteins (LDL) in a dose-dependent manner. The benzo[*a*]pyrene-induced microsomal monooxygenase activity was accomplished by a 1.5-fold increase in LDL oxidation by macrophages, ketokonazole (20 μ), methoxalene (20 μ), and α -naphthaflavone (50 μ). Ketoconazole was also effective in inhibiting macrophageal NADPH oxidase and LDL autooxidation induced by Fe^{2+} rather than Cu^+ , which is likely to be associated with its ability to act as a chelator of free and heme-bound iron ions.