

А. Н. САПРИН, С. М. ГУРЕВИЧ, Е. Г. ЗВЕГИНЦЕВА

СВОБОДНЫЕ РАДИКАЛЫ И СИСТЕМА ДЕТОКСИКАЦИИ В МИКРОСОМАХ ПЕЧЕНИ ПРИ КАНЦЕРОГЕНЕЗЕ *

(Представлено академиком Г. М. Франком 27 III 1972)

Определяющую роль в первичных превращениях и детоксикации канцерогенов и других чужеродных для клетки веществ играют мембраны эндоплазматического ретикулума — микросомы, в которых локализованы специальные детоксицирующие системы. Особенности структуры и функционирования микросом подробно описаны в ряде фундаментальных обзоров (¹⁻³). Детоксикация чужеродных соединений осуществляется главным образом в микросомах печени, хотя в небольшой степени этот процесс осуществляется также в легких, желудочно-кишечном тракте, коже, почках (¹). Основная роль в детоксикации принадлежит терминальной оксидазе цепи свободного окисления микросом — цитохрому Р-450, более 90 % которого находится в микросомах в окисленном состоянии (¹⁻³). Одной из отличительных особенностей цитохрома Р-450 является то, что в окисленном состоянии он дает характерный анизотропный сигнал э.п.р. со значениями компонент g -фактора: $g_1 = 1,91$, $g_2 = 2,25$ и $g_3 = 2,42$ (⁴). Такой сигнал характерен для низкоспинового состояния трехвалентного железа в асимметричном окружении (^{5, 6}). Установлено, что сигнал э.п.р. микросом полностью определяется сигналом окисленного цитохрома Р-450. Наличие в микросомах характерного только для них сигнала э.п.р. делает их чрезвычайно удобным объектом для радиоспектроскопического исследования. Учитывая вышеизложенные факты, мы провели в данной работе исследование *in vitro* и *in vivo* изменений парамагнитных свойств микросом печени крыс под действием одного из самых сильных гепатотропных канцерогенов — диэтилнитрозоамин (ДЭН), а также оценили степень этих изменений в микросомах опухолей, индуцированных этим канцерогеном.

В опытах использовались крысы-самцы линии Вистар весом 150–200 г. Микросомы выделяли по методу Омуре и Сато (⁷). ДЭН был синтезирован в нашей лаборатории **. Для инкубации микросом с ДЭН использовалась следующая среда: НАДФ-Н 3 ммол., трис-буфер 50 ммол., $MgCl_2$ 7 ммол., KCl 100 ммол., pH 7,4 (в расчете на 30 мг/мл белка). Белок определяли по методу Лоури (⁸). Используемые концентрации ДЭН 40, 100, 200 и 400 ммол./л. Контролем служили микросомы, находившиеся на воздухе в течение времени, равного периоду инкубации с канцерогеном. Контролем для микросом, выделяемых из печени на разных стадиях канцерогенеза, служили микросомы печени здоровых крыс того же возраста. Спектры э.п.р. регистрировали при температуре -180° и -196° соответственно на радиоспектрометрах JES-P-10 и ЭПР-2. Дифференциальные спектры регистрировали на спектрометре ДСФ-2. Результаты представлены в виде отношений относительных амплитуд сигналов э.п.р. опытных образцов к контрольным с пересчетом на 1 мг белка и подвергнуты статистической обработке.

* Результаты предварительно были доложены на Международном симпозиуме «Исследование свободнорадикальных состояний в связи с их ролью в регуляции биологических процессов», 1971, Пущино-на-Оке.

** Авторы пользуются случаем выразить глубокую благодарность Л. Д. Смирнову за синтез ДЭН.

Инкубация с микросомами различных концентраций ДЭН приводила к некоторому возрастанию амплитуды всех трех компонент сигнала э.п.р. цитохрома Р-450 (~ на 30%) и сигнала свободных радикалов (с.р.) (~ на 15–20%) (рис. 1). В опытах не было обнаружено определенной зависимости между изменением сигналов э.п.р. микросом и используемыми концентрациями ДЭН. Можно лишь сказать, что более высокие концентрации ДЭН вызывали меньшее увеличение сигналов э.п.р. микросом, что, по-видимому, связано с проявлением денатурирующих свойств ДЭН.

В настоящее время различные соединения, претерпевающие превращения в микросомах, подразделяют на субстраты I и II типа (¹⁻⁴). Предполагается, что первые образуют с цитохромом Р-450 связь в гидрофобной области вблизи 6 лиганда, а вторые реагируют вблизи протопорфирина по типу замещения СО в его комплексе с железом цитохрома (³). На основании

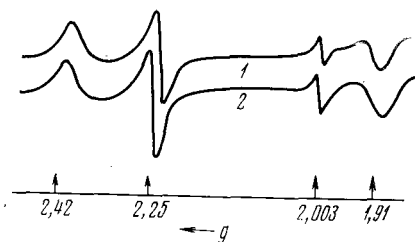


Рис. 1. Спектры э.п.р. микросом: 1 — intactных; 2 — при действии ДЭН (40 ммол.)

данных, полученных в наших опытах, нам представляется возможным отнести ДЭН к субстратам II типа. В пользу этого свидетельствуют следующие факты: 1) отсутствие в микросомах, взаимодействовавших с ДЭН, сигналов э.п.р. цитохрома в высокоспиновом состоянии (при g -факторе 6,0); 2) наличие в дифференциальном спектре микросом максимума поглощения при 420 м μ , что характерно для действия субстратов II типа и, наконец, тот факт, что мы не наблюдали снижения амплитуды анизотропного сигнала э.п.р. микросом с g -факторами 2,42; 2,25; 1,91. Наблюдаемое же некоторое увеличение сигналов микросом связано, по-видимому, с тем, что в данных условиях ДЭН в определенной степени ингибирует восстановление окисленного цитохрома.

На рис. 2 приведены кинетические кривые изменения интенсивности сигналов э.п.р. микросом печени на разных этапах ее злокачественного перерождения под действием ДЭН. Спектры э.п.р. микросом, выделенных из печени крыс на 48 суток от начала их кормления ДЭН, характеризуются лишь незначительным увеличением сигналов микросомальных гемопroteинов и с.р. (~ на 20–30%). На 100 суток (стадия предрака) наблюдается существенное увеличение интенсивности всех сигналов цитохрома Р-450 (~ на 70–100%) и сигнала с.р. (~ на 400%). На 130 суток, когда наблюдалось злокачественное перерождение ткани печени, отмечалось значительное снижение амплитуды всех сигналов. По мере дальнейшей прогрессии злокачественного процесса (на 200–230 суток) наблюдалось падение интенсивности всех сигналов микросом ниже нормы. Причем компоненты анизотропного сигнала с g -факторами 2,42, 2,25 и 1,91 уменьшались в ~3 раза, в то время как интенсивность сигнала с.р. уменьшалась всего лишь на 20–25%.

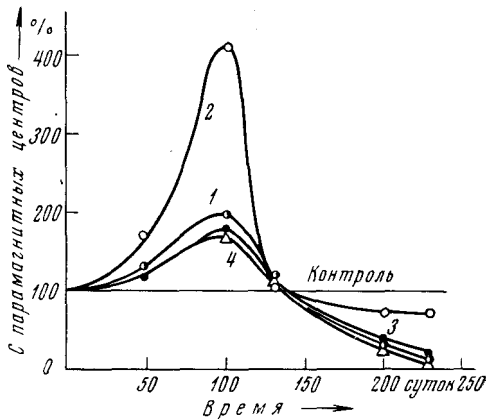


Рис. 2. Кинетические кривые изменения концентрации парамагнитных центров микросом в процессе канцерогенеза. 1 — $g = 1,91$; 2 — $g = 2,003$; 3 — $g = 2,25$; 4 — $g = 2,42$

Увеличение сигналов э.п.р. цитохрома Р-450 в стадии предрака можно, по-видимому, связать со свойствами ДЭН как индуктора системы микросомальных многоцелевых оксидаз. Наличие этих свойств было подтверждено нами в острых опытах. В микросомах, выделенных из печени крыс через 3 часа после введения им ДЭН в дозе ЛД₅₀, мы наблюдали значительное увеличение сигналов э.п.р. цитохрома Р-450 (в 1,6 раза) и сигнала с.р. (в 2 раза).

Увеличение концентрации с.р. в микросомах в стадии предрака в определенной степени, по-видимому, можно связать с интенсификацией в этот период радикального окисления липидов в мембранах эндоплазматического ретикулума, инициируемого под действием канцерогена, с допущением, что при взаимодействии с другими макромолекулами липидные перекисные радикалы ($g \sim 2,012$) могут трансформироваться в обычные более стабильные «семихинонные» радикалы ($g \sim 2,003$). С другой стороны, увеличение концентрации с.р. в микросомах, выделенных из печени в стадии предрака, можно, по-видимому, в определенной степени объяснить также увеличением образования радикальных форм флавинов за счет активации работы цепи свободного окисления микросом и с.р. аминокислотных остатков белковой части цитохрома Р-450 под действием активированного кислорода, поскольку в этот период мы наблюдали повышение содержания цитохрома. Возможность такого механизма обсуждается в работе (9).

По мнению Слейтера (10), интенсификация с.р. процессов в микросомах может приводить к повреждению микросомальных мембран за счет «выгорания» их липидной компоненты, к нарушению синтеза de novo компонент детоксицирующей системы микросом и к развитию в клетке патологических явлений. По-видимому, подобного же рода явление, имеющее, вероятно, существенное значение для малигнизации, происходит и в клетках печени крыс при ДЭН-канцерогенезе. О наличии деструктивных изменений микросом в процессе канцерогенеза сообщалось в работе (11). В работе (12) было установлено, что в клетках опухолей снижены количество эндоплазматического ретикулума, уровень и активность ферментов детоксицирующей системы, отражением чего может являться наблюдаемое в наших опытах снижение сигналов э.п.р. цитохрома Р-450, согласующееся с данными, полученными Небертом и Мэзоном на других видах опухолей (13).

Приведенные выше данные позволяют утверждать, что опухолевые ткани имеют существенно более низкий уровень детоксицирующей системы, чем нормальные ткани. Кроме того, оказывается, что этот уровень нельзя повысить введением индукторов микросомальной ферментной системы (14).

Мы имеем, таким образом, две группы фактов: 1) возможность индуцировать в микросомах печени и других нормальных тканей под действием неспецифических факторов повышенный уровень детоксицирующей системы (1-3, 14) и 2) наличие весьма низкого уровня детоксицирующей системы в микросомах опухолевых клеток, не реагирующего на действие этих факторов.

Все это позволило нам высказать гипотезу о том, что указанные факты в определенной степени можно использовать в целях химиотерапии опухолей. Как известно, в настоящее время имеется ряд противоопухолевых веществ, способных полностью рассасывать некоторые виды опухолей. Однако эти вещества оказывают сильное токсическое действие на нормальные ткани, в большинстве случаев приводя к летальному исходу, поэтому одной из важных проблем химиотерапии опухолей является проблема защиты нормальных тканей организма-опухоленосителя.

Мы предположили, что предварительным введением опухоленосителю (перед началом введения противоопухолевого вещества) какого-либо малотоксичного препарата, способного существенно повысить уровень детоксицирующей системы микросом нормальных тканей, можно предохранить

последние от токсического действия противоопухолевого препарата или увеличить его дозу, поскольку повышенный уровень детоксицирующей системы позволит нормальным тканям справиться с детоксикацией противоопухолевого вещества более быстро и полнее, естественно, исключая те случаи, когда в результате превращения в микросомах нормальных тканей противоопухолевый препарат не образует метаболитов, более токсичных, чем вещество.

Следует отметить, что в настоящее время одним из авторов (А. Н. Саприн) совместно с Л. Е. Козловой уже получены экспериментальные результаты, подтверждающие правильность и перспективность предложенной гипотезы. Мышам с асцитным раком Эрлиха на 5 сутки развития опухоли вводили индуктор системы микросомальных многоцелевых оксидаз 10-ацетилфенотиазин (10-АФТ), свойства которого как индуктора были изучены в работе ⁽¹⁵⁾, а через 48 час. после этого однократно вводили противоопухолевое вещество циклофосфамид (ЦФА) в дозе, которая в 2,5 раза превышала максимально переносимую. 10-АФТ не показал противоопухолевого эффекта. Введение животным одного ЦФА в этой дозе привело к гибели всех животных. В то же время в 3-й подопытной группе, которой вводили сначала 10-АФТ, а затем ЦФА, получено почти 80% излечение животных без каких-либо побочных эффектов. Все это указывает на перспективность развития исследований в этом направлении.

Институт химической физики
Академии наук СССР
Москва

Поступило
21 III 1972

ЦИТИРОВАННАЯ ЛИТЕРАТУРА

- ¹ Г. М. Маслова, Л. М. Райхман, В. П. Скулачев, Усп. совр. биол., 67, 400 (1969). ² Г. А. Белицкий, Усп. совр. биол., 68, 19 (1969). ³ А. И. Арчаков, Усп. совр. биол., 71, 163 (1971). ⁴ A. Mason, Ann. Rev. Biochem., 34, 595 (1965). ⁵ K. Murakami, H. Mason, J. Biol. Chem., 242, 1102 (1967). ⁶ J. Ichikawa, T. Yamano, Biochem. et biophys. acta, 153, 753 (1968). ⁷ T. Omura, K. Sato, J. Biol. Chem., 239, 2370 (1964). ⁸ O. H. Lowry, V. J. Rosebrough et al., J. Biol. Chem., 193, 265 (1951). ⁹ Б. Аннаев, Л. М. Райхман, Тез. симп. Свободно-радикальные состояния и их роль при лучевом поражении и злокачественном росте, М., 1971, стр. 10. ¹⁰ T. Slater, Proc. I. Europ. Biophys. Congress, Vienna, 1971, p. 220. ¹¹ Н. П. Дмитриева, Тр. IV Европ. конфер. по электронной микроскопии, Рим, 1968. ¹² R. Adamson, J. Fouts, Cancer Res., 21, 667 (1961). ¹³ D. Nebert, H. Mason, Cancer Res., 23, 883 (1963). ¹⁴ H. V. Gelboin, Успехи в изучении рака, 10, М., 1971, стр. 40. ¹⁵ L. W. Wattenberg, I. L. Leong, Cancer Res., 25, 365 (1965).