

В. Е. КАГАН, С. В. КОТЕЛЕВЦЕВ, Ю. П. КОЗЛОВ

**РОЛЬ ФЕРМЕНТАТИВНОГО ПЕРЕКИСНОГО ОКИСЛЕНИЯ  
ФОСФОЛИПИДОВ В МЕХАНИЗМЕ РАЗБОРКИ МЕМБРАН  
ЭНДОПЛАЗМАТИЧЕСКОГО РЕТИКУЛУМА IN VIVO**

(Представлено академиком Г. М. Франком 25 III 1974)

Микросомальная система оксидаз со смешанной функцией представляет собой цепочку НАДФ-Н-зависимых переносчиков электронов (ЭТЦ). Катализируя включение кислорода в различные органические соединения, в отсутствие экзогенных субстратов окисления она способна осуществлять свободнорадикальное окисление собственных мембранных фосфолипидов (<sup>1</sup>). Таким образом, транспорт электронов по цепи НАДФ-Н-зависимых переносчиков должен сопровождаться либо окислительным метаболизмом ксенобиотиков, либо перекисным окислением фосфолипидов, причем в опытах *in vitro* показано, что эти два процесса конкурируют друг с другом (<sup>2-4</sup>).

Хорошо известно, что ксенобиотики способны увеличивать содержание эндоплазматического ретикулума (э.р.) и активность оксидаз со смешанной функцией в клетках печени животных (<sup>5</sup>). Вполне очевидно, что вслед за фазой индукции, после окислительной «переработки» ксенобиотика-индуктора в эндоплазматическом ретикулуме должна происходить разборка «лишних» ЭТЦ, являющихся мощными потребителями восстановительных эквивалентов и кислорода (<sup>1-3</sup>). В связи со сказанным нам представляется разумным предположение, что таким механизмом autoreгуляции уровня развитости сети э.р. *in vivo* может служить ферментативное НАДФ-Н-зависимое перекисное окисление мембранных фосфолипидов, деструктивное действие которого на биологические мембраны убедительно доказано *in vitro* (<sup>1, 6</sup>).

Для экспериментальной проверки этой гипотезы были поставлены опыты по индукции системы многоцелевых оксидаз в печени крыс 20-метилхолантrenom (20-MX) (однократное введение внутривенно в дозе 40 мг на 1 кг веса). Наряду с определением содержания в микросомальной фракции, выделявшейся по методу (<sup>7</sup>), цитохромов P-450 и b<sub>5</sub> (<sup>8</sup>), а также регистрацией монооксигеназной (по гидроксилазной активности с 20-MX) и диоксигеназной (по активности НАДФ-Н-зависимого перекисного окисления липидов *in vitro*) активностей, количественно анализировали содержание эндогенно образовавшихся липоперекисей (методами полярографии (<sup>9</sup>), амперометрического титрования (<sup>10</sup>) и по характерному у.-ф. спектру поглощения автоокисленных липидов (<sup>11</sup>)) и концентрацию 20-MX *in vivo* (методом низкотемпературной флуоресценции (<sup>12</sup>)).

Из данных, представленных на рис. 1, видно, что увеличение содержания микросомального белка (1) в клетках печени и индукция микросомальных цитохромов P-450 (2) и b<sub>5</sub> (3) в течение 5 суток после введения канцерогена сопровождается значительным увеличением гидроксилазной активности (с 20-MX) (табл. 1) и скорости НАДФ-Н-зависимого перекисного окисления липидов *in vitro* (табл. 1). Одновременно снижается содержание эндогенных перекисей липидов, и через 3 суток после введения 20-MX количество их минимально и составляет 3,8 нмоля

Измеряемые параметры	Время, час							
	0	12	60	110	136	156	204	276
Содержание 20-МХ в микросомах (мкг на 1 мг белка)	0	0,063	0,015	0,031	0,031	0,033	—	0,042
Гидроксилазная активность с 20-МХ (нмол·мг <sup>-1</sup> ·мин <sup>-1</sup> )*	6,7	9,8	13,4	11,6	6,7	7,1	3,5	6,3
Скорость НАДФ-Н-зависимого перекисления липидов (нмол·мг <sup>-1</sup> ·мин <sup>-1</sup> )**	10,0	14,2	32,0	15,1	5,3	—	3,6	2,2

\* 1 мл среды инкубации содержал 10 мг микросомального белка, 50 нмол. НАДФ-Н, 186 нмол. 20-МХ, 50 нмол. трис-НСI-буфера pH 7,3, 37°.

\*\* 1 мл среды инкубации содержал 10 мг микросомального белка, 50 нмол. НАДФ-Н, 1 нмоль FeSO<sub>4</sub>, 50 нмол. трис-НСI-буфера pH 7,3, 37°.

на 1 мг липидов (рис. 2). К этому моменту резко снижается содержание 20-МХ в микросомах (от 0,063 мкг на 1 мг белка микросом до 0,015 мкг/мг). Уменьшение количества мембран э.р. в печени крыс (рис. 1, 1), а также переносчиков электронов в мембранах (рис. 1, 2, 3) и соответствующее этому снижение оксигеназной активности *in vitro* в последующие 6 суток (табл. 1) сопровождается неуклонным ростом количества эндогенно образовавшихся липоперекисей в мембранах э.р. (к 9-м суткам их содержание достигает 20,0 нмоля на 1 мг липидов) (рис. 2), после чего содержание гидроперекисей достигает уровня контроля. В аналогичной серии опытов по индукции микросомальной системы многоцелевых оксидаз фенобарбиталом 6-кратному увеличению содержания цитохрома Р-450 соответствовало снижение концентрации липоперекисей в 2 раза по сравнению с контролем (от 10,7 нмоля на 1 мг липидов до 5,0 нмоля на 1 мг липидов), а катаболизм индуцированных ферментов сопровождается более чем 5-кратным накоплением образовавшихся *in vivo* перекисей липидов (до 28,3 нмоля на 1 мг липидов). Более подробно эти данные будут опубликованы позднее.

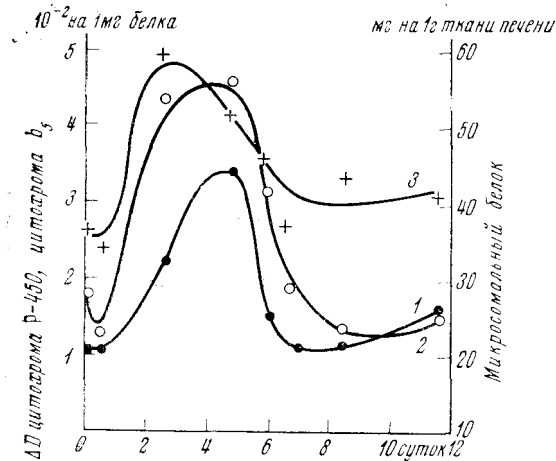


Рис. 1. Влияние 20-МХ на содержание микросомальной фракции в печени (1), цитохрома Р-450 (2) и цитохрома b<sub>5</sub> (3) в э.р.

Таким образом, окислительный метаболизм введенного гидрофобного субстрата в мембранах э.р. печени, монополизируя ЭТЦ, конкурентно ингибирует процесс эндогенного НАДФ-Н-зависимого перекисного окисления липидов, вследствие чего замедляется непрерывно идущая деструкция мембран липоперекислением и наблюдается увеличение содержания мембран э.р. и ЭТЦ в них (эффект индукции). По мере того как концентрация ксенобиотика снижается в результате его метаболизма, «высвобождающиеся» ЭТЦ начинают катализировать свободнорадикальное окисление фосфолипидов в мембранах, обуславливая их деградацию (разборка индуцированных мембран).

Увеличение количества микросомальных ферментов, а также содержания самих мембран э.р. в клетках печени может быть обусловлено как их синтезом *de novo*, так и замедлением их распада, причем роль этих процессов в суммарном эффекте индукции еще окончательно не выяснена (<sup>13</sup>). Полученные экспериментальные данные свидетельствуют о существенности вклада, во всяком случае при индукции полициклическими углеводородами, катаболического механизма, так как монополизация 20-МХ ЭТЦ обладает резким ингибирующим действием на деструктивное перекисное окисление мембранных липидов.

Протекающие в полиеновых фосфолипидах реакции свободно-радикального окисления являются эффективным средством естественной химической модификации мембран в клетке. Гидроперекиси природных жирных кислот — существенно более полярные соединения, чем исходные кислоты, и отношение их концентраций после распределения между фазами гептан — вода 1 : 100. Следовательно, «переокисленные» жирные ацилы фосфолипидов в гидрофобной зоне мембраны должны переориентироваться, «вывернувшись» в сторону водной фазы. При этом «разрыхляется» гидрофобная область липидного бислоя и в нем образуются дефекты, аналогичные тем, которые наблюдаются при действии фосфолипаз типа А<sub>1</sub> или А<sub>2</sub>, вследствие чего белковые компоненты мембраны становятся легкодоступными для протеолитических ферментов. Существенно, что эндогенные фосфолипазы способны с высокой скоростью гидролизовать гидроперексиглицерофосфатиды в мембране, в результате чего гидроперекиси жирных кислот оказываются в водной фазе, где их появление обнаруживается по характерному у-ф. спектру поглощения (<sup>14</sup>). Количественное сопоставление процессов накопления эндогенно образующихся липоперекисей в мембранах э.р. и разрушения цитохромов (рис. 1, 2) показывает, что деструкция одной молекулы цитохрома Р-450 требует появления ROOH-группировок в 15—20 жирных ацилах мембранных фосфолипидов, а для разрушения цитохрома b<sub>5</sub> — переокисления 45—50 молекул мембранных фосфолипидов. Несмотря на ориентировочный характер этих подсчетов (без учета распада гидроперекисей липидов), приведенные цифры хорошо согласуются с данными, полученными при НАДФ-Н-зависимом липопереокислении *in vitro* (<sup>15</sup>) и указывают на меньшую стабильность цитохрома Р-450 в сравнении с цитохромом b<sub>5</sub> к эндогенному липопереокислению, что, по-видимому, объясняется большей чувствительностью этого гидрофобного фосфолипидопротеидного комплекса и (или) близостью его локализации к центрам иницирования реакций свободно-радикального окисления липидов в мембране. Вместе с тем, процесс разборки мембран э.р. весьма чувствителен к эндогенному перекисному окислению липидов: уменьшение содержания в 1 г печени микросомальной фракции на 1 мг белка сопровождается появлением в 1 мг фосфолипидов микросом 10 нмол. гидроперекисей, т. е. для деградации 1 молекулы белка с молекулярным весом 50 000—60 000 требуется появление лишь 3—5 молекул гидроперексиглицерофосфатидов в мембране. Ясно, что перекисное окисление липидов может служить средством изменения доступности компонентов мембраны для гидролитических ферментов. В связи с этим интересны

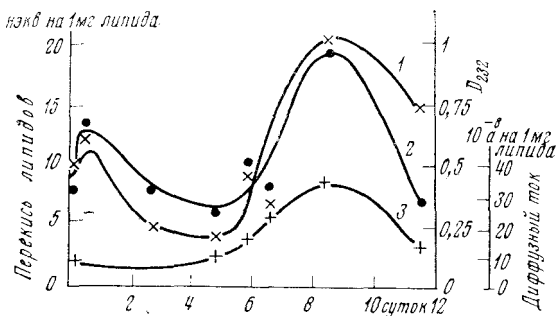


Рис. 2. Эндогенное перекисное окисление фосфолипидов э.р. после введения 20-МХ. 1 — амперометрическое титрование, 2 — у-ф. спектроскопия, 3 — полярография

бислоя и в нем образуются дефекты, аналогичные тем, которые наблюдаются при действии фосфолипаз типа А<sub>1</sub> или А<sub>2</sub>, вследствие чего белковые компоненты мембраны становятся легкодоступными для протеолитических ферментов. Существенно, что эндогенные фосфолипазы способны с высокой скоростью гидролизовать гидроперексиглицерофосфатиды в мембране, в результате чего гидроперекиси жирных кислот оказываются в водной фазе, где их появление обнаруживается по характерному у-ф. спектру поглощения (<sup>14</sup>). Количественное сопоставление процессов накопления эндогенно образующихся липоперекисей в мембранах э.р. и разрушения цитохромов (рис. 1, 2) показывает, что деструкция одной молекулы цитохрома Р-450 требует появления ROOH-группировок в 15—20 жирных ацилах мембранных фосфолипидов, а для разрушения цитохрома b<sub>5</sub> — переокисления 45—50 молекул мембранных фосфолипидов. Несмотря на ориентировочный характер этих подсчетов (без учета распада гидроперекисей липидов), приведенные цифры хорошо согласуются с данными, полученными при НАДФ-Н-зависимом липопереокислении *in vitro* (<sup>15</sup>) и указывают на меньшую стабильность цитохрома Р-450 в сравнении с цитохромом b<sub>5</sub> к эндогенному липопереокислению, что, по-видимому, объясняется большей чувствительностью этого гидрофобного фосфолипидопротеидного комплекса и (или) близостью его локализации к центрам иницирования реакций свободно-радикального окисления липидов в мембране. Вместе с тем, процесс разборки мембран э.р. весьма чувствителен к эндогенному перекисному окислению липидов: уменьшение содержания в 1 г печени микросомальной фракции на 1 мг белка сопровождается появлением в 1 мг фосфолипидов микросом 10 нмол. гидроперекисей, т. е. для деградации 1 молекулы белка с молекулярным весом 50 000—60 000 требуется появление лишь 3—5 молекул гидроперексиглицерофосфатидов в мембране. Ясно, что перекисное окисление липидов может служить средством изменения доступности компонентов мембраны для гидролитических ферментов. В связи с этим интересны

результаты по ферментативной индукции в присутствии микросом свободнорадикального окисления фосфолипидов в мембранных структурах, лишенных НАДФ-Н-зависимых ЭТЦ, и в том числе в лизосомах (<sup>16</sup>, <sup>17</sup>).

Авторы благодарят А. И. Арчакова и В. М. Девиченского за полезное обсуждение работы.

Московский государственный университет  
им. М. В. Ломоносова

Поступило  
12 III 1974

#### ЦИТИРОВАННАЯ ЛИТЕРАТУРА

- <sup>1</sup> В. Е. Каган, С. В. Котелевцев и др., *Вопр. мед. хим.*, т. 19, в. 3, 227 (1973).  
<sup>2</sup> Г. М. Маслова, Л. М. Райzman, В. П. Скулачев, *Усп. совр. биол.*, т. 67, в. 3, 400 (1969).  
<sup>3</sup> А. И. Арчаков, В кн. *Усп. биол. хим.*, т. 12, 136 (1971).  
<sup>4</sup> S. Orrenius, G. Dallner, L. Ernster, *Biophys. Biochem. Res. Commun.*, v. 44, 329 (1969).  
<sup>5</sup> J. V. Schenkman, D. L. Cinti, P. Moldeus, *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, v. 212, 420 (1973).  
<sup>6</sup> A. U. Arstila, M. A. Smith, B. F. Trump, *Science*, v. 175, 4021, 530 (1972).  
<sup>7</sup> А. И. Арчаков, В. М. Девиченский и др., *Биохимия*, т. 34, в. 3, 479 (1968).  
<sup>8</sup> T. Omura, R. Sato, *J. Biol. Chem.*, v. 239, 7, 2370 (1964).  
<sup>9</sup> В. С. Данилов, В. Е. Каган и др., *Изв. АН СССР, сер. биол.*, № 4, 574 (1972).  
<sup>10</sup> Е. А. Нейфах, В. Е. Каган, *Биохимия*, т. 34, № 3, 511, (1969).  
<sup>11</sup> J. L. Bolland, H. P. Koch, *J. Chem. Soc.*, 1945, 445.  
<sup>12</sup> Б. Н. Тарусов, Н. Г. Кожанов, М. В. Петрусевич, *Биофизика*, т. 17, в. 2, 320 (1972).  
<sup>13</sup> J. L. Holtzman, S. R. Gillette, *J. Biol. Chem.*, v. 243, № 11, 3020 (1969).  
<sup>14</sup> В. Е. Каган, В. Б. Рогов и др., В кн. *Физико-химические основы функционирования надмолекулярных структур клетки*, М., 1974.  
<sup>15</sup> J. Högberg, D. Bergström, S. V. Jakobsson, *Europ. J. Biochem.*, v. 37, 1, 51 (1973).  
<sup>16</sup> В. Е. Каган, В. Б. Рогов и др., В кн. *Биофизика мембран*, Паланга, 1973, стр. 375.  
<sup>17</sup> Kuo-Lan Chen, P. V. McCay, *Biophys. Biochem. Res. Commun.*, v. 48, № 6, 1412 (1972).