

УДК 576.36

БИОХИМИЯ

И. Б. ЦЫРЛОВ, Н. Е. ЗАХАРОВА, В. В. ЛЯХОВИЧ

РОЛЬ ПЕРВИЧНОГО МЕТАБОЛИЗМА ИНДУКТОРА В МЕХАНИЗМЕ ДЕЙСТВИЯ 3-МЕТИЛХОЛАНТРЕНА И ФЕНОБАРБИТАЛА

(Представлено академиком В. Д. Тимаковым 18 II 1975)

В последние годы получены данные, описывающие феномен увеличения активности в печени систем метаболизма ксенобиотиков после введения их животным и подчеркивающие различия в специфичности индуцирующего эффекта между 3-метилхолантrenom (МХ) и фенобарбиталом патрия (ФБ) (^{1, 2}). Эти различия, а также наблюдающееся аддитивное влияние совместного введения двух индукторов на активность и содержание компонент микросомной гидроксилирующей системы (^{3, 4}) предполагают различные механизмы индуцирующего действия для МХ и ФБ. Между тем исследование конкретного механизма действия каждого из веществ затруднено, поскольку приходится применительно к многокомпонентной мембранно-связанной ферментной системе рассматривать взаимоотношения между интенсификацией биосинтетических процессов *de novo*, активацией уже существующих компонент микросомных монооксигеназ и уменьшением скорости их распада (^{1, 4}). В любом случае, однако, считается доказанным активирование обоими индукторами генома и последующего синтеза структурного и (или) специфического белка (^{1, 5}). Так как и ФБ и МХ являются субстратами I типа для микросомного цитохрома Р-450 (⁶), логично предположить, что в механизме действия каждого из индукторов различная роль отводится связыванию и первичному метаболизму их в микросомах.

Для проверки этого предположения мы воспользовались моделью последовательной индукции, когда одно вещество вводилось животным на фоне уже выраженной индукции вторым веществом. При этом исходили из данных (²), что индуцированный МХ цитохром Р-448 лишен точек связывания для производных барбитуровой кислоты; с другой стороны, ФБ увеличивает содержание в Р-450 точек связывания для МХ и скорость его метаболизма (⁴).

В работе использовались крысы-самцы линии Wistar весом 180–200 г. Различным группам животных (табл. 1) внутрибрюшинно вводили МХ (50 мг на 1 кг веса тела) или ФБ (100 мг на 1 кг веса тела) двукратно в течение 2 суток. Получение микросомной фракции, определение активности НАДФ-Н-зависимых редуктаз, содержания цитохромов Р-450 и Р-448 описаны нами ранее (^{7, 8}). Спектральную константу максимального связывания ($\Delta A_{\max}$) для субстратов I и II типа определяли как в (⁶). Использовали метод (⁹) для определения содержания высоко- и низкоспиновой форм СО-связывающего гемопротеида; в дифференциальных спектрах *n*-октиламина принимали коэффициенты экстинкции соответственно равными $65 \text{ мМ}^{-1} \cdot \text{см}^{-1}$ и $25 \text{ мМ}^{-1} \cdot \text{см}^{-1}$. Активность N-деметилирования амилопирина и *n*-гидроксилирования анилина в микросомах определяли как в (^{10, 11}).

Из данных табл. 1 видно, что двукратное введение ФБ приводит к росту содержания Р-450, пропорциональному увеличению его высоко- и низкоспиновых форм, активации редуктазных реакций, увеличению $\Delta A_{\max}$ и метаболизма субстратов I и II типов. В течение двух суток после отмены

Таблица 1

Спектральные и кинетические параметры активности микросомных монооксигеназ печени при отдельной и последовательной индукциях фенотербиталом и 3-метилхолантронем *

Группы животных	Содержание цитохрома (P-450 или P-448), нмол. на 1 мг белка	Положение СО-пика, нм	Спиральные формы гемоглобина, нмол. на 1 мг белка			ПАДФ-Н-зависимые редуктазы, нмол. цитохрома в 1 мин. на 1 мг белка		Спектральная константа максимального связывания субстрата, $\Delta A_{321(430)-550} \cdot 10^3$ на 1 мг белка		Скорость метаболизма	
			высоко-спинная (a)	низко-спинная (b)	a/b	цитохром c	цитохром P-450 (P-448)	аминопирин	анилин	аминопирин, нмол. HCOH в 1 мин. на 1 мг белка	анилин, нмол. n-аминофенола в 1 мин. на 1 мг белка
Контрольная группа (привита за 100%)	0,62±0,05	450	0,190±0,012	0,430±0,024	0,442	76±5	2,0±0,25	7,3±0,63	19,7±1,6	2,64±0,21	0,56±0,06
ФБ, 2 суток (24) **	1,45±0,18 (235)	450	0,352±0,029 (185)	0,822±0,07 (191)	0,428	155±12 (201)	5,8±0,6 (290)	19,0±1,7 (260)	39,5±4,5 (200)	7,0±0,9 (265)	1,4±0,11 (250)
ФБ, 2 суток (72) **	1,0±0,11 (161)	450	0,266±0,017 (140)	0,619±0,053 (144)	0,430	105±5 (138)	4,0±0,37 (209)	15,7±1,3 (215)	30,0±4,0 (152)	5,8±0,63 (219)	0,98±0,1 (175)
ФБ, 2 суток; затем МХ, 2 суток (24) **	2,48±0,23 (400)	448	0,780±0,05 (410)	1,08±0,08 (250)	0,72	84±6 (110)	3,85±0,31 (192,5)	Не опр.	142±10,0 (720)	2,5±0,2 (95)	1,23±0,09 (220)
МХ, 2 суток (24) **	1,15±0,12 (185)	448	0,437±0,035 (230)	0,625±0,05 (145)	0,70	68±4 (90)	2,1±0,22 (105)	» »	98,7±8,0 (560)	1,31±0,1 (50)	0,76±0,06 (135)
МХ, 2 суток (72) **	1,12±0,11 (180)	448	0,440±0,042 (232)	0,647±0,07 (152)	0,68	74±5 (97)	2,1±0,2 (105)	» »	84,7±6,9 (430)	2,0±0,18 (75)	0,81±0,09 (145)
МХ, 2 суток; затем ФБ, 2 суток (24) **	2,18±0,19 (350)	448	0,428±0,04 (225)	0,972±0,072 (226)	0,44	70±3 (92)	4,1±0,32 (205)	» »	112,3±11,1 (570)	4,8±0,3 (182)	1,28±0,1 (225)

* Все данные представляют собой средние из 3—4 микросомных препаратов, содержащих микросомы из печени 5—7 крыс. В скобках — процент к контролю.
 ** Часы от момента последнего введения индуктора до забоя.

индуктора наблюдается снижение всех показателей. Двукратная индукция МХ приводит к появлению цитохрома Р-448, преимущественному росту высокоспиновой формы гемопротейда и изменению, вследствие этого, отношения форм а и b, отсутствию связывания аминопирина и 50% ингибированию его метаболизма, а также увеличению $\Delta A_{\max}$ и *n*-гидроксилирования анилина. Отмена МХ не приводит в течение последующих двух суток к значительным изменениям спектральных и кинетических параметров монооксигеназ, индуцированных данным веществом.

Введение ФБ на фоне максимальной индукции МХ сопровождается, несмотря на отмену углеводорода, дальнейшим увеличением СО-связывающего гемопротейда в виде Р-448; вместе с тем, происходит значительный прирост низкоспиновой (тип b) формы гемопротейда без увеличения его высокоспиновой (тип а) формы. Наблюдается выраженное (до 182%) увеличение скорости N-деметилирования аминопирина, а также НАДФ-Н-зависимого восстановления СО-связывающего гемопротейда (табл. 1). Настоящие данные свидетельствуют о том, что критерием функциональной специфичности гемопротейда является не положение СО-пика его восстановленной формы, а соотношение высоко- и низкоспиновых форм цитохрома.

Таким образом, показана принципиальная возможность индукции ФБ в условиях, исключающих этап связывания индуктора с гемопротейдом (¹²), поскольку Р-448 лишен точек связывания для ФБ (²). Предполагается в этой связи, что в механизме фенобарбиталовой индукции активация биосинтетических процессов осуществляется самим субстратом, а не продуктами его первичного метаболизма в микросомах.

Напротив, введение МХ на фоне индукции ФБ приводит к синергизму действия обоих индукторов в отношении содержания микросомного гемопротейда, а также его высокоспиновой формы; отсюда соотношение типов а/б в данной смешанной системе достигает величины, свойственной индукции одним МХ (табл. 1). Эффект синергизма в данных препаратах микросом характерен также для $\Delta A_{\max}$ анилина, а также для ингибирующего влияния МХ на метаболизм аминопирина. Таким образом, в условиях, способствующих большому связыванию и метаболизму МХ, последний обладает большим индуцирующим эффектом на микросомы. Это свидетельствует о том, что собственно индуцирующим агентом являются продукты первичного метаболизма МХ в микросомах. Таковыми, очевидно, являются либо эпоксипроизводные МХ, либо соответствующие дигидродиолы, образующиеся при гидролитическом раскрытии циклического оксида, происходящего в микросомах и катализируемого ферментом эпоксид-гидразой (¹³). Менее вероятными индукторами являются образующиеся при спонтанной изомеризации эпоксидов фенолы, поскольку известно, что метаболизм полициклических углеводородов цитохромом Р-450 характеризуется отношением продуктов, фенолов и гидродиолов, равным 3 : 1. Данное отношение становится равным 1 : 1 для цитохрома Р-448 (¹⁴), что, вероятно, обусловлено увеличением активности эпоксид-гидразы.

Важно подчеркнуть определенное сходство начальных этапов механизма индуцирующего действия канцерогенных полициклических углеводородов и механизма их биологического эффекта, поскольку для проявления последнего также необходима метаболическая активация химически инертной исходной молекулы углеводорода в микросомной фракции клеток различных органов (¹⁵).

ЦИТИРОВАННАЯ ЛИТЕРАТУРА

- ¹ A. H. Conney, Pharmacol. Rev., v. 19, 317 (1967).
- ² G. J. Mannering, Metabolism, v. 20, 228 (1971).
- ³ N. E. Sladek, G. J. Mannering, Mol. Pharmacol., v. 5, 174 (1969).
- ⁴ J. E. Gielen, D. W. Nebert, J. Biol. Chem., v. 246, 5189 (1971).
- ⁵ R. G. Wilson, J. A. Wortham, H. V. Gelboin, Adv. Enzyme Regul., v. 5, 385 (1967).
- ⁶ J. B. Schenkman, H. Remmer, R. W. Estabrook, Mol. Pharmacol., v. 3, 113 (1967).
- ⁷ I. B. Tsyrllov, V. M. Mishin, V. V. Lyakhovich, Life Sci., v. 11, 1045 (1972).
- ⁸ V. M. Mishin, I. B. Tsyrllov et al., Hoppe-Seyler's Zs. physiol. Chem., B. 355, 626 (1974).
- ⁹ C. R. E. Jefcoate, R. L. Calabrese, J. L. Gaylor, Mol. Pharmacol., v. 6, 391 (1970).
- ¹⁰ T. Nash, Biochem. J., v. 55, 416 (1953).
- ¹¹ Y. Imai, A. Ito, R. Sato, J. Biochem. (Tokyo), v. 60, 417 (1966).
- ¹² H. Remmer, Europ. J. Clin. Pharmacol., v. 5, 116 (1972).
- ¹³ F. Oesch, N. Kaubisch et al., Biochemistry, v. 10, 4858 (1971).
- ¹⁴ J. W. Daly, D. M. Jerina, B. Witkop, Experientia, v. 28, 1129 (1972).
- ¹⁵ J. A. Miller, Cancer Res., v. 30, 559 (1970).