

В. З. ЛАНКИН, С. М. ГУРЕВИЧ

**ИНГИБИРОВАНИЕ ПЕРЕОКИСЛЕНИЯ ЛИПИДОВ И
ДЕТОКСИКАЦИЯ ЛИПОПЕРЕКИСЕЙ ЗАЩИТНЫМИ
ФЕРМЕНТАТИВНЫМИ СИСТЕМАМИ
(СУПЕРОКСИД-ДИСМУТАЗА, ГЛУТАТИОН-ПЕРОКСИДАЗА
И ГЛУТАТИОН-РЕДУКТАЗА) ПРИ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОМ
ЗЛОКАЧЕСТВЕННОМ РОСТЕ**

(Представлено академиком Н. М. Эмануэлем 11 VIII 1975)

В регуляции обмена липоперекисей важную роль играет сопряженное действие глутатион-редуктазы (КФ 1.6.4.1) и глутатион-пероксидазы (КФ 1.11.1.9), приводящее к инаktivации перекисей различных полиеновых жирных кислот в соответствующие оксикислоты (1). Супероксид-дисмутаза катализирует реакцию $O_2^{\cdot -} + O_2^{\cdot -} + 2H^+ \rightarrow H_2O_2 + O_2$ (2), ингибируя тем самым переокисление липидов на стадии активации кислорода (3). Таким образом, ферментативные защитные системы, несомненно, оказывают существенное влияние на протекание реакций свободнорадикального окисления полиненасыщенных липидов в клетке.

Ранее нами было установлено значительное изменение активности ферментативной НАДФ-Н-зависимой системы перекисного окисления липидов в печени животных-опухоленосителей в процессе развития опухоли (4, 5). На основании полученных результатов высказано предположение о том, что активность ферментативных систем, детоксицирующих липоперекиси и ингибирующих переокисление липидов, в процессе злокачественного роста изменяется в весьма широких пределах (4). Исключительная резистентность опухоли к генерированию липоперекисей в модельных системах (4, 6) также может быть объяснена высокой активностью защитных ферментативных систем в опухолевой ткани (4). Исходя из вышеизложенного, представлялось интересным исследовать в динамике изменение активности глутатион-редуктазы, глутатион-пероксидазы и супероксид-дисмутазы в клетках асцитного рака Эрлиха и в печени мышей-опухоленосителей.

Опыты проводили на беспородных белых мышах (самцы, 20 ± 2 г), которым внутривенно трансплантировали по 8–10 млн клеток асцитной карциномы Эрлиха на 7-е сутки ее развития. По мере роста опухоли ежедневно в одно и то же время забивали декапитацией по 10 опытных животных. Для освобождения от эритроцитов, имеющих высокий уровень исследуемых ферментов (1, 2), печень тщательно перфузировали охлажденным 0,15 М КСl, а опухолевые клетки отмывали от примеси эритроцитов по описанному ранее методу (4) и немедленно готовили гомогенаты для определения активности глутатион-редуктазы и глутатион-пероксидазы (1:9; 0,05 М фосфатный буфер с 10^{-3} М ЭДТА, pH 7,4) и супероксид-дисмутазы (1:2; 0,05 М фосфатный буфер с 10^{-4} М ЭДТА, pH 7,8). Гомогенаты центрифугировали при 750 g в течение 10 мин. и надосадочную жидкость обрабатывали тритоном X-100 (конечная концентрация 0,1%) для выявления общей ферментативной активности. Все операции проводили при 4°. Активность глутатион-пероксидазы определяли по модифицированному нами методу (7). Инкубационная смесь (2 мл) содержала 0,05 М фосфатный буфер pH 7,4; 10^{-3} М ЭДТА; $0,12 \cdot 10^{-3}$ М НАДФ-Н; $0,85 \cdot 10^{-3}$ М

восстановленного глутатиона; 1 ед. глутатион-редуктазы из дрожжей («Sigma»); $0,2 \cdot 10^{-3}$ М гидроперекиси трет.-бутила (любезно предоставленной Ю. Д. Нориковым) и гомогенат исследуемой ткани. Применение гидроперекиси трет.-бутила оказалось более удобным, нежели H_2O_2 (⁷), ввиду ее большей стабильности, высокой скорости окисления НАДФ-Н (^{8, 9}), снижения скорости неферментативного окисления глутатиона и отсутствия необходимости в ингибировании каталазы (⁷). Активность глутатион-редуктазы определяли по методу (¹⁰). Инкубационная смесь содержала 0,05 М фосфатный буфер pH 7,4; 10^{-3} М ЭДТА; $0,16 \cdot 10^{-3}$ М НАДФ-Н, 10^{-3} М окисленный глутатион и гомогенат исследуемой ткани. Активность супероксид-дисмутазы определяли по методу (¹¹). Инкубационная смесь содержала 0,05 М карбонат натрия pH 10,2; 10^{-4} М ЭДТА; 10^{-4} М ксантин; 10^{-7} М ксантиноксидазу из молока (любезно предоставленную Л. Г. Наглер); $2,5 \cdot 10^{-5}$ М тетрапиротетразолий синий и гомогенат исследуемой ткани. Скорость окисления НАДФ-Н (ΔD_{340}) определяли при 30°, скорость восстановления тетразолия (ΔD_{560}) определяли при 25° в термостатируемой кювете спектрофотометра СФ-4а. При расчете начальной скорости окисления НАДФ-Н вводили поправку на неферментативное окисление глутатиона, при расчете начальной скорости восстановления тетразолия вводили поправку на его восстановление в присутствии гомогената. За единицу активности глутатион-пероксидазы и глутатион-редуктазы принимали количество фермента, необходимое для окисления 1 мкмоль восстановленного глутатиона в 1 мин. или восстановления 1 мкмоль окисленного глутатиона в 1 мин. соответственно. За единицу активности супероксид-дисмутазы принимали количество фермента, необходимое для подавления восстановления тетразолия на 50% в условиях определения. Содержание белка в гомогенате измеряли по методу Лоури, содержание арахидоновой кислоты в тканях — при помощи количественного газо-хроматографического анализа (¹²). Опыт повторяли трижды при соблюдении стандартных условий. Результаты подвергали статистической обработке.

Изменение активности глутатион-редуктазы и глутатион-пероксидазы в печени мышей с растущей асцитной карциномой Эрлиха представлено на рис. 1, 7, 8. Активность этих ферментов в печени опухоленосителей изменяется экстремально: увеличивается, начиная с первых дней после трансплантации карциномы, и достигает максимального уровня на 5-е сутки роста опухоли. В этот период активность глутатион-редуктазы в печени мышей-опухоленосителей возрастает более чем в 2,5 раза по сравнению с контролем, а активность глутатион-пероксидазы — почти в 6 раз (рис. 1). На поздних стадиях развития рака Эрлиха активность и глутатион-редуктазы, и глутатион-пероксидазы снижается, но даже на терминальной стадии развития опухоли остается на уровне выше контрольного. На терминальной стадии развития карциномы (12 суток после трансплантации) активность глутатион-редуктазы в печени опухоленосителей превышает уровень этого фермента в печени интактных животных более чем в 1,5 раза, а активность глутатион-пероксидазы — почти в 2 раза (рис. 1). Активность супероксид-дисмутазы в печени мышей с асцитной карциномой Эрлиха в процессе роста опухоли достоверно не изменяется (рис. 2, 7). Отсутствие изменения активности супероксид-дисмутазы в печени опухоленосителей свидетельствует о том, что в ней не происходит ингибирования образования липоперекисей вследствие инактивации супероксидного радикала. Действительно, свободнорадикальное окисление полиеновых липидов, катализируемое ферментативной НАДФ-Н-зависимой системой значительно активируется в печени животных-опухоленосителей (^{4, 5}). Стационарная концентрация перекисей липидов в печени животных-опухоленосителей также значительно возрастает (^{13, 14}). Активация же в печени опухоленосителей ферментативной системы, ответственной за детоксикацию липоперекисей (глутатион-редуктаза, глутатион-пероксидаза),

отражает, вероятно, индуктивный синтез этих ферментов вследствие увеличения содержания субстрата — липоперекисей. Возрастание содержания перекисей липидов на фоне увеличения активности ферментативной системы их детоксикации в печени опухоленосителей указывает на несбалансированность в действии систем генерирования и инактивации липоперекисей в тканях организма-хозяина. Нарушение нормальной регуляции процессов свободнорадикального окисления полиеновых липидов и

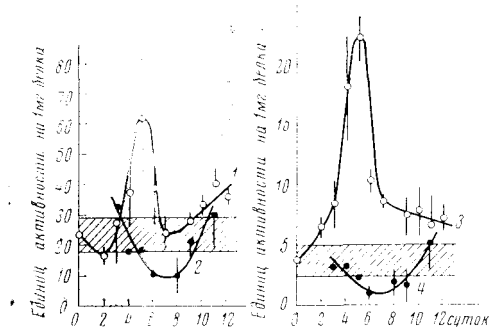


Рис. 1. Изменение активности глутатион-редуктазы (1, 2) и глутатион-пероксидазы (3, 4) в печени мышей с растущей асцитной карциномой Эрлиха (1, 3) и в опухолевых клетках (2, 4)

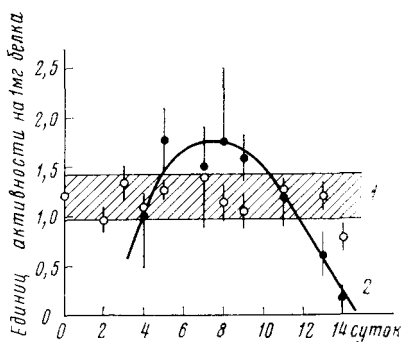


Рис. 2. Изменение активности супероксид-дисмутазы в печени мышей с растущей асцитной карциномой Эрлиха (1) и в опухолевых клетках (2)

утилизации липоперекисей при развитии опухоли, вероятно, является существенным звеном патогенеза злокачественного роста.

Активность глутатион-редуктазы и глутатион-пероксидазы в опухоли изменяется в процессе ее роста (рис. 1, 2, 4). В период интенсивного роста карциномы (6—9 сутки) активность глутатион-редуктазы и глутатион-пероксидазы минимальна, а на ранних стадиях и на терминальной стадии опухолевого роста сравнима или несколько превышает уровень этих ферментов в печени intactных мышей (рис. 1, 2, 4). Ранее высокая глутатион-редуктазная активность была также обнаружена и в ряде других опухолей человека и животных ⁽¹³⁾. Активность супероксид-дисмутазы в клетках асцитной карциномы Эрлиха, напротив, максимальна в период интенсивного роста опухоли (6—9 сутки), причем в эти сроки активность супероксид-дисмутазы в карциноме превышает ее активность в печени intactных мышей (рис. 2, 2). На терминальной стадии развития карциномы Эрлиха активность супероксид-дисмутазы в опухолевых клетках снижена (рис. 2, 2).

Таким образом, снижение активности глутатион-пероксидазы и глутатион-редуктазы в опухоли компенсируется увеличением ее супероксид-дисмутазной активности (рис. 1, 2), а общий высокий уровень этих ферментов определяет неумовимо низкое содержание липоперекисей в опухолевой ткани ⁽¹³⁾.

Приведенные результаты подтверждают высказанное ранее предположение ⁽⁴⁾ о высокой активности защитных ферментативных систем, ингибирующих перекисление липидов и детоксицирующих липоперекиси в опухоли. Этот вывод еще более очевиден при сравнении активности этих ферментов в нормальной и опухолевой ткани в расчете на 1 г сырого веса (табл. 1).

Так, активность глутатион-пероксидазы даже в тот период, когда ее уровень в опухоли минимален (рис. 1), лишь вдвое ниже активности этого фермента в нормальной печени, но активность супероксид-дисмутазы в это же время более чем в 2 раза превышает ее активность в печени intactных мышей (табл. 1). Активность глутатион-пероксидазы и супероксид-дисму-

тазы в опухоли, отнесенная к единице основного субстрата свободнорадикального окисления в тканях — арахидоната, превышает активность этих ферментов в печени интактных животных в 2,5 и 12 раз соответственно (табл. 1). Следовательно, свободнорадикальное окисление полиненасыщенных липидов в опухоли затруднено, а если липоперекиси и образуются, то

Таблица 1

Активность глутатион-пероксидазы и супероксид-дисмутазы в печени интактных мышей и клетках асцитного рака Эрлиха (единицы активности в расчете на 1 г сырой ткани — а или на 1 мкмоль арахидоната — б)

Ткань	Глутатион-пероксидаза		Супероксид-дисмутаза	
	а	б	а	б
Печень интактных мышей	44,3±7,1(10) *	3,1	11,9±0,4(10)	0,8
Опухоль (6 сутки)	21,7±2,3(10)	7,7	26,3±4,1(10)	9,6

* В скобках указано число животных.

утилизация их происходит значительно эффективнее, чем в нормальных тканях. Можно полагать, что высокая резистентность злокачественных опухолей к свободнорадикальному окислению эндогенных полиеновых липидов (⁴⁻⁶) является характерной биохимической особенностью опухолевой ткани, определяемой повышенным уровнем ферментативных защитных систем, ингибирующих перекисное окисление липидов и детоксицирующих липоперекиси.

Авторы выражают искреннюю признательность академику Н. М. Эмануэлю и Л. С. Вартаиян за ценные советы и замечания, сделанные при обсуждении настоящей работы, а также Л. Г. Наглер и А. И. Козаченко за предоставление препарата ксантиноксидазы.

Институт химической физики
Академии наук СССР
Москва

Поступило
25 VII 1975

ЛИТЕРАТУРА

- ¹ L. Flohe, Klin. Wschr., v. 49, 669 (1971). ² I. Fridovich, Accounts Chem. Res., v. 5, 321 (1972). ³ T. C. Pederson, S. D. Aust, Biophys. Biochem. Res. Commun., v. 48, 789 (1972). ⁴ В. З. Ланкин, С. М. Гуревич, В. кн.: Липиды в организме животных и человека, М., «Наука», 1974, стр. 72. ⁵ С. М. Гуревич, В. М. Поляков, В. З. Ланкин, В кн.: Физико-химич. основы функционирования надмолекулярных структур клетки, М., Изд-во МГУ, ч. 1, 1974, стр. 66. ⁶ C. W. Schuster, Proc. Soc. Exp. Biol. and Med., v. 90, 423 (1955). ⁷ D. E. Paglia, W. N. Valentine, J. Lab. Clin. Med., v. 70, 158 (1967). ⁸ W. A. Günzler, H. Vergin et al., Hoppe-Seyler's Zs. Physiol. Chem., v. 353, 1001 (1972). ⁹ A. G. Smith, W. A. Harland, C. J. Brooks, Steroids Lipids Res., v. 4, 122 (1973). ¹⁰ S. Hosoda, W. Nakamura, Biochim. et biophys. acta, v. 222, 53 (1970). ¹¹ C. Beauchamp, I. Fridovich, Anal. Biochem., v. 44, 276 (1971). ¹² В. З. Ланкин, И. П. Садовникова, Вопр. мед. хим., т. 17, 333 (1971). ¹³ Е. А. Нейфах, В. Е. Каган, Биохимия, т. 34, 692 (1969). ¹⁴ Ю. П. Козлов, В. С. Данилов и др., Свободнорадикальное окисление липидов в биологических мембранах, М., Изд-во МГУ, 1972, стр. 67. ¹⁵ В. С. Мишнев, Т. А. Горюхина, Вопр. онколог., т. 19, 58 (1973).