

## Мембранотропный эффект бензола в микросомах печени крыс

А. Л. Суходуб

Харьковский государственный университет  
310077, Харьков, пл. Свободы, 4

*В работе изучено влияние бензола на некоторые параметры, характеризующие структурно-функциональное состояние микросомных мембран. Показано, что двукратное введение бензола крысам-самцам линии Вистар не приводит к существенным изменениям в содержании микросомных гемопротеидов, однако наблюдается достоверное длинноволновое смещение максимума поглощения дифференциального спектра цитохрома Р-450, а также инактивация глюкозо-6-фосфатной активности (Г-6-Фазы) и увеличение степени тушения флуоресценции АНС ионами  $\text{Ca}^{2+}$ . Инкубация микросомной суспензии в условиях *in vitro* приводила к повышенному накоплению малонового диальдегида (МДА) и инактивации Г-6-Фазы. Инкубация в аналогичных условиях, но в присутствии бензола также вызывала уменьшение содержания Г-6-Фазы, однако интенсивность накопления МДА была значительно меньше, чем в варианте без добавок. Добавка в среду инкубации помимо бензола НАДФН существенно ослабляла инактивирующее действие ксенобиотика на Г-6-Фазу. Высказано предположение о том, что введение ксенобиотика приводит к одновременному протеканию в мембранах микросом процессов распада определенных изоформ цитохрома Р-450 и синтеза новых, при этом происходят определенные изменения в организации фосфолипидного бислоя. Результаты опытов *in vitro* позволяют сделать вывод о том, что активация процессов метаболизма бензола существенно ослабляет его мембранотропное действие.*

**Введение.** Большинство чужеродных соединений, попадающих в организм, подвергается первичному метаболизму в мембранах эндоплазматического ретикулума с участием цитохрома Р-450 [1]. Известно [1], что бензол и его производные относятся к числу промышленных ядов, в основе токсических эффектов которых лежат первичные изменения физико-химических свойств липидного бислоя биомембран. С другой стороны, соединения бензола в зависимости от дозы могут быть как индукторами, так и ингибиторами цитохрома Р-450 [2]. Целью настоящей работы было изучение влияния бензола на цитохром Р-450 и структурно-функциональное состояние мембраны микросом в условиях *in vivo* и *in vitro*.

**Материалы и методы.** Опыты выполнены на крысах-самцах линии Вистар массой 150—180 г. Бензол вводили в дозе 40 мг/100 г массы тела в течение двух дней. Микросомы печени выделяли, как описано [3]. В опытах *in vitro* реакционная среда объемом 1,2 мл содержала 100 мМ трис-НСl, рН 7,4, 7 мг микросомного белка, 1 мМ аскорбат, а также 150 мМ бензол (варианты 1 и 2) и 1,5 мМ НАДФН (вариант 1). После инкубации при 37 °С в течение 30 мин в закрытых сосудах пробы помещали на лед, затем отбирали аликвоты для определения исследуемых параметров. Содержание

цитохромов P-450 и  $b_5$  определяли по [4], используя коэффициенты молярной экстинкции 91 и  $164 \text{ мМ}^{-1}\text{см}^{-1}$  соответственно. Положение максимума поглощения гемопротейда, спектральную полуширину и калибровку шкалы спектрофотометра устанавливали согласно [5]. Глюкозо-6-фосфатазную активность определяли по методу [6]; количество образующегося малонового диальдегида (МДА) — по реакции с тиобарбитуровой кислотой [7]. Содержание белка регистрировали по методу Лоури и соавт. в модификации Миллера [8]. Статистическую обработку результатов проводили, используя *t*-критерий Стьюдента.

Результаты и обсуждение. Из результатов табл. 1 видно, что введение ксенобиотика в условиях *in vivo* не приводило к существенным изменениям в содержании цитохромов P-450 и  $b_5$ , однако наблюдалось достоверное длинноволновое смещение максимума поглощения дифференциального спектра цитохрома P-450, при этом форма спектра, характеризуемая спектральной полушириной ( $\Delta\nu$ ) [5], достоверно не изменялась (см. табл. 1). Вполне вероятно, что наблюдаемое смещение максимума поглощения цитохрома P-450 обусловлено образованием новых изоформ гемопротейда. Известно [9], что бензол индуцирует биосинтез изоформы IIE1 цитохрома P-450, максимум поглощения СО-дифференциального спектра которой находится на 452 нм [10]. Можно предположить, что введение ксенобиотика стимулирует протекание двух противоположно направленных и взаимокомпенсирующихся процессов: с одной стороны, происходит деградация определенных изоформ цитохрома P-450, с другой — синтез новых, таких как IIE1. Общий регистрируемый пул гемопротейда при этом не изменяется (см. табл. 1).

Таблица 1  
Влияние введения бензола в условиях *in vivo* на некоторые показатели структурно-функционального состояния мембраны микросом печени крыс ( $n = 5-6$ )

Исследуемый параметр	Контроль	Опыт
Цитохром P-450:		
пмоль/мг	$432 \pm 30$	$345 \pm 40$
$\lambda_{\text{max}}$ , нм	$450,4 \pm 0,11$	$451,04 \pm 0,11^*$
$\Delta\nu$ , $\text{см}^{-1}$	$856 \pm 50$	$772 \pm 40$
Цитохром $b_5$ , пмоль/мг	$388 \pm 12$	$332 \pm 32$
Глюкозо-6-фосфатаза, нмоль · мг <sup>-1</sup> · мин <sup>-1</sup>	$92 \pm 2$	$67 \pm 8^*$
$F_0/F$	$1,056 \pm 0,01$	$1,107 \pm 0,02^*$

\*  $P < 0,05$  по сравнению с контролем.

Весьма важным параметром, характеризующим структурно-функциональное состояние биомембран, является вязкость фосфолипидного бислоя. Один из способов оценки микровязкости мембран — определение интенсивности тушения флюоресценции мембраносвязанных зондов ионами тяжелых металлов, при этом чем выше микровязкость мембраны, тем эффективность тушения выше [11]. В табл. 1 представлены результаты определения степени тушения флюоресценции АНС 20 мкМ  $\text{CuCl}_2$  ( $F_0/F$ ). Как видно, под влиянием бензола происходит достоверное увеличение параметра  $F_0/F$ , что должно означать увеличение микровязкости мембраны. В микросомах крыс, получавших бензол, также отмечается достоверное падение глюкозо-6-фосфатазной активности, что может свидетельствовать о существенных изменениях в свойствах фосфолипидного бислоя [12].

Таблица 2  
Влияние бензола на некоторые показатели структурно-функционального состояния микросомных мембран печени крыс при различных вариантах инкубации в условиях *in vitro* (n = 4—5)

Исследуемый параметр	Контроль	Вариант инкубации		
		1	2	3
Цитохром P-450, пмоль/мг	500±25	609±30	432±43	552±42
Цитохром b <sub>5</sub> , пмоль/мг	360±30	211±32 278±20***	362±24	357±36
Глюкозо-6-фосфатаза, нмоль·мг <sup>-1</sup> ·мин <sup>-1</sup>	98,3±4,6	32,5±7,6***	9,5±1,1*	69,4±6,1
МДА, нмоль/мг	0,15±0,05	1,93±0,20*	2,26±0,24*	6,70±0,31

\*P < 0,05 по сравнению с вариантом 3; \*\*P < 0,05 по сравнению с вариантом 2; \*\*\*после продувки воздуха через контрольную кювету в течение 1 мин.

Инкубация в условиях *in vitro* (табл. 2) не приводит к значительным изменениям в содержании цитохромов P-450 и b<sub>5</sub> во всех вариантах, в то время как глюкозо-6-фосфатазная активность достоверно уменьшается в вариантах 1—3 относительно контроля. Интенсивность накопления МДА была максимальной в варианте 3, в то время как добавка в среду инкубации бензола (варианты 1, 2) ингибировала процесс образования МДА. Данные результаты позволяют высказать предположение, что в основе инактивации глюкозо-6-фосфатазной активности в варианте 3 и в вариантах 1, 2 лежат различные механизмы. Так, в варианте 3 падение активности фермента, по-видимому, — это результат свободнорадикального повреждения молекулы каталитического белка, а в вариантах 1 и 2, скорее всего, — следствие прямого мембранотропного действия бензола. Важно отметить, что при инкубации микросом с бензолом и НАДФН (вариант 1) степень инактивации глюкозо-6-фосфатазы достоверно меньше, чем в варианте 2 (инкубация без НАДФН). Данный факт свидетельствует о том, что активация микросомного метаболизма бензола за счет добавления в среду НАДФН снижает его мембраноповреждающее действие. Логично предположить, что образующиеся продукты гидроксилирования бензола обладают менее выраженными мембранотропными свойствами, чем исходное вещество.

Таким образом, полученные в настоящей работе данные свидетельствуют об определенных структурно-функциональных перестройках, происходящих в мембранах микросом при введении бензола, что выражается в инактивации глюкозо-6-фосфатазы, увеличении микровязкости мембраны и в длинноволновом смещении максимума поглощения цитохрома P-450. Результаты опытов *in vitro* позволяют сделать вывод о том, что в реализации мембранотропного действия бензола существенную роль играет интенсивность его метаболизма микросомной монооксигеназной системой.

А. Л. Суходуб

Мембранотропный эффект бензолу в микросомах печінки щурів

Резюме

У роботі досліджено вплив бензолу на деякі параметри, що характеризують структурно-функціональний стан микросомних мембран. Показано, що дворазове введення бензолу щурам-самцям лінії Вістар не призводить до суттєвих змін у вмісті микросомних гемопротейдів, проте спостерігається достовірне довшохвильове зміщення максимуму поглинання диференційного

спектра цитохрому Р-450, а також зниження глюкозо-6-фосфатазної активності (Г-6-Фази) та збільшення ступеня гасіння флюоресценції АНС іонами  $Cu(II)$ . Інкубація мікросомної суспензії в умовах *in vitro* приводила до підвищеного накопичення маленового діальдегіду (МДА) та до інактивації Г-6-Фази. Інкубація в аналогічних умовах, але у присутності бензолу також викликала інактивацію Г-6-Фази, але інтенсивність накопичення МДА була значно меншою, ніж у варіанті без добавок. Додавання у середовище інкубації, окрім бензолу, НАДФН суттєво послаблювало інактивуючу дію ксенобіотика на Г-6-Фазу. Висунуто припущення стосовно того, що введення ксенобіотика призводить до одночасного протікання у мембранах мікросом процесів розпаду окремих ізоформ цитохрому Р-450 та синтезу нових, при цьому мають місце деякі зміни в організації фосфоліпідного бішару. Результати дослідів *in vitro* дозволяють зробити висновок, що активація процесів метаболізму бензолу значно послаблює його мембранотропну дію.

A. L. Sukhodub

Benzene membranotropic action in rat liver microsomes

Summary

*Benzene influence on some microsomal membranes characteristics was carried out. It has been shown, that benzene incorporation cause decrease in glucose-6-phosphatase activity and membrane fluidity. It was obtained the longwave shift in cytochrome P-450 absorption spectra maximum, without changes in the content of hemoprotein. Studies in vitro has shown, that membranotropic benzene action is largely decreased after NADPH addition in the medium.*

#### СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. Губский Ю. И., Долго-Сабуров В. В., Храпак В. Б. Химические катастрофы и экология.— Киев: Здоровье, 1993.—224 с.
2. Голиков С. Н., Саноцкий И. В., Тиунов Л. А. Общие механизмы токсического действия.— Л.: Медицина, 1986.—280 с.
3. Лемешко В. В. Система микросомального окисления при развитии и старении организма // Биохимия.—1980.—45, № 11.—С. 1964—1969.
4. Otura T., Sato R. The carbon monoxide binding pigment of liver microsomes // J. Biol. Chem.—1964.—239, N 7.—P. 2379—2385.
5. Паперно Т. Я., Поздняков В. П., Смирнова А. А., Елагин Л. М. Физико-химические методы исследования в органической и биологической химии.—М.: Просвещение, 1977.—176 с.
6. Рыбальченко В. К., Коганов М. И. Структура и функции мембран.—Киев: Вища школа, 1988.—300 с.
7. Владимиров Ю. А., Арчаков А. И. Перекисное окисление липидов в биологических мембранах.—М.: Наука, 1972.—252 с.
8. Miller G. I. Protein determination for large numbers of samples // Anal. Chem.—1959.—31, N 5.—P. 964—966.
9. Kato S., Onda M., Matsukara M. et al. Cytochrome P4502E1 (CYP2E1) genetic polymorphism in a case-control study of gastric cancer and liver disease // Pharmacogenetics.—1995.—5, Sp. Iss.—P. S141—S144.
10. Саприн А. Н. Детоксикация ксенобіотиков в организме.—М.: ВИНТИ, 1990.— Вып. 22.—С. 31—122.
11. Лакович Дж. Основы флюоресцентной спектроскопии.— М.: Мир, 1986.—496 с.
12. Губский Ю. И. Коррекция химического поражения печени.—Киев: Здоровье, 1989.— 168 с.