

Э.Э. Кузнецова, В.Г. Горохова, А.Г. Горохов, А.С. Сергеева, Т.Е. Курильская,  
Ю.И. Пивоваров, А.А. Рунович

## МИКРОСОМАЛЬНОЕ ОКИСЛЕНИЕ В ФИЗИОЛОГИЧЕСКИХ И ПАТОЛОГИЧЕСКИХ ПРОЦЕССАХ

НЦ РВХ ВСНЦ СО РАМН (Иркутск)

*Система цитохрома P-450 играет важную роль в поддержании химического гомеостаза при физиологических и патологических состояниях внутренней среды организма, принимая участие в окислительной биотрансформации поступающих в организм чужеродных химических соединений, а также эндогенных липофильных биорегуляторных молекул — эндобиотиков.*

**Ключевые слова:** цитохром P-450, микросомальные монооксигеназы, биотрансформация

## MICROSOMAL OXIDATION IN PHYSIOLOGICAL AND PATHOLOGIC PROCESSES

E.E. Kuznetsova, V.G. Gorokhova, A.G. Gorokhov, A.S. Sergeyeva,  
T.E. Kurilskaya, Yu.I. Pivovarov, A.A. Runovich

SC RRS ESSC SB RAMS, Irkutsk

*The system of cytochrome P-450 has a profound impact in supporting chemical homeostasis in physiological and pathologic conditions of organism inner medium through the participation in oxidation biotransformation of foreign chemical compounds entering the organism and endogenous lipophilic bioregulatory molecules-endobiotics.*

**Key words:** cytochrome P-450, microsomal monooxygenases, biotransformation

Основным компонентом микросомальной монооксигеназной системы (МОС) является цитохром P-450. Его название указывает на то, что он окрашен (P — от английского Pigment) и что максимум поглощения комплекса с окисью углерода лежит в области 450 нм. Окись углерода не имеет никакого отношения к функции P-450; она добавляется лишь для того, чтобы облегчить определение содержания P-450 по интенсивности спектра поглощения.

Цитохром P-450 обладает рядом уникальных свойств, определяющих функционирование всей системы. Во-первых, это способность катализировать реакции окисления самых различных по химической структуре соединений. Наряду с этим, энзимы семейства цитохрома P-450 важны в оксидазном, пероксидазном и редуционном метаболизме множества эндогенных веществ, таких как стероиды, желчные кислоты, жирные кислоты, простагландины, лейкотриены, биогенные амины и др. Пептиды, как установлено [11], также являются субстратами цитохрома P-450. Во-вторых, при попадании в организм чужеродных соединений наблюдается явление индукции МОС, заключающееся в увеличении содержания цитохрома P-450 в печеночных клетках и повышении активности ряда ферментативных реакций. В-третьих, цитохром P-450 представлен большим числом различающихся изоформ, индуцируемых теми или иными соединениями.

Цитохром P-450 представляет собой гемсодержащий белок, широко распространенный в тканях животных и растений. Ему присущи многообра-

зие форм и широта субстратной специфичности. Белок цитохрома P-450 синтезируется на рибосомах шероховатых мембран эндоплазматического ретикулула гепатоцитов. Ключевым ферментом синтеза гема цитохрома P-450 является синтаза б-аминолевуленовой кислоты. Разнообразие форм цитохрома P-450 не является результатом взаимопревращений одного и того же полипептида, а возникает вследствие синтеза ad novo различных белков [33]. Цитохром P-450 является важнейшим компонентом микросомальной монооксигеназной системы, ответственным за активацию молекулярного кислорода и связывание субстрата. Помимо цитохрома P-450 в состав этой системы входят НАДФ·Н — цитохром P-450 — редуктаза, цитохром b<sub>5</sub> и НАД·Н — цитохром b<sub>5</sub>-редуктаза. НАДФ·Н — цитохром P-450 — редуктаза служит переносчиком электронов с восстановленного НАДФ на цитохром P-450. Данный флавопротеид связан с фракцией поверхностных мембранных белков эндоплазматического ретикулула. Цитохром b<sub>5</sub> представляет собой гемопротеид, который, в отличие от цитохрома P-450, локализован на поверхности мембран эндоплазматической сети. Цитохром b<sub>5</sub> способен получать электроны не только от восстановленной формы НАДФ, но и от НАД·Н, участвуя в функционировании НАД·Н-зависимой цепи транспорта электронов.

Важную роль при функционировании микросомальных монооксигеназ играет связь ферментных систем с мембранами эндоплазматической сети. Особенно важное значение имеют фосфолипиды микросом, которые обеспечивают поддер-

жание каталитической активности монооксигеназной системы и участвуют в прикреплении ее компонентов к мембранам гладкой эндоплазматической сети [13]. Фосфолипиды влияют на конформационные изменения молекулы цитохрома P-450 и ее стабилизацию [16].

С.И. Голиковым с соавт. [8] были установлены прямые и тесные корреляционные зависимости между цитохромом P-450 и  $b_5$ . Они могут образовывать сложные гемопротеидные комплексы, в результате чего происходит стабилизация цитохрома P-450 в каталитически активном конформационном состоянии, которое обеспечивает повышение скорости катализируемых им реакций [21].

В литературе существуют описания целого ряда схем действия микросомальных монооксигеназ. Наибольшее распространение получила схема Эстабура, Гильдебранта и Барона (рис. 1), подробно рассмотренная в монографии Д.И. Метелицы [16]. По мнению этих авторов, вещество, подвергающееся биотрансформации (АН), на I стадии взаимодействует с окисленной формой цитохрома P-450 ( $Fe^{3+}$ ) с образованием фермент-субстратного комплекса ( $АНFe^{3+}$ ). На II стадии фермент-субстратный комплекс восстанавливается ( $АН \cdot Fe^{3+}$ ) электроном, поступающим из НАДФ·Н-зависимой цепи переноса от НАДФ·Н посредством НАДФ·Н-цитохром P-450-редуктазы при возможном участии цитохрома  $b_5$ .

III стадия характеризуется взаимодействием восстановленного фермент-субстратного комплекса с кислородом ( $АН \cdot Fe^{3+} \cdot O_2$ ). Присоединение кислорода осуществляется с большими скоростями. На IV стадии тройной комплекс фермент-субстрат-кислород ( $АН \cdot Fe^{3+} \cdot O_2$ ) восстанавливается вторым электроном, который, по-видимому, поступает из НАДФ·Н-специфической цепи переноса, включающей НАДФ·Н-цитохром  $b_5$ -редуктазу, НАДФ·Н и, возможно, цитохром  $b_5$ . V стадия характеризуется внутримолекулярными превращениями восстановленного тройного комплекса — фермент-субстрат-кислород ( $АН \cdot Fe^{3+} \cdot O_2^-$  /  $АН \cdot Fe^{3+} \cdot O_2^{2-}$ ) и его распадом с освобождением воды и гидроксильно-субстрата. При этом цитохром P-450 переходит в исходную форму, готовую к взаимодействию со следующей молекулой субстрата. Лимитирующей стадией этого процесса является превращение тройного комплекса после его восстановления вторым электроном. Рассмотренная схема раскрывает механизм биотрансформации химических веществ с помощью оксидаз со смешанными функциями (ОСФ). Из представленной схемы видно, что при биотрансформации химических соединений один атом кислорода используется для окисления субстрата, а второй восстанавливается до воды. Это и позволило дать ферментным системам, обеспечивающим данный процесс, название оксидаз со смешанными функциями.

Использование для окисления субстрата лишь одного атома кислорода оксидазами со смешанными функциями явилось основанием для того, что-

бы отнести их к монооксигеназным системам. Недостатком этой схемы является отсутствие учета генерации активных радикалов и в первую очередь супероксидного аниона ( $O_2^-$ ) при функционировании микросомальных монооксигеназ. Этот недостаток отсутствует в схемах Уэлша (рис. 2) и Ульриха (рис. 3).

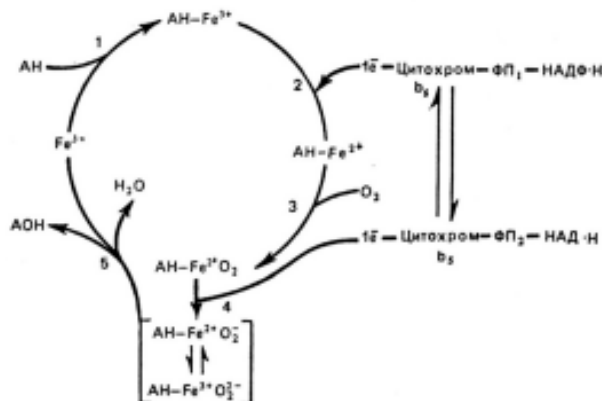


Рис. 1. Гидроксильное действие микросомальных монооксигеназ печени.

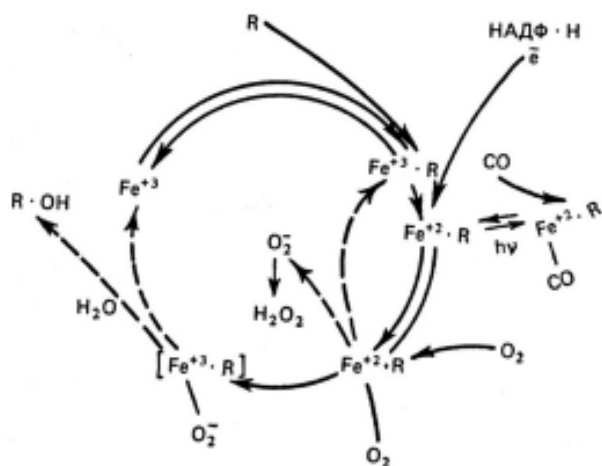


Рис. 2. Гидроксильное действие микросомальных монооксигеназ на ксенобиотики.

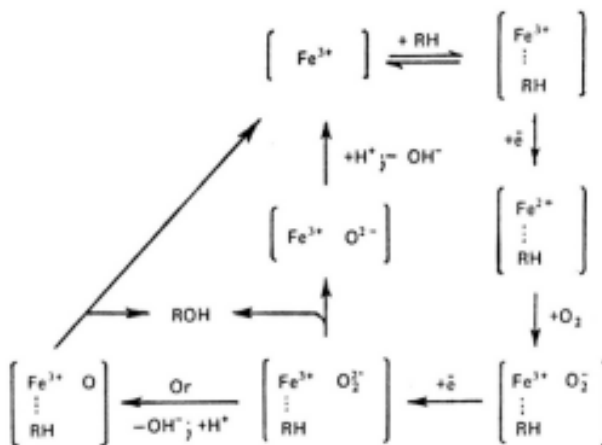


Рис. 3. Взаимодействие ксенобиотиков с цитохромом P-450 в процессе реакции гидроксильного окисления.

Установленные закономерности функционирования микросомальных монооксигеназ получены преимущественно при исследовании печеночной ткани. Печень является самым крупным органом, участвующим в биотрансформации ксенобиотиков. Масса ее составляет 2 % от массы тела человека и 4 % от массы тела животных. В ней метаболизируют примерно две трети от общего количества экзогенных химических веществ, поступающих в организм. На 1 г печени человека приходится 10 нмоль цитохрома P-450, а на 1 г печени крыс — 30 нмоль этого фермента. Серные, глутатионовые и глюкуроновые конъюгаты ксенобиотиков из печени могут выделяться с желчью в кишечник, подвергаться там дальнейшей биотрансформации, реабсорбироваться в кровь и вновь поступать в печень. Затем эти соединения выделяются с мочой или повторно поступают с желчью в кишечник и выделяются с калом. В такой процесс внутрипеченочной циркуляции вовлекаются ксенобиотики, имеющие определенную молекулярную массу. Для белых крыс, кроликов и человека она составляет, соответственно, 325, 400 и 500 Д. Однако, несмотря на важную роль печени в процессе биотрансформации химических веществ, нельзя недооценивать значение и других органов. В коже человека и животных обнаружены все компоненты микросомальных монооксигеназных систем. Цитохром P-450 содержится в эндоплазматической сети эпителиальных клеток трахеобронхиального тракта. В микросомальной фракции слизистой тонкого кишечника человека присутствуют цитохром P-450, цитохром  $b_5$ , НАДФ-Н-цитохром-P-450-редуктазы. При тотальной или частичной атрофии ворсинок слизистой тонкого кишечника активность ОСФ резко снижается. Биотрансформация ксенобиотиков в кишечнике протекает с меньшей скоростью, нежели в печени.

Необходимо иметь в виду, что в кишечнике животных и человека ксенобиотики претерпевают также метаболические превращения под воздействием ферментов микроорганизмов. К числу таких превращений относятся реакции гидролиза, восстановления и синтеза, протекающие с участием бактериальных эстераз, редуктаз, ацетилтрансфераз, деацетилаз, деметилаз и других ферментов. Между ферментами микроорганизмов и микросомальными ферментами слизистой кишечника существует сложная связь, играющая, по-видимому, важную роль в ходе процессов биотрансформации ксенобиотиков при их пероральном поступлении.

В почках активность микросомальных монооксигеназ значительно ниже, чем в печени. В микросомальной фракции головного мозга крыс также отмечено присутствие цитохрома P-450, цитохрома  $b_5$ , НАДФ-Н-цитохром-P-450-редуктазы. Особенностью ОСФ головного мозга является высокое содержание цитохрома  $b_5$  в 2–3 раза превышающее уровень цитохрома P-450.

В надпочечниках, в отличие от других органов, цитохром P-450 локализован не на эндоплазмати-

ческом ретикулуле, а в митохондриях. Главная фракция ОСФ надпочечников — обеспечение реакций гидроксирования эндогенных субстратов, в первую очередь стероидов, и участие в реакциях синтеза холестерина.

Ферментные системы окисления химических веществ, содержащие цитохром P-450, обнаружены во всех клетках животных и человека, за исключением эритроцитов.

Таким образом, в печени и в целом ряде других органов при функционировании микросомальных монооксигеназ из липидотропных ксенобиотиков образуются полярные соединения, имеющие реактивные группы. Эти метаболиты могут быть как менее, так и более токсичными, нежели исходные соединения, но они, благодаря приобретенным реактивным группам, легко вступают в реакцию конъюгации с образованием нетоксичных продуктов, легко выводимых из организма с мочой, желчью и калом. Следовательно, биотрансформация ксенобиотиков с помощью монооксидаз является лишь первой фазой детоксикации, одним из общих механизмов токсичности, обеспечивающих поддержание гомеостаза при действии химических веществ на организм. Другим общим механизмом биотрансформации, составляющим вторую фазу детоксикации, является комплекс реакций конъюгации и комплекс биохимических систем, осуществляющих защиту организма от поражающего действия супероксидного аниона ( $O_2^-$ ) и других активных форм кислорода, образующихся в качестве побочных продуктов при функционировании микросомальных монооксигеназ [8].

По данным литературы, наибольшей активностью обладает ферментная система окисления чужеродных соединений клеток печени [1, 28]. Известно, что данная ферментная система обладает способностью к выраженной индукции под действием самых разнообразных химических агентов, попадающих в организм человека и животных. Легкая индуцируемость этой системы на самом деле отражает адаптацию живых существ к повышенным количествам чужеродных соединений. При этом была обнаружена множественность ферментов, осуществляющих метаболизм ксенобиотиков [17, 32]. Оказалось, что в ответ на попадание в организм ксенобиотиков определенного типа повышается концентрация в клетках печени строго определенных форм фермента цитохрома P-450, осуществляющего реакцию окисления этого типа ксенобиотиков. В настоящее время обнаружено множество различных изоформ P-450.

Наряду с множественными формами цитохрома P-450, основного фермента, осуществляющего окисление всех чужеродных соединений, показано, что возможны и множественные механизмы окисления этих веществ, т.е., вероятнее всего, не существует единого молекулярного механизма окисления ксенобиотиков [2].

В настоящее время известно несколько десятков тысяч ксенобиотиков, которые окисляются с

участием цитохрома Р-450, и было бы удивительно, если все это огромное разнообразие химических соединений окислялось бы строго по одному и тому же механизму. Сохраняя общий характер оксигеназной реакции, конкретные молекулярные механизмы могут существенно различаться в зависимости от изоформы фермента, а также от типа субстрата, окисляющегося в той или иной оксигеназной реакции [3].

Оказалось, что реакция, которая по своей сути направлена на защиту живых систем от накопления в них неполярных гидрофобных соединений, представляет собой опасность для организма, так как химизм этой реакции таков, что предусматривает необходимость образования промежуточных активных метаболитов. Образующиеся в реакции химические реакционноспособные интермедиаты способны оказывать повреждающее действие в клетке путем модификации макромолекул, нарушения проницаемости биологических мембран, стимуляции реакций перекисного окисления. Повреждающее действие в клетке оказывают не только побочные продукты гидроксилирования, но и обязательные промежуточные интермедиаты, входящие в состав основного каталитического цикла [3].

В процессе биотрансформации химических соединений при действии микросомальных монооксигеназ образуются супероксидные анионы за счет декомпозиции оксигенированного феррокомплекса цитохрома Р-450 (рис. 4).

Супероксидный анион  $O_2^-$  является высокотоксичным и относительно стабильным радикалом, он взаимодействует с молекулами белка, липопротеинов, вызывает разрыв спиралей ДНК, окисление тиоловых групп инициирует перекисное окисление липидов, вызывает структурные нарушения биологических мембран [30]. С прямой или опосредованной, через другие активные формы кислорода, действием супероксидного аниона связывают мутагенные и канцерогенные эффекты, нарушение генеративных функций, имму-

нитета, механизмы воспалительных процессов [30]. Изолированная микросомальная фракция печени интактных животных генерирует супероксидный анион со скоростью 2–10 нмоль/(мин·мг белка). Помимо микросомальной фракции в физиологических условиях источниками супероксидных радикалов являются митохондриальные мембраны печени, продуцирующие  $O_2^-$  со скоростью до 24 нмоль/(мин·мг белка), некоторые ферменты цитозоля (ксантиноксидаза и альдегидоксидаза). Супероксидный анион образуется и при аутоокислении ряда эндогенных веществ (фенола, адреналина, глутатиона, гемоглобина) [17].

В интактном организме физиологический уровень супероксидных анионов чрезвычайно низкий (внутри митохондрий  $8 \cdot 10^{-12}$  М). В этих условиях полностью исключена возможность токсических проявлений за счет их действия. 80 % от общего количества супероксидных анионов под действием фермента супероксиддисмутазы переходит в перекись водорода, токсичность которой на порядок меньше  $O_2^-$  [30]. Оставшиеся же 20 %  $O_2^-$  мигрируют в цитозоль и включаются в целый ряд физиологических процессов (инициация свободнорадикальных цепных реакций, взаимодействие с полиненасыщенными жирными кислотами с образованием физиологических уровней липидных перекисей). Последние участвуют в процессах сокращения мышц, активного транспорта ионов, регуляции проницаемости биологических мембран, в биосинтезе простагландинов, фагоцитозе [27].

Однако при биотрансформации липотропных веществ продукция супероксидных анионов может резко возрастать и возникает угроза токсического поражения организма за счет активных форм кислорода. Последние могут вступать в реакции с биомолекулами, вызывать повреждение ДНК, активировать перекисное окисление липидов и оказывать цитостатическое, мутагенное канцерогенное и аллергическое действие [30]. Этим эффектам противостоят мощные молекулярные механизмы, обеспечивающие поддержание гомеоста-

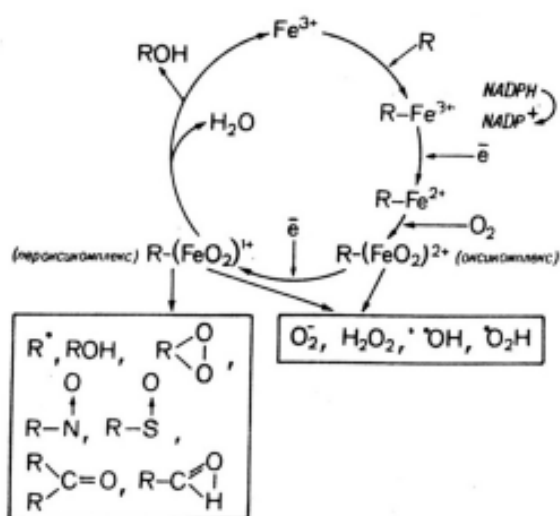


Рис. 4. Пути образования активных интермедиатов в гидроксигеназных реакциях.

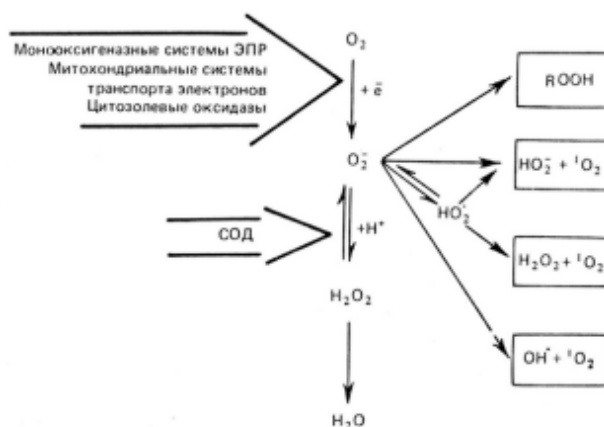
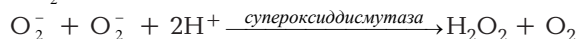


Рис. 5. Превращение активных форм кислорода.

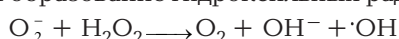


за в условиях, когда генерация супероксидных анионов существенно возрастает. Первой преградой на пути проявления токсического действия  $O_2^-$  является ферментная система — супероксиддисмутаза. Супероксиддисмутаза — ключевая ферментная система, лимитирующая скорость всего цикла превращений супероксидного радикала в другие активные формы кислорода и контролирующая тем самым скорость перекисного окисления липидов (рис. 5).

Эта система катализирует реакцию образования перекиси водорода и триплетного кислорода из  $O_2^-$ :



Супероксидный радикал может вступать во взаимодействие с перекисью водорода, что влечет за собой образование гидроксильных радикалов:



Это короткоживущие радикалы, действующие в месте своего образования, представляют еще большую опасность для жизнедеятельности клетки, нежели супероксидный анион. Их выход будет тем меньше, чем интенсивнее будет вовлекаться супероксидный анион в реакцию дисмутации, катализируемую супероксиддисмутазой. Функционирование СОД является лишь первым барьером, защищающим организм от токсического действия активных форм кислорода. Этот фермент играет роль антирадикальной защиты. Перевод с помощью СОД супероксидных анионов в перекись водорода лишь уменьшает опасность, но не устраняет ее, хотя токсичность  $H_2O_2$  в 10 раз меньше, чем  $O_2^-$ . Так же, как и  $O_2^-$ , перекись водорода относится к нормальным продуктам обмена веществ, необходимым для осуществления разнообразных биохимических реакций. Стационарная концентрация перекиси водорода в клетках составляет  $10^{-9} - 10^{-7}$  М. При усилении генерации супероксидных анионов в процессе биотрансформации химических веществ происходит увеличение продукции и перекиси водорода. В этих условиях проявляется токсическое действие как  $O_2^-$ , так и  $H_2O_2$ . Наиболее существенным является возможность их взаимодействия с перекисями липидов, усиление перекисидации липидов и нарушение проницаемости мембран. Кроме того, перекись водорода взаимодействует с ДНК, вызывает хромосомные aberrации, участвует в образовании метгемоглобина. Эти эффекты  $H_2O_2$  не проявляются, пока успешно функционирует в организме вторая линия ферментативной защиты от повреждающего действия активных форм кислорода. К ней относятся каталаза и глутатионпероксидаза.

Ферментные антиоксидантные защитные системы «гасят» свободные радикалы с помощью потока протонов ( $H^0$ ), источниками которых служит фонд никотинамидных коферментов, пополняющихся за счет реакций пентозофосфатного цикла [8].

Молекулярные механизмы поддержания гомеостаза при действии активных форм кислорода и

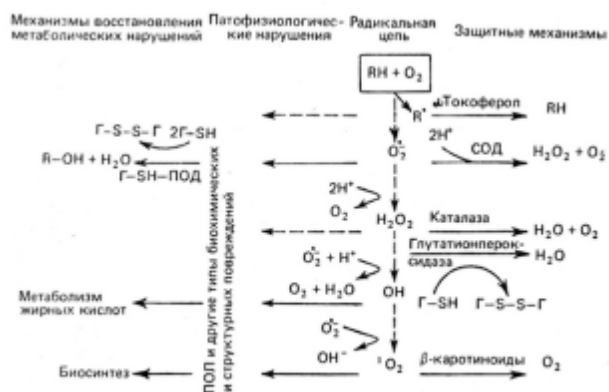


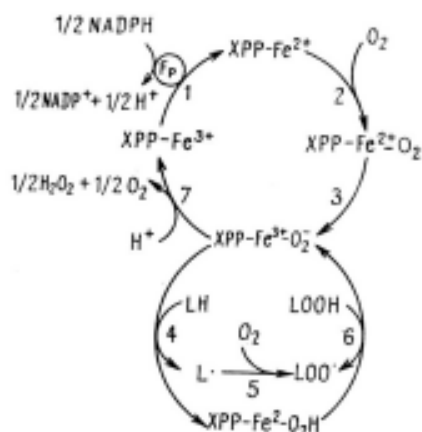
Рис. 6. Молекулярные механизмы защиты от активных форм кислорода и перекисных соединений.

перекисных соединений включают не только ферментативные, но и неферментативные биохимические системы. К ним относятся эндогенные антиоксиданты, жирорастворимые витамины группы А ( $\beta$ -каротиноиды) и Е ( $\alpha$ -токоферол). Действие  $\alpha$ -токоферола направлено на нейтрализацию радикалов неокислородной природы.  $\beta$ -каротиноиды, богатые двойными связями, взаимодействуют с синглетным кислородом, переводя его в триплетное состояние. Пути образования активных форм кислорода, перекисей и молекулярные механизмы защиты организма от повреждающего действия представлены на рис. 6.

Необходимо иметь в виду, что определенный вклад в защиту организма от радикальных повреждений могут вносить эндогенные метаболиты, обладающие антиоксидантной активностью. К их числу относятся некоторые аминокислоты (цистеин, метионин, гистидин, аргинин), мочевины, холин, восстановленный глутатион, стероиды, ненасыщенные жирные кислоты [7].

При воздействии на организм разнообразных ксенобиотиков по мере нарастания концентрации или продолжительности их действия увеличивается скорость биотрансформации, повышается активность микросомальных монооксигеназ и в соответствии с этим усиливается генерация активных форм кислорода и перекиси водорода. Ускорение процесса выше определенного предела приводит к срыву рассмотренных выше антирадикальных и антиперекисных механизмов защиты. Первыми признаками нарушения молекулярных механизмов, ответственных за поддержание гомеостаза, является усиление процесса перекисного окисления липидов.

Широко известно, что при микросомальном перекисном окислении липидов кислородные радикалы могут вызвать повреждение биологических мембран клеток. В перекисном окислении участвуют флавопротеин (NaДФН-цитохром Р-450-редуктаза) и ионы  $Fe^{2+}$  или  $Fe^{3+}$ , хелатированные нуклеозидди- или трифосфатами. Супероксидный анион и перекись водорода взаимодействуют с полиненасыщенными жирными кислотами мемб-



**Рис. 7.** Схема реакций, участвующих в NaДФН-зависимом микросомальном перекисном окислении липидов.  $F_p$ -NaДФН-цитохром P-450-редуктаза; XPP-нуклеозидди- или трифосфаты.

ран клеток, вызывая образование разнообразных продуктов перекисаации липидов (альдегиды жирных кислот, малоновый диальдегид, кетоны, алканы с короткой цепью).

Рис. 7 иллюстрирует сегодняшнее представление о механизме NaДФН-зависимого перекисного окисления липидов в микросомах. Начальным событием в цепи реакций является восстановление хелатного комплекса ( $XPP-Fe^{3+}$ ) с помощью NaДФН-цитохром P-450-редуктазы (реакция 1). Затем происходит взаимодействие  $XPP-Fe^{2+}$  с молекулярным кислородом с образованием  $XPP-Fe^{2+}-O_2$  (реакция 2). Последующий внутримолекулярный перенос электрона приводит к образованию перферрильного радикала ( $XPP-Fe^{3+}-O_2^{\cdot-}$ ) (реакция 3), который и ответственен за инициацию перекисного окисления липидов. Окисление включает 3 стадии: отщепление водородного атома от остатка полиненасыщенной жирной кислоты в фосфолипиде LH с образованием свободного радикала  $L^{\cdot-}$  (реакция 4); далее происходит связывание  $O_2$  с образованием  $LOO^{\cdot-}$  (реакция 5); последующая регенерация перферрильного радикала и возникновение гидроперекиси LOOH (реакция 6). Циклы превращений замыкают диссоциация перферрильного радикала на  $XPP-Fe^{3+}$  и супероксид ( $O_2^{\cdot-}$ ) и превращение последнего в  $H_2O_2$  и  $O_2$  (реакция 7) [23].

Другим важным классом реакций, ведущих к образованию кислородных радикалов, является восстановление хинонов до семихинонов [23].

В работе [25] было показано, что различные хиноны, как природные, так и ксенобиотики, восстанавливаются некоторыми флавопротеинами, окисляющими NaДН или NaДФН и действующими как одноэлектронные хинонредуктазы.

Таким образом, в основном в печени и в ряде других органов при функционировании микросомальных монооксигеназ из липидотропных химических веществ, образуются полярные соединения, имеющие реактивные группы. Благодаря при-

обретенным реакционноспособным группам (ОН, СООН,  $NH_2$ , SH) они легко вступают в реакцию конъюгации с образованием продуктов, выводимых из организма с мочой, желчью и калом.

Реакции конъюгации составляют вторую фазу биотрансформации липидорастворимых ксенобиотиков. В организме животных и человека наибольшее распространение получили следующие реакции конъюгации: глюкуронидная, сульфатная, с глутатионом, с глутамином, с аминокислотами; а также метилирование и ацетилирование. Механизм реакций конъюгации предусматривает обязательное участие в этих процессах макроэргов — соединений, богатых энергией [35]. Значительная часть этих реакций протекает на мембранах эндоплазматической сети клеток, непосредственно в месте образования высокореактивных метаболитов при действии оксидаз со смешанными функциями. Это позволяет минимизировать токсическое действие продуктов биотрансформации ксенобиотиков. Реакции конъюгации протекают и на других внутриклеточных структурах, а также в цитозоле, что дает возможность связывать токсические продукты, появляющиеся вне эндоплазматической сети.

Таким образом, молекулярные механизмы поддержания гомеостаза при действии на организм липидорастворимых химических соединений включает три основные биохимические системы:

1. система микросомальных монооксигеназ, обеспечивающих протекание реакций первой фазы биотрансформации липотропных соединений;
2. система ферментов, осуществляющих реакции конъюгации, составляющие вторую фазу биотрансформации (собственно детоксикация);
3. система ферментативной и неферментативной антирадикальной и антиперекисной защиты, обеспечивающей купирование токсического действия активных форм кислорода и вторичных перекисных соединений, образующихся при метаболизме ксенобиотиков в первой фазе их биотрансформации.

Активность микросомальных оксигеназ, катализирующих процессы биотрансформации в первой фазе детоксикации, так же активность ферментов, участвующих в реакции конъюгации, составляющих вторую фазу детоксикации, не является строго постоянной. Она зависит от режима питания, пола, возраста и функционального состояния организма. Известно, что стрессовые воздействия сопровождаются значительными изменениями активности названных ферментных систем [35]. Определенную роль играют также сезонные и суточные колебания активности этих ферментов. Однако наиболее выраженное действие на функционирование биохимических систем, ответственных за процессы детоксикации, оказывают химические вещества, которые условно можно разделить на две группы: индукторов и ингибиторов микросомальных монооксигеназ.

Все вещества, вызывающие активацию микросомальных ферментов могут быть также раз-

делены на 2 группы: индукторы широкого спектра действия и индукторы узкого спектра действия, избирательно активизирующие определенные соединения. К первой группе относятся фенobarбитал и другие барбитураты, хлорированные углеводороды. Индукторы этой группы обладают способностью к биотрансформации многочисленных липидорастворимых веществ, увеличивая содержание в микросомальной фракции цитохрома P-450 и активность НАДФ-Н-цитохром P-450-редуктазы [14], стимулируя процессы окисления, восстановления и реакции глюкуроноидной конъюгации. При этом отмечается пролиферация эндоплазматического ретикула в гепатоцитах, увеличивается масса печени, в которой возрастает содержание микросомального белка, фосфолипидов, повышается активность глюкуронилтрансферазы [8]. К индукторам второго типа следует отнести метилхолантрен и другие полициклические ароматические углеводороды. Действие индукторов второго типа характеризуется появлением в эндоплазматическом ретикуле одной из разновидностей цитохрома P-450 – цитохрома P-448 [14].

В настоящее время установлено, что под влиянием индукторов происходит синтез микросомальных белков-ферментов *ad novo* [4]. В основе же действия индукторов лежит активация генома с последующим синтезом микросомального белка и гема [14].

К числу ингибиторов микросомальных монооксигеназ относятся многочисленные соединения различной химической природы, которые условно можно разделить на несколько групп [36].

Первую группу составляют обратимые ингибиторы прямого действия. В эту группу входят эфиры, лактоны, изоцианаты, оксигенированные стероиды, фенолы, хиноны и др.

Во вторую группу входят обратимые ингибиторы непрямого действия, оказывающие влияние на микросомальные ферменты через промежуточные продукты своего метаболизма, которые образуют комплексы с цитохромом P-450. К этой группе относятся производные бензола, ароматические амины, гидразины, алкиламины и др.

Третья группа включает необратимые ингибиторы, разрушающие цитохром P-450. К их числу принадлежат полигалогенизированные алканы, производные олефинов, алеины, серосодержащие соединения и др.

Четвертую группу составляют ингибиторы, тормозящие синтез и (или) ускоряющие распад цитохрома P-450. Это ионы металлов, органические соединения, влияющие на синтез гема и подавляющие белковый синтез.

Из ингибиторов третьей группы подробно исследовано действие гепатотропных ядов, особенно четыреххлористого углерода. При его взаимодействии с цитохромом P-450 образуются радикалы  $CL^-$  и  $CCl_3^-$ . Свободные радикалы способны как прямо взаимодействовать с макромолекулами, модифицируя их, так и выполнять роль инициато-

ров процессов перекисного окисления ненасыщенных жирных кислот в мембранах [15]. Показано, что водородные атомы метиленовых мостиков в ненасыщенных жирных кислотах (в основном арахидоновой и докозогексаеновой) очень чувствительны к действию свободных радикалов. Именно эта атака является инициатором образования липидных перекисей в биологических мембранах. Трихлорметильный радикал  $CCl_3^-$  вызывает ускорение образования перекисей липидов в мембранах эндоплазматического ретикула, что является экспериментально доказанным фактом и лежит в основе прооксидантного действия четыреххлористого углерода [29].

Заслуживает особого внимания рассмотрение вопроса о роли системы P-450 в метаболизме полиненасыщенных жирных кислот, особенно биотрансформации арахидоновой кислоты. Биологическая роль метаболитов последней чрезвычайно велика и разнообразна. Они участвуют в регуляции сосудистого тонуса, влияя на активный транспорт ионов в клетках различных органов, модулируют рост клеток и многое другое [10].

Наиболее значимо превращение арахидоновой кислоты в системе цитохрома P-450 в печени. Несмотря на то, что в последней отмечается высокая активность ферментов этой системы, сведений о влиянии метаболитов полиненасыщенных жирных кислот на функцию печени в литературе не найдено. Вероятно, практически все биологически активные производные арахидоновой кислоты выходят в кровь и проявляют свое действие в других органах и тканях [18]. Так, метаболиты арахидоновой кислоты играют существенную роль в регуляции функции почек, принимая участие в обмене электролитов и воды, регулируя скорость протекания крови, а также выступая в роли модуляторов и мессенджеров вазоактивных гормонов. Производные арахидоновой кислоты оказывают значительное влияние на функциональное состояние нервной системы. Эпоксикозатриеновые метаболиты (EET) вносят вклад в микроциркуляцию крови. Это связано с активацией калиевых каналов и повышением количества ионов калия, поступающего в цереброваскулярные гладкомышечные клетки. Гидроксилазные же метаболиты арахидоновой кислоты, наоборот, вызывают вазоконстрикцию. Превращение арахидоновой кислоты в ее активные метаболиты происходит также в сердце и крупных сосудах. В кардиомиоцитах в большом количестве экспрессирован цитохром P-450 2J3. В результате превращения этим ферментом образуются эпоксикозатриеновые метаболиты, особенно 11, 12-EET, повышающие восстановление сократительной способности миокарда после длительной ишемии [18].

Большое влияние оказывают P-450-зависимые производные арахидоновой кислоты на функциональное состояние сосудов. EET метаболиты выполняют роль химических мессенджеров между эндотелиальными и гладкомышечными клетками сосудов, вызывают гиперполяризацию мембран

последних, приводящую к расширению сосудов. В клетках крови (нейтрофилах и тромбоцитах) также обнаружен активный синтез P-450-зависимых метаболитов арахидоновой кислоты, участвующих в процессах свертывания крови.

Превращение арахидоновой кислоты представляет сложный процесс, в который вовлечено большое количество ферментных систем, тесно взаимодействующих между собой, где важнейшей является монооксигеназная [18]. Таким образом, арахидоновая кислота и ее производные, образующиеся в этой системе, обладают широким спектром биологической активности, что оказывает большое влияние на функциональное состояние многих органов и гомеостаз целостного организма.

Известно также, что различные физиологические и патологические состояния организма оказывают влияние на уровень цитохрома P-450 в печени. В ряде работ было показано, что активность монооксигеназной системы изменяется при атеросклерозе, гипертонии, гепатите, опухолевых заболеваниях, аллергических состояниях, бактериальной интоксикации [18]. Более подробно изменение системы цитохрома P-450 было исследовано при вирусных и бактериальных инфекциях, асептическом воспалении, введении липополисахаридов (ЛПС). При этом была угнетена активность микросомальных монооксигеназ, снижено содержание цитохрома P-450, нарушена фармакометаболизующая функция печени [6].

Еще в 1980 г. Mannering G.J. et al. [30] предположили, что элиминационная способность печени в отношении лекарственных веществ уменьшается в присутствии интерферона, синтез которого увеличивается при вирусных инфекциях и вакцинациях. После введения технологии рекомбинантной ДНК было получено прямое доказательство вовлечения интерферона в снижение биотрансформации ксенобиотиков: клонированный человеческий альфа-интерферон угнетал активность цитохрома P-450 у мышей.

Сопоставление функционирования цитохром P-450-зависимой системы печени и иммунологической системы позволило И.Е. Ковалеву в 1978 г. прийти к выводу, что деятельность этих систем базируется на общих универсальных принципах, и они функционально сопряжены.

С.В. Сибиряк и соавторы [9] установили, что депрессия активности монооксигеназ печени при введении различных иммуностимуляторов строго коррелирует с их влиянием на макрофаги. Активация макрофагов при фагоцитозе стимулирует водородные пероксиды и супероксиды с последующим повреждением фосфолипидов микросомальных мембран и компонентов цепи электронного транспорта монооксигеназной системы. То есть иммунологический компонент оказывает действие на микросомальное окисление в печени.

Было показано, что на введение самых различных иммуноадьювантов (ЛПС *E. coli* или *S. marcescens*, мурамилдипептида, вакцины БЦЖ) прослеживается идентичная сопряженная динамика

изменений макрофагальной активности, интенсивности монооксигенирования в печени и уровня глюкокортикоидов [9].

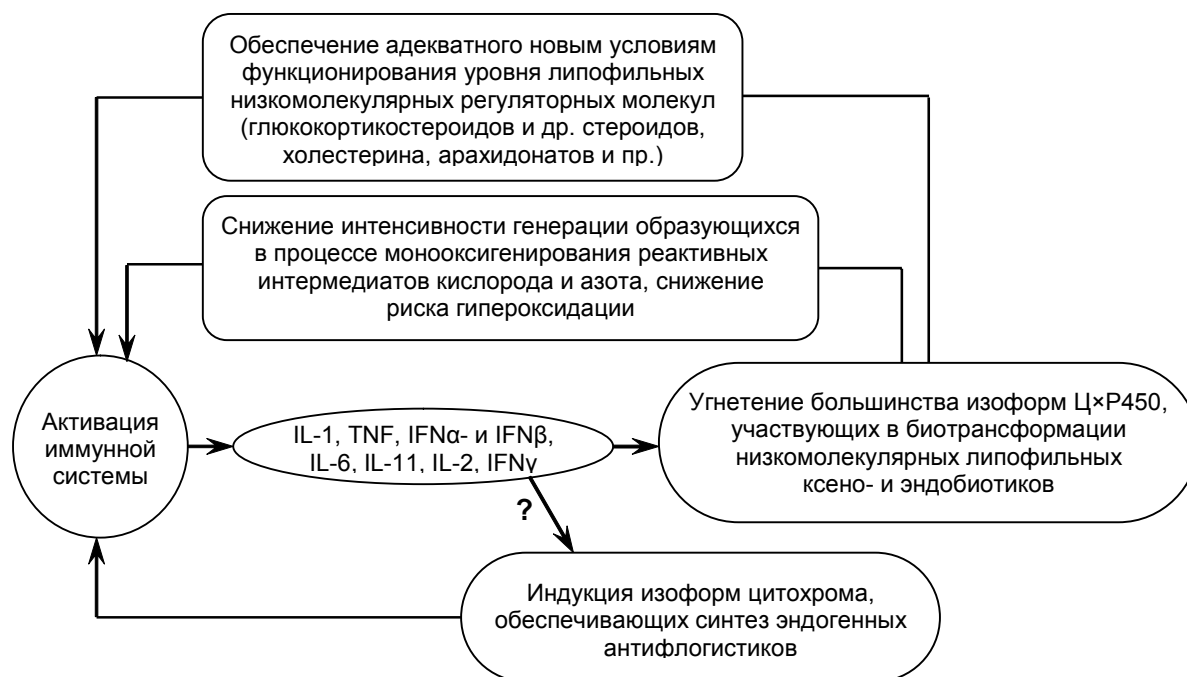
Эти же авторы определили, что практически все провоспалительные цитокины (IL-1, TNF, IL-6, IL-11, IFN $\gamma$ ) и факторы роста (TGF $\beta$ , EGF,  $\beta$ FGF,  $\alpha$ FGF, KGF) в той или иной степени ингибировали изоформы цитохрома P-450, участвующие в биотрансформации глюкокортикоидов. Такой механизм, помимо центральной корректировки, обеспечивал сохранение необходимого уровня ключевых регуляторов воспалительной реакции в условиях активации иммунной системы [19].

Кроме изменения метаболизма глюкокортикоидов, опосредованно через цитохром P-450, провоспалительные цитокины угнетают также биотрансформацию холестерина. Это в свою очередь обеспечивает его адекватный уровень в организме при активации иммунитета. Концентрация холестерина является важнейшим фактором регуляции состояния клеток, их пролиферативной активности и апоптоза [19].

Детальное исследование роли NO в цитокин-зависимой модуляции цитохрома P-450 в опытах *in vitro* провели Carlson M.T. и Billings R.E. [26]. Они измеряли количество P-450 и различных CYP-белков в первичной культуре гепатоцитов, обработанных комбинацией цитокинов, включая TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  и IFN- $\gamma$ . Это сочетание снижало уровень цитохрома P-450 на 69 %. Фактор некроза опухоли (TNF- $\alpha$ ) и интерлейкин (IL-1 $\beta$ ) вызывали индукцию синтеза NO, за которой наступало снижение уровня белков CYP 2B1/2 и CYP 3A2 (TNF- $\alpha$ ) и CYP 1A2, CYP 2B1/2, CYP 2C11 и CYP 3A2 (IL-1 $\beta$ ). Ингибирование P-450 под действием TNF- $\alpha$  и IL-1 $\beta$  напрямую было связано с индукцией NO-синтазы. Позднее О. Хаценко [22] было доказано, что NO способен угнетать экспрессию цитохрома P-450 *in vivo*, что может являться основным механизмом снижения количества этого фермента при воспалении. Ингибирующее действие NO объясняется его свойством восстанавливать ферриформу фермента P-450 до неактивной ферроформы, конкуренцией с эндогенными (например, O $_2$ ) или экзогенными лигандами за связывание с железом и способностью радикала оксида азота выступать в качестве ловушки свободных радикалов. Вполне возможно, что NO не является единственным медиатором снижения метаболической функции печени при воспалении. Однако, оксид азота играет важную роль, а избыточный синтез NO при воспалении или инфекции оказывает значительное влияние на регуляцию цитохрома P-450 зависимого метаболизма [22].

Необходимо подчеркнуть, что ингибируя большинство изоформ цитохрома P-450, цитокины обеспечивают снижение риска гипероксидации «при активации иммунной системы» и таким образом участвуют в регуляции нормального баланса про- и антиоксидативных процессов. Так отмечена индукция некоторых изоформ цитохрома P-450 при острофазном ответе. Это касается подсе-





**Рис. 8.** Роль цитокин-опосредованной депрессии цитохрома Р-450 в механизмах поддержания гомеостаза и адаптации при активации иммунной системы.

мейства CYP 4A, CYP 4F и частично CYP 2E1 [33]. Они осуществляют биотрансформацию одного из основных медиаторов воспаления —  $LBT_4$ , а также реализуют «цитохромовый путь» метаболизма арахидонатов с образованием гидроксиметаболитов — 17-, 18-, 19-, 20-ОН арахидоновой кислоты и эпоксиэйкозатриевых кислот. Продукты превращения арахидоновой кислоты кроме мощного локального и дистантного вазотропного действия, угнетают экспрессию молекул адгезии, снижают активацию NF-κB, являются антагонистами пирогенного эффекта IL-1, т.е. проявляют эндогенный антифлогистический эффект [24] (рис. 8).

Таким образом, при активации иммунной системы регуляция механизмов биотрансформации низкомолекулярных ксено- и эндобиотиков осуществляется благодаря корректирующему воздействию цитокинов на P-450-зависимый метаболизм. Это обеспечивает с одной стороны защиту от возможного неконтролируемого изменения активности монооксигеназной ферментной системы, с другой — сохранение адекватного уровня и неогенез низкомолекулярных сигнальных молекул [19]. Вмешательство в сложившийся механизм саморегуляции, в частности, индукция монооксигенирования, в условиях воспалительной реакции весьма небезопасна для организма, поскольку увеличивает риск альтернативных процессов, в том числе и обусловленных свободнорадикальными механизмами. Все больше накапливается работ, свидетельствующих, что ксенобиотики индуцирующие систему цитохрома P-450, вызывают гиперпродукцию провоспалительных цитокинов, повышают чувствительность к бактериальным эндотоксинам, вирусным инфекциям, сенсibiliзируют гепатоциты и другие клетки к рецепторно-индуцированному и нерелепторному апоптозу [19, 37].

Изменения в метаболизирующей системе печени доказаны при многих соматических заболеваниях. Так в ряде исследований обнаружена индукция уникальной изоформы P-450 (CYP 2E1), названной «диабетической» [12]. Было высказано предположение, что, именно снижение уровня инсулина является фактором увеличения активности изоформ CYP 2E1. Необходимо отметить, что индукция этой изоформы при диабете является адаптивной реакцией организма, направленной на уменьшение (путем окисления) содержания кетонных тел. А их накопление, как известно, сопровождается освобождением ионов водорода и сдвигом pH крови в кислую сторону.

Повышение активности ферментов микросомального окисления отмечено при острой патологии печени (реактивный гепатит). В то же время при хронических заболеваниях печени вирусного генеза имеет место угнетение цитохром P-450-зависимого гидроксигенирования [15]. В основе этого явления лежит индукция ксантиноксидазы, вызванная иммуностимулирующим агентом (в частности, интерфероном), которая увеличивает генерирование супероксидных радикалов. Возможным источником последних является также активация фагоцитарных клеток.

К заболеваниям, протекающим с поражением системы цитохрома P-450, можно отнести и атеросклероз. Рядом авторов высказано мнение, которое разделяем и мы, о том, что при атеросклерозе нарушаются защитные механизмы организма, контролирующие процессы воспаления и регенерации повреждения [20]. Как было показано выше, при воспалении нарушается баланс про- и антиоксидативных процессов. Если процесс становится неуправляемым, он приводит к угнетению монооксигеназной функции микросомального ци-

тохрому Р-450. Угнетение это осуществляется разными путями: через интерфероны, интерлейкины, активацию ретикуло-эндотелиальной системы, перекисное окисление липидов. Сбой в системе микросомального гидроксилирования запускает цепную реакцию нарушений биотрансформации многих эндогенных биосубстратов (стероидов, жирных кислот, простагландинов и т.д.).

Таким образом, система цитохрома Р-450 играет важную роль в поддержании химического гомеостаза внутренней среды организма, принимая участие в окислительной биотрансформации поступающих в организм чужеродных химических соединений, а также эндогенных липофильных биорегуляторных молекул — эндобиотиков.

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Арчаков А.И. Микросомальное окисление / А.И. Арчаков. — М.: Наука, 1975. — 327 с.
2. Арчаков А.И. Оксигеназы биологических мембран / А.И. Арчаков. — М., 1983. — 180 с.
3. Арчаков А.И. Окисление чужеродных соединений / А.И. Арчаков, И.И. Карузана // Вестник АМН СССР. — 1988. — № 1. — С. 14–23.
4. Большов В.Н. Индукторы и ингибиторы ферментов метаболизма лекарств / В.Н. Большов // Фармакол. и токсикол. — 1980. — № 3. — С. 373–380.
5. Владимиров Ю.А. Перекисное окисление липидов в биологических мембранах / Ю.А. Владимиров, А.И. Арчаков. — М., 1972. — 180 с.
6. Влияние рекомбинантного J1-1В на цитохром Р-450-зависимые монооксигеназы печени и почек. Взаимосвязь со специфическим и нейроэндокринными эффектами / А.Т. Ахматов, С.В. Сибиряк, А.С. Симбирцев, Д.С. Сибиряк // Цитокины и воспаление. — 2004. — № 1. — С. 20–25.
7. Воскресенский Р.Н. Антиоксидантная система, онтогенез и старение / Р.Н. Воскресенский, И.А. Жутаев, В.Н. Бобырев // Вопр. мед. химии. — 1982. — № 1. — С. 14–27.
8. Голиков С.И. Общие механизмы токсического действия / С.И. Голиков, И.В. Саноцкий, Л.А. Тиунов. — Л.: Медицина, 1986. — 276 с.
9. Динамика изменений макрофагальной активности, метаболической активности печени и уровня кортизола в сыворотке на фоне введения бактериальных иммуностимуляторов / С.В. Сибиряк, С.А. Сергеева, С.А. Крыжановский, И.П. Красилова // Бюлл. эксп. биол. и мед. — 1996. — № 2. — С. 177–180.
10. Изоформы цитохрома Р-450, метаболизирующие полиненасыщенные жирные кислоты / В.В. Кржечковская, Г.А. Желтухина, В.Е. Небольсин, Р.П. Евстигнеева // Успехи совр. биол. — 2002. — Т. 122, № 4. — С. 390–400.
11. Ковалев И.Е. Микробные глюкозилмурамилпептиды как эффективные симбиотические адаптогены и потенциальные средства терапии болезней, ассоциированных со старением / И.Е. Ковалев, Н.В. Шипулина // Хим-фарм. журн. — 1996. — № 2. — С. 3–11.
12. Ковалев И.Е. Система цитохрома Р-450 и сахарный диабет / И.Е. Ковалев, Е.И. Румянцева // Проблемы эндокринологии. — 2000. — Т. 46, № 2. — С. 16–22.
13. Ляхович В.В. Структурные аспекты биохимии монооксигеназ / В.В. Ляхович, И.Б. Цырлов. — Новосибирск: Наука, 1978. — 200 с.
14. Ляхович В.В. Индукция ферментов метаболизма антибиотиков / В.В. Ляхович, И.Б. Цырлов. — Новосибирск: Наука, 1981. — 240 с.
15. Матюшин Б.Н. Особенности цитохром Р-450-зависимого гидроксилирования в ткани печени больных с гепатобилиарной патологией / Б.Н. Матюшин, А.С. Логинов, В.Д. Ткачев // Клин. лаб. диагностика. — 1994. — № 1. — С. 25–27.
16. Метелица Д.И. Активация кислорода ферментными системами / Д.И. Метелица. — М.: Наука, 1982. — 150 с.
17. Мишин В.М. Множественные формы цитохрома Р-450 / В.М. Мишин, В.В. Ляхович. — Новосибирск: Наука, 1985. — 180 с.
18. Роль системы цитохрома Р-450 в метаболизме полиненасыщенных жирных кислот. Биологическое действие метаболитов / В.Е. Небольсин, В.В. Кржечковская, Г.А. Желтухина, Р.П. Евстигнеева // Успехи совр. биол. — 1999. — Т. 119, № 1. — С. 70–83.
19. Сибиряк С.В. Цитокины как регуляторы цитохром Р-450-зависимых монооксигеназ. Теоретические и прикладные аспекты / С.В. Сибиряк // Цитокины и воспаление. — 2003. — Т. 2, № 2. — С. 12–21.
20. Стойка Р.С. Цитокины и клетки-мишени в регуляторной системе атерогенеза / Р.С. Стойка, А.А. Фильченков, В.Н. Залесский // Успехи совр. биол. — 2003. — Т. 123, № 1. — С. 82–97.
21. Уваров В.Ю. Влияние цитохрома  $b_5$  на функциональную активность и конформационное состояние цитохрома Р-450 / В.Ю. Уваров, Г.И. Багшанова, А.И. Арчаков // Биохимия. — 1983. — Вып. 9. — С. 1542–1547.
22. Хаценко О. Взаимодействие оксида азота и цитохрома Р-450 в печени / О. Хаценко // Биохимия. — 1998. — Т. 63, № 7. — С. 984–991.
23. Эрнстер Л. Биохимия токсичности кислорода / Л. Эрнстер. — М.: Наука, 1986. — 166 с. — Биоорганическая химия и молекулярная биология. Сер. Биоэнергетика. Биомембраны и транспорт.
24. Anti-inflammatory properties of cytochrome P-450 epoxigenases-derived eicosanoids / K. Node, Y. Huo, X. Ruan et al. // Science. — 1999. — Vol. 285. — P. 1276–1279.
25. Vachur N.R., Gordon S.L., Gee M.V. цитировано по Л. Эрнстер. Биохимия токсичности кислорода // Биоорганическая химия и молекулярная биология. (Биоэнергетика. Биомембраны и транспорт). — М.: Наука, 1986. — 166 с.
26. Carlson T.I, Billings R.E. Цитировано по О. Хаценко. Взаимодействие оксида азота и цитохрома Р-450 в печени // Биохимия. — 1998. — Т. 63, Вып. 7. — С. 984–991.
27. Chemical reactivity of oxygen-derived radicals with reference to biological system / I. Van-

nister, H. Allen, O. Hill // *Biochem. Soc. Transact.* — 1982. — Vol. 10, N 2. — P. 68–69.

28. Conney A.H. Pharmacological implications of microsomal enzyme induction / A.H. Conney // *Pharmacol. Rev.* — 1967. — Vol. 19. — P. 317–366.

29. Gillette I. Effect of induction of cytochrome P-450 on the concentration of foreign compounds and metabolites and their on the toxicological effect of these compounds / I. Gillette // *Drug. Metabol. Rev.* — 1979. — Vol. 10, N 1. — P. 59–87.

30. Kappus H. Toxic drug effect associated with oxygen metabolism redox cycling and lipid peroxidation / H. Kappus, H. Sies // *Experientia.* — 1981. — Vol. 37, N 12. — P. 1233–1241.

31. Mannering G.I., Renton K.W., El-Arshary E., Deloria L.B. // *Ann. N.Y. Acad. Sci.* — 1980. — Vol. 350. — P. 314–331.

32. *Microsomes and Drug Oxidations* / M.I. Coon, S.D. Black, V.S. Fujita et al.; Eds. A.R. Boobis et al. — London, 1985. — P. 42–51.

33. Modulation of cytochrome P-450 gene expression in endotoxine mice is tissue specific and peroxisome proliferators receptor A dependent / T. Barclay, I. Peters, M. Sewer et al. // *J. Pharm. Exp. Ther.* — 1999. — Vol. 290. — P. 1250–1257.

34. Padmanaban G. Regulation of the synthesis of cytochrome P-450 in liver / G. Padmanaban // *Biochem. Soc. Trans.* — 1981. — Vol. 9, № 6. — P. 573–579.

35. Paulson G. Conjugation of foreign chemicals by animals / G. Paulson // *Residue Rev.* — 1979. — Vol. 70. — P. 32–72.

36. Testa B. Inhibitors of cytochrome P-450 and their mechanism of action // B. Testa, P. Lenner // *Drug Metabol. Rev.* — 1981. — Vol. 12, N 1. — P. 1–117.

37. Zonated expression of cytokines in rat liver: effect of chronic ethanol and cytochrome P-450 2E1 inhibitor, chlormethiazole / C. Fang, K. Lindros, T. Badger et al. // *Hepatology.* — 1998. — Vol. 27. — P. 1304–1310.