

Е. Б. БУРЛАКОВА, С. А. БУРОБИНА, Н. Г. ХРАПОВА

## ДЕЙСТВИЕ СИНТЕТИЧЕСКИХ ИНГИБИТОРОВ РАДИКАЛЬНЫХ ПРОЦЕССОВ НА ПРИРОДНЫЕ АНТИОКСИДАНТЫ В ЛИПИДАХ

(Представлено академиком Г. М. Франком 20 XI 1970)

В настоящее время в биологии и медицине по предложению академика Н. М. Эмануэля широко используются ингибиторы радикальных процессов. Было показано, что ингибиторы радикальных процессов обладают радиозащитными и противоопухолевыми свойствами (<sup>1</sup>, <sup>2</sup>). Эффективность действия ингибиторов коррелировала с их влиянием на антиокислительную активность липидов (а.о.а.) (<sup>3</sup>), и они могут быть использованы в качестве агентов направленного изменения а.о.а. липидов (<sup>4</sup>). Например, при внутривенном введении ионола (4-метил-2,6-дитрет-бутилфенола) intactным мышам наблюдается экстремальное изменение величины а.о.а. во времени, которое наиболее естественно объяснить закономерностями поступления и выхода ингибитора из организма. До тех пор, пока его концентрация в липидах печени увеличивается, а.о.а. возрастает, затем по мере выведения ингибитора из организма а.о.а. снижается и достигает нормы. Такое простое объяснение предполагает отсутствие изменений в самих природных антиоксидантах, в реакциях их синтеза и утилизации. Однако несостоятельность такого объяснения становится очевидной при введении больших доз ингибитора. Хотя общая закономерность в изменении а.о.а. сохраняется, понижается уровень антиокислительной активности липидов. При введении ионола в дозе 30 мг/кг а.о.а. возвращается к норме. При дозе введения ионола 100 мг/кг наблюдается снижение а.о.а. ниже нормы, которое держится на этом уровне в течение 5—7 суток.

Синтетические ингибиторы, по-видимому, активно влияют на метаболизм природных антиоксидантов. Мы предположили, что наличие общих свойств у синтетических ингибиторов и природных антиоксидантов приводит к тому, что они, с одной стороны, могут складываться в своем действии и подменять друг друга. С другой стороны, синтетические ингибиторы могут влиять на реакции синтеза и утилизации природных антиоксидантов.

Для подтверждения этого предположения необходимо было изучить не только общие закономерности изменения а.о.а., а изменения в системе синтетических и природных антиоксидантов порознь.

Для этой цели нами было проведено изучение синтетических и природных антиоксидантов и их смесей методом хемилюминесценции (<sup>5</sup>, <sup>6</sup>). Были определены кинетические характеристики синтетических и природных антиоксидантов и выбраны те параметры, которые изменялись за счет присутствия в системе либо синтетических ингибиторов, либо природных антиоксидантов. Оказалось, что величина периода индукции на кинетических кривых изменения интенсивности свечения для смесей синтетических и природных антиоксидантов определяется только содержанием в липидах природных антиоксидантов\*. Количество синтетических ин-

\* Это справедливо только для определения интервалов концентраций синтетических ингибиторов.

гибиторов в смеси можно определить из калибровочных кривых зависимости величины  $\left(\frac{dI/I_0}{dt}\right)_{\max}$  от концентрации ингибитора.

На основании разработанной нами методики <sup>(6)</sup> было изучено изменение концентрации природных и синтетических ингибиторов в липидах печени мышей, которым вводили 4-метил-2,6-дитрет-бутилфенол (ионол) в дозе 30 и 100 мг/кг, хлоргидрат 6-метил-2-этил-3-оксипиридина в дозе 150 мг/кг и *n*-пропиловый эфир галловой кислоты в дозе 60 и 120 мг/кг. Эти ингибиторы имеют различные значения относительной антиокислительной эффективности ( $\epsilon$ ) и констант реакции со свободными радикалами ( $k_7$ ).

В опыте использовались мыши-самцы линии Balb весом 18—22 г. Ингибиторы вводились внутривентрально в виде водных растворов или водных эмульсий с добавлением Tween-80. Животных забивали через 6 и 18 час. и через 1; 2; 3; 5 и 7 суток после введения. Липиды экстрагировали смесью хлороформ — эфир (1:1). Моделью для определения антирадикальной активности липидов служила реакция иницированного окисления этилбензола.

Снимали кинетические кривые изменения интенсивности свечения системы. По ним измеряли период индукции, интенсивность свечения системы в момент введения липидов, максимальную скорость изменения свечения. Строили зависимость этих величин от концентрации введенных липидов <sup>(5)</sup>.

Зависимость периода индукции от концентрации липидов в довольно большом интервале концентраций представляет собой прямую линию, тангенс угла наклона которой характеризует количество природных антиоксидантов в 1 мг липидов. За единицу было принято количество природных антиоксидантов, содержащихся в 1 мг липидов интактных животных. Относительное количество природных антиоксидантов в липидах опытных животных определялось как отношение тангенсов углов наклона опытных и контрольных прямых. На рис. 1 представлено изменение относительного количества природных антиоксидантов в липидах опытных животных в зависимости от времени после введения ионола в дозе 100 мг/кг.

В первые часы наблюдается уменьшение природных антиоксидантов, количество которых к 1 суткам восстанавливается до нормы, а затем снова уменьшается и держится на пониженном уровне до 5—7 суток. Опыт был повторен 4 раза в разное время года и на разных партиях мышей. Всего было использовано 500 мышей, значения каждой точки получены от 30—50 животных.

Введение животным меньших доз ионола (30 мг/кг) также вызывает уменьшение количества природных антиоксидантов, но в меньшей степени, причем ход изменений со временем имеет тот же характер, что и для больших доз ионола.

Нами изучалось не только общее изменение количества природных антиоксидантов, но и изменение индивидуального природного антиоксиданта — токоферола, количество которого определялось спектрофотометрически. Как видно из сопоставления данных (рис. 1), изменение количества токоферола при введении животным ионола в дозе 100 мг/кг имеет тот же характер, что и изменение общего количества природных антиоксидантов. Относительное количество токоферола уменьшается почти так же или несколько больше, чем общее количество природных антиоксидантов.

Таким образом, изменение индивидуального антиоксиданта токоферола симбатно изменению общего количества природных антиоксидантов, однако не определяет его полностью.

По кинетическим кривым изменения интенсивности свечения нами было рассчитано количество ионола, присутствующего в липидах опытных животных. Установлено, что ионол накапливается в печени живот-

ных в первые сутки после введения, достигая максимального значения через 6 час. К концу первых суток количество ионола уменьшается в 3 раза, оставаясь на этом уровне вплоть до 5 суток (рис. 2).

Следует отметить, что изменения в концентрации природных антиоксидантов и синтетических ингибиторов во времени имеют противоположный характер: в те сроки, когда уменьшается количество природных антиоксидантов, наблюдается накопление синтетических ингибиторов (рис. 1 и 2).

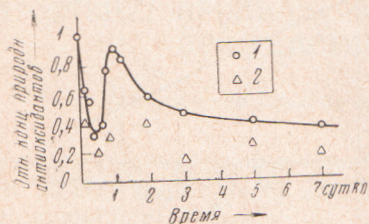


Рис. 1. Изменение в липидах в зависимости от времени после введения 4-метил-2,6-дитрет-бутилфенола в дозе 100 мг/кг относительного количества природных антиоксидантов (1) и токоферола (2)

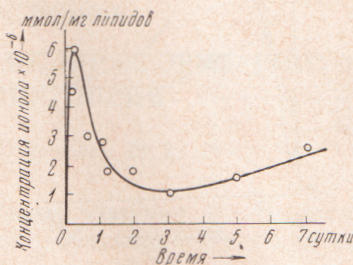


Рис. 2. Изменение концентрации ионола в печени животных в зависимости от времени после введения 4-метил-2,6-дитрет-бутилфенола в дозе 100 мг/кг

Полученные данные было интересно сопоставить с рассчитанным количеством ионола, присутствующим в липидах печени животных при условии равномерного его распределения в организме. При введении ионола в дозе 100 мг/кг в печени может содержаться 100 γ ионола. Липиды составляют около 6% от веса печени, т. е. в 1 мг липидов, согласно расчету, может содержаться 1,5 γ ионола. Нами опытным путем было установлено, что в 1,0 мг липидов содержится 1,3 γ ионола, т. е. с помощью нашего метода мы определяем почти 80% ионола, поступившего в печень при условии равномерного его распределения по органам животного.

Характер изменения количества синтетических ингибиторов и природных антиоксидантов позволяет объяснить изменение а.о.а. липидов во времени, а также наличие стадии пониженной антиокислительной активности при введении животным ионола в дозе 100 мг/кг.

Введение другого ингибитора радикальных процессов — хлоргидрата 6-метил-2-этил-3-оксипиридина в дозе 150 мг/кг также вызывает понижение количества природных антиоксидантов, которое, однако, значительно, быстрее нормализуется.

Совершенно другую картину изменений природных антиоксидантов мы получили при введении животным *n*-пропилового эфира галловой кислоты (ПГ).

При введении ПГ в дозе 120 мг/кг понижение количества природных антиоксидантов наблюдалось только для 3 час. К 8 час. количество природных антиоксидантов достигает нормы и к 1—2 суткам повышается до 140—160%. К 3 суткам оно возвращается к норме (рис. 3). Понижение количества природных антиоксидантов ниже нормы практически не наблюдалось для дозы ПГ 60 мг/кг. Через 3 часа после введения антиоксиданты составляют 90% от нормы. В течение 3 суток их количество все время превышает норму (рис. 3).

Таким образом, введение животным ПГ приводит к увеличению количества природных антиоксидантов в липидах.

Проведенные исследования показали, что синтетические ингибиторы активно влияют на концентрацию природных антиоксидантов, проявляя

тем самым двойственное действие. В ранние сроки ингибиторы всегда вызывают понижение концентрации природных антиоксидантов, причем это понижение пропорционально произведению антиокислительной активности ингибитора на его концентрацию  $\varepsilon C$  (рис. 4). Дальнейшая судьба природных антиоксидантов определяется тем, какой из ингибиторов будет расходоваться в первую очередь — синтетический или природный. А это зависит от концентрации синтетического ингибитора и от его способности

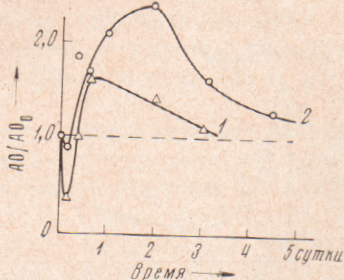


Рис. 3. Изменение относительного количества природных антиоксидантов в липидах в зависимости от времени после введения ПГ в дозе 60 (1) и 120 мг/кг (2)

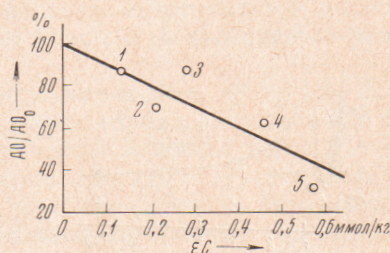


Рис. 4. Зависимость понижения уровня природных антиоксидантов от величины  $\varepsilon C$  введенных ингибиторов: ионола в дозах 50 (1) и 100 мг/кг (4), хлоргидрата 6-метил-2-этил-3-оксипиридина в дозе 150 мг/кг (2), ПГ в дозах 60 (3) и 120 мг/кг (5)

реагировать со свободными радикалами (величины константы  $k_7$ ). Возвращение к норме происходит быстрее для ингибитора с высокой константой  $k_7$ . Для ПГ наблюдалось не только возвращение к норме, но и превышение нормы.

Следовательно, характер влияния синтетических ингибиторов на метаболизм природных антиоксидантов объясняется конкурентными взаимоотношениями синтетических ингибиторов и природных антиоксидантов. Вероятность преимущественного расходования синтетического ингибитора определяется величиной произведения  $k_7 C$ , так же как это имеет место в опытах *in vitro*.

По-видимому, в организме существует система, регулирующая уровень а.о.а. независимо от того, произошло ли изменение а.о.а. за счет собственных природных антиоксидантов или введенных синтетических ингибиторов. Уменьшение количества природных антиоксидантов связано с тем, что на введение синтетических ингибиторов организм отвечает либо уменьшением синтеза собственных антиоксидантов, либо ускорением реакций его утилизации. Зная величину относительной антиокислительной активности ингибиторов  $\varepsilon$  и значения их констант  $k_7$ , можно заранее предсказать, каким образом будет изменяться концентрация природных антиоксидантов и общая антиокислительная активность липидов.

Авторы выражают благодарность акад. Н. М. Эмануэлю за постоянный интерес к работе.

Институт химической физики  
Академии наук СССР  
Москва

Поступило  
20 XI 1970

#### ЦИТИРОВАННАЯ ЛИТЕРАТУРА

- <sup>1</sup> Н. М. Эмануэль, В сборн. Первичные механизмы биологического действия ионизирующих излучений, Тр. МОИП, 7, «Наука», 1963, стр. 73. <sup>2</sup> Н. М. Эмануэль, В сборн. Пути синтеза и изучения противоопухолевых препаратов, М., 1963, стр. 22. <sup>3</sup> Е. Б. Бурлакова, Биофизика, 12, в. 1, 82 (1967). <sup>4</sup> Е. Б. Бурлакова, Н. М. Дзюба и др., ДАН, 163, № 5, 1278 (1965). <sup>5</sup> Е. Б. Бурлакова, С. А. Буробина и др., Биофизика, 16, 39 (1971). <sup>6</sup> Е. Б. Бурлакова, Н. Г. Храпова, Г. Т. Ядыкин, Биофизика, 16, 201 (1971).