

## ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ

© Н.М.СТОРОЖОК, И.В.КУТУЗОВА, 1995

УДК 615.31.547.295/.015.2:615.356/.07

Н.М.СТОРОЖОК, И.В.КУТУЗОВА

### ИНГИБИРУЮЩИЕ ЭФФЕКТЫ СМЕСЕЙ $\alpha$ -ТОКОФЕРОЛА С $\beta$ -КАРОТИНОМ ИЛИ ВИТАМИНОМ А ПРИ ОКИСЛЕНИИ ЭФИРОВ ПОЛИНЕНАСЫЩЕННЫХ ЖИРНЫХ КИСЛОТ

Тюменская медицинская академия

Нарушение регуляции процессов пероксидного окисления липидов (ПОЛ) играет важную роль в этиологии и патогенезе ряда заболеваний [2, 4, 5, 9]. В современной литературе широко обсуждается возможность использования биоантиоксидантов (АО) в терапии ишемической болезни и атеросклероза, бронхолегочных и других заболеваний [4, 5, 8, 9], исследуются перспективы сочетанного использования в клинике  $\alpha$ -токоферола ( $\alpha$ -ТФ) и витамина А или  $\beta$ -каротина [8]. Указанные соединения относятся к АО разных типов [6, 7, 11-13]. Они могут либо быть индифферентными друг к другу, либо взаимодействовать между собой, усиливая или подавляя ингибирующую способность друг друга. Эффекты совместного ингибирующего действия смесей  $\alpha$ -ТФ и витамина А или его предшественника  $\beta$ -каротина в настоящее время не изучены, хотя важность такого исследования для практической медицины очевидна.

В настоящей работе была оценена антиоксидантная активность (АОА) витамина А,  $\beta$ -каротина,  $\alpha$ -ТФ и их смесей при окислении высоконенасыщенного субстрата (биена).

**Методика.** В манометрических установках типа Варбурга изучали кинетику поглощения кислорода в присутствии  $\alpha$ -ТФ и  $\beta$ -каротина, витамина А и их смесей при инициированном окислении этиловых эфиров полиненасыщенных жирных кислот микробиологического происхождения. Используемый субстрат (условное название "биен") содержал до 30% этиларахидоната, до 24% этиллинолеата, до 42% этилолеата [1]. Иницирование процесса осуществлялось с помощью азобисизобутиронитрила в концентрации  $9 \cdot 10^{-3}$  М, скорость инициирования составляла  $5,3 \cdot 10^{-8}$  М  $\cdot$  с $^{-1}$ . Эксперименты выполняли при температуре  $60 \pm 0,2^\circ\text{C}$ .

В экспериментах оценивали значения периодов индукции окисления субстрата ( $\tau_1$  и  $\tau_2$  с индивидуальными соединениями и их смесью соответственно), простую сумму аддитивного действия АО ( $\Sigma\tau_i$ ). Периодом индукции считали перпендикуляр, опущенный из точки пересечения касательных к кинетической кривой, проведенной в точках перегиба.

Использовали биен, полученный в опытно-промышленных условиях производственного объединения "Белмедпрепараты" (Минск),  $\alpha$ -ТФ фирмы "Serva" (Германия),  $\beta$ -каротин, ретинола пальмитат, синтезированные в НПО "Витамины". Инициатор дважды перекристаллизовывали из абсолютных этанола и 2-пропанона, инертный к окислению растворитель хлорбензол очищали методом простой перегонки.

**Результаты и обсуждение.** Ранее неоднократно было показано, что кинетической особенностью действия  $\alpha$ -ТФ является нелинейность изменения ингибирующего эффекта от его концентрации в субстрате [2, 6]. Кривые зависимости индукции от концентрации ингибитора носили экстремальный характер. Нами как для  $\alpha$ -ТФ, так и для  $\beta$ -каротина и ретинола пальмитата были получены аналогичные зависимости (рис. 1, а). Изучение соединений в широком интервале концентраций —  $7 \cdot 10^{-7}$  —  $7 \cdot 10^{-3}$  М, не использованных в предыдущих работах [6, 11-13], позволило выяснить, что, несмотря на однотипность полученных кривых, области концентраций, при которых проявляется максимальный ингибирующий эффект, для каждого из исследуемых АО ограничены. Как следует из рис. 1, а, диапазон эффективности  $\beta$ -каротина характеризуется концентрациями  $1,0$ — $5,0 \cdot 10^{-5}$  М, максимум соответствует  $2,5 \cdot 10^{-5}$  М. В этой области концентраций действие  $\alpha$ -ТФ как АО незначительно. Его ингибирующая способность наиболее ярко проявляется в другом интервале концентраций —  $0,5$ — $5,0 \cdot 10^{-3}$  М, максимум соответствует концентрации  $2,5 \cdot 10^{-3}$  М. В области, в которой эффективен  $\alpha$ -ТФ, действие  $\beta$ -каротина сведено к минимуму (см. рис. 1, а). Витамин А имеет широкий размытый максимум в диапазоне  $2,0 \cdot 10^{-5}$  —  $2,0 \cdot 10^{-3}$  М (рис. 1, б). По абсолютной величине ингибирующие эффекты, сопоставленные между собой в точках экстремума кривых, также существенно отличаются и соотносятся в ряду  $\alpha$ -ТФ,  $\beta$ -каротин, витамин А как 5:3:1.

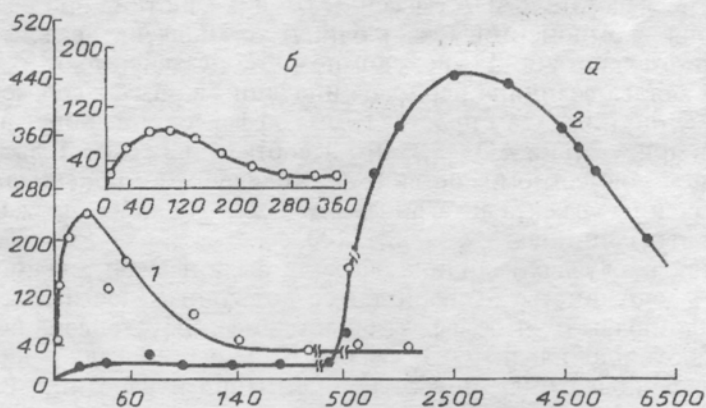


Рис. 1. Концентрационная зависимость изменения величины периодов индукции при окислении биена.

а — в присутствии  $\beta$ -каротина (1),  $\alpha$ -ТФ (2),  $T=60^\circ\text{C}$ ,  $W_i=5,3 \cdot 10^{-8}$  М · с $^{-1}$ , б — в присутствии ретинола пальмитата. По оси абсцисс — концентрация препарата,  $\cdot 10^6$  М, по оси ординат  $\tau$  индукции, мин

Таким образом, эффективность исследуемых природных ингибиторов максимально проявляется в определенных интервалах концентраций, им присущи кинетические особенности поведения слабых АО. На основании приведенных данных можно полагать, что каждый из компонентов дополняет действие других составляющих, обеспечивая эффективное функ-

Кинетические параметры окисления биополвнена в присутствии смесей  $\alpha$ -ТФ и  $\beta$ -каротина

С $\alpha$ -ТФ(I), М	С $\beta$ - каротина(II), М	Соотношение 1:11	Периоды индукции, мин					
			$\alpha$ -ТФ $\tau_i$	$\beta$ -каротина $\tau_j$	$\Sigma \tau_i$	$\tau_{\Sigma}$	$\Delta \tau = \Sigma \tau_i - \tau_{\Sigma}$	$\Delta \tau / \Sigma \tau_i, \%$
$1,25 \cdot 10^{-4}$	$1,4 \cdot 10^{-6}$	8930:1	52	30	82	70	12	14,6
$2,50 \cdot 10^{-3}$	$7,0 \cdot 10^{-6}$	360:1	440	52	492	475	17	3,5
$7,00 \cdot 10^{-6}$	$7,0 \cdot 10^{-7}$	250:1	55	36	91	67	28	30,0
$1,25 \cdot 10^{-3}$	$2,8 \cdot 10^{-6}$	45:1	370	246	616	310	306	50,0
$1,75 \cdot 10^{-4}$	$7,0 \cdot 10^{-6}$	25:1	55	52	107	97	10	9,0
$1,25 \cdot 10^{-4}$	$1,4 \cdot 10^{-4}$	1:1,1	52	75	127	76	51	67,0
$2,50 \cdot 10^{-4}$	$3,5 \cdot 10^{-4}$	1:1,4	84	70	154	148	6	4,0
$1,75 \cdot 10^{-4}$	$7,0 \cdot 10^{-4}$	1:4	55	40	95	50	45	47,0
$1,75 \cdot 10^{-5}$	$7,0 \cdot 10^{-5}$	1:4	55	246	291	58	233	86,5
$1,75 \cdot 10^{-5}$	$7,0 \cdot 10^{-5}$	1:40	26	246	272	29	243	90,0
$1,75 \cdot 10^{-6}$	$7,0 \cdot 10^{-4}$	1:400	41	41	82	24	57	70,5

ционирование неферментной антиоксидантной системы в целом.

С учетом изложенного представляло интерес изучить при окислении тех же полиненасыщенных субстратов кинетику совместного действия исследуемых АО в широком интервале концентраций смесей, включающих области максимальной эффективности каждого из компонентов. В результате исследования АОА смесей  $\alpha$ -ТФ и  $\beta$ -каротина при различных соотношениях компонентов (см. таблицу) установлена неаддитивность их сочетанного действия. Для всех композиций независимо от их количественного состава величина периодов индукции в опытах со смесью ( $\tau_{\Sigma}$ ) была неизменно ниже, чем простая сумма эффектов ингибирования, получаемых в присутствии АО ( $\Sigma \tau_i$ ). Это несоответствие свидетельствует об антагонизме в совместном действии АО. Количественно оценивали абсолютное значение эффекта антагонизма  $\Delta \tau = \Sigma \tau_i - \tau_{\Sigma}$  либо выражали его в относительных единицах —  $(\Delta \tau / \Sigma \tau_i) \cdot 100, \%$ .

В отдельных случаях величина эффекта была незначительной — 3,5–4,0%, но в большинстве экспериментов антагонизм достигал 50–90%. Можно было полагать, что эффективность смеси обусловлена количественными соотношениями АО. В связи с этим исследовали зависимость изменения периодов индукции от концентрации  $\beta$ -каротина. В разных сериях экспериментов готовили и окисляли смеси с постоянными добавками  $\alpha$ -ТФ и с различными количествами  $\beta$ -каротина, концентрации последнего изменялись в интервале  $1,5 \cdot 10^{-5} - 5,5 \cdot 10^{-3}$  М. Было проведено 5 таких серий, в которых стационарный уровень  $\alpha$ -ТФ отличался на порядок в диапазоне  $1,75 \cdot 10^{-6} - 2,50 \cdot 10^{-3}$  М. Полулогарифмические анаморфозы указанных кривых приведены на рис. 2, а. Видно, что зависимости носят экстремальный характер, максимум отмечается при добавках  $\beta$ -каротина  $7 \cdot 10^{-6}$  М, расположенных в том же интервале концентраций, в котором был эффективен и индивидуальный  $\beta$ -каротин (см. рис. 1, а). Из сопоставления периодов индукции соответствующих концентраций АО (см. рис. 1, а) и их смесей (см. рис. 2, а) следует, что совместное действие ингибиторов существенно уступает аддитивному эффекту составляющих.

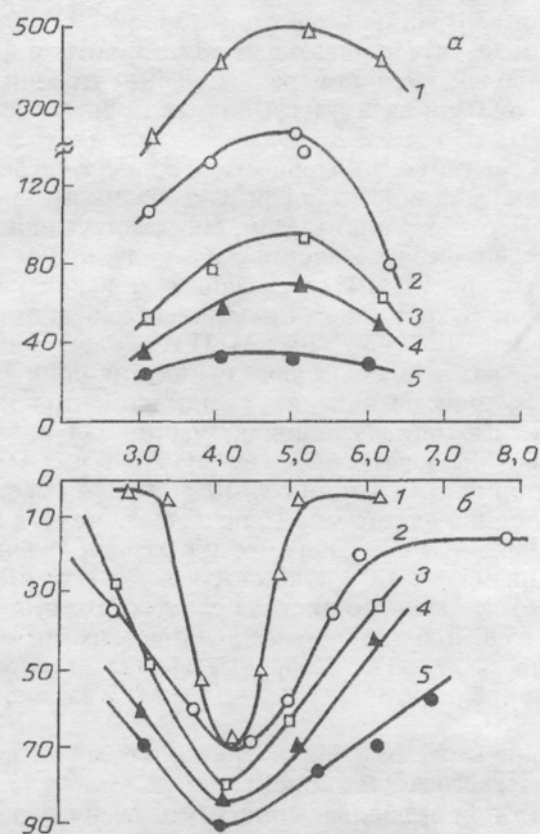


Рис. 2. *а* — полулогарифмическая анаморфоза зависимости изменения величины антагонизма при совместном действии  $\alpha$ -ТФ (I) и  $\beta$ -каротина (II) от концентрации II при содержании I, равном соответственно  $2,5 \cdot 10^{-3}$  М(1),  $2,5 \cdot 10^{-4}$  М(2),  $1,75 \cdot 10^{-5}$  М(3),  $1,75 \cdot 10^{-5}$  М(4),  $1,75 \cdot 10^{-6}$  М(5); по оси ординат —  $\tau_{\Sigma}$  индукция, мин, по оси абсцисс —  $\lg C$   $\beta$ -каротина. *б* — величина антагонизма в совместном действии смесей I и II от логарифма концентрации II. Обозначения те же, что и на рис. 2, *а*.

По оси ординат —  $\Delta\tau/\Sigma\tau_i \cdot 100$ , %, по оси абсцисс —  $\lg C$   $\beta$ -каротина

Важно было установить характер зависимостей, связывающих эффект антагонизма с концентрациями как  $\beta$ -каротина, так и  $\alpha$ -ТФ. Величина антагонизма, охарактеризованная разностью между потенциальным (аддитивным) ( $\Sigma\tau_i$ ) и экспериментально определяемым ингибирующим эффектом, показывала потерю эффективности в действии смеси. Закономерность изменений величины антагонизма от концентрации  $\beta$ -каротина при неизменных количествах второго АО приведена на рис. 2, б. Как видно, характер зависимостей антибатен кривым на рис. 2, а, выделяются области как низких ( $10^{-7} - 10^{-8}$  М), так и высоких ( $10^{-2}$  М) концентраций  $\beta$ -каротина, в которых роль антагонизма может быть относительно невелика, а в диапазоне  $10^{-6} - 10^{-3}$  М отмечается существенное пони-



жение эффективности смесей, т.е. существует определенная концентрационная "яма". Для семейства кривых отмечается точка экстремума, соответствующая концентрации  $\beta$ -каротина, равной  $1,25 \cdot 10^{-6}$  М. При этом площадь под кривой, ограничивающей область антагонизма, ширина и глубина "ямы" уменьшаются по мере роста концентрации  $\alpha$ -ТФ в смеси. Для композиций  $\alpha$ -ТФ и витамина А полуфены аналогичные зависимости.

Подобным же образом охарактеризовали совместное действие смесей, представленных неизменной добавкой  $\beta$ -каротина и различными количествами  $\alpha$ -ТФ. Исследовали диапазон, соответствующий области положительной корреляционной зависимости между антиоксидантным эффектом и концентрацией  $\alpha$ -ТФ (восходящая ветвь кривой  $\alpha$ -ТФ на рис. 1, а). Концентрация  $\beta$ -каротина в 4 различных сериях отличалась на порядок, возрастая от  $7 \cdot 10^{-7}$  до  $7 \cdot 10^{-4}$  М. Полулогарифмические анаморфозы кривых, связывающих величину индукционного периода с концентрацией  $\alpha$ -ТФ, приведены на рис. 3, а). Видно, что кривые воспроизводят форму зависимостей для индивидуального  $\alpha$ -ТФ, однако с ростом количества  $\beta$ -каротина сочетанное действие АО все более уменьшается. Так, например, при концентрации с  $7 \cdot 10^{-4}$  М АОА смеси более чем в 2 раза уступает действию одного  $\alpha$ -ТФ, представленного в данной композиции в той же концентрации. Для смесей с разным уровнем  $\beta$ -каротина величина антагонизма связана с концентрацией  $\alpha$ -ТФ линейной зависимостью (рис. 3, б). Из данного рисунка следует, что существует соотношение компонентов, при котором их действие практически аддитивно (антагонизм не превышает 4%). Подобные эффекты воспроизводятся при низком содержании  $\beta$ -каротина ( $10^{-7}$  —  $10^{-6}$  М) и высоком уровне  $\alpha$ -ТФ ( $2,5 \cdot 10^{-3}$  М).

Указанные концентрации в опытах порознь соответствуют максимуму эффективности каждого АО (см. рис. 1, а).

Таким образом, при различных концентрациях и соотношениях  $\alpha$ -ТФ и  $\beta$ -каротина или витамина А их совместное действие неаддитивно, в процессе окислительных превращений липидов изучаемые соединения действуют как антагонисты.

Анализ биохимических показателей обеспеченности витаминами, представленных в литературе [10], показывает, что в норме уровень  $\alpha$ -ТФ ( $2,5 \cdot 10^{-3}$  М в общих липидах биомембран) соответствует диапазону его максимальной эффективности, а уровень  $\beta$ -каротина и витамина А ( $2,5 \cdot 10^{-4}$  М в общих липидах биомембран) примерно на порядок выше, чем те количества, в которых он в данной системе окисления был наиболее эффективен. Указанные уровни обеспеченности витаминами с учетом общетеоретических положений данной работы позволяют предположить возможность взаимодействия изучаемых соединений в процессе окисления липидов мембран. Однако необходимо отметить, что конкретные количественные соотношения между компонентами, обеспечивающие максимальную эффективность смеси, являются, по всей вероятности, интегральными показателями и служат выражением определенных характеристик всей системы окисления в целом: могут зависеть от интенсивности процесса, состава фосфолипидного окружения и других факторов.

Можно полагать, что обнаруженные в работе эффекты носят регуля-

торный характер. Оба соединения проявляют антиоксидантное действие, поэтому при недостатке в организме одного из них ингибирующая способность системы дополняется активностью другого компонента. Снижение уровня витамина А и  $\beta$ -каротина (примерно до  $2,5 \cdot 10^{-5}$  М) на фоне Е-витаминной недостаточности может приводить к резкому увеличению АОА действующих веществ и поддерживать емкость антиоксидантной системы. Эффекты антагонизма в совместном действии  $\alpha$ -ТФ и  $\beta$ -каротина или витамина А также могут способствовать поддержанию стационарного уровня ПОЛ. Так, при введении в организм высоких доз одного из АО за счет антагонизма с другими составляющими их эффективное антиоксидантное действие существенно уменьшится по сравнению с потенциальным аддитивным эффектом, что предотвратит возможность избыточного торможения ПОЛ. Постепенно по причине антагонизма между АО снизятся действующие концентрации ингибиторов и система возвратится к определенному равновесию. Следовательно, регулирование ингибирующих свойств системы за счет количественных соотношений между компонентами может обеспечивать антиоксидантный гомеостаз организма, нарушение которого, как известно, сопровождается течением ряда патологических состояний [4].

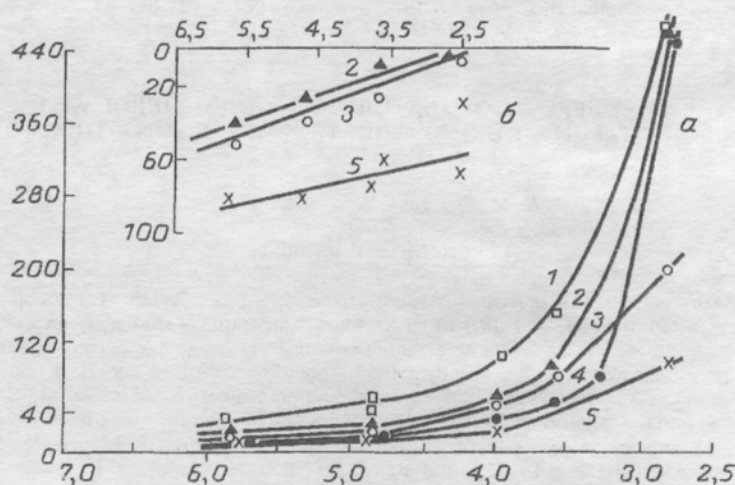


Рис. 3. а — полулогарифмическая анаморфоза кривой изменения периодов индукции от концентрации  $\alpha$ -ТФ (I) в смеси при неизменных концентрациях  $\beta$ -каротина (II): в отсутствие II (1),  $7 \cdot 10^{-4}$  М (2),  $7 \cdot 10^{-5}$  М (3),  $7 \cdot 10^{-6}$  М (4),  $7 \cdot 10^{-7}$  М (5); по оси ординат —  $\tau_{\Sigma}$  индукции, мин, по оси абсцисс —  $-\lg C$  токоферола/. б — изменение величины антагонизма от логарифма концентрации I при неизменных концентрациях II. Обозначения те же, что и на рис. 3, а. По оси ординат — % антагонизма, по оси абсцисс —  $-\lg C$  токоферола/.

Полученные результаты позволяют заключить, что свойства липидов не складываются непосредственно из свойств отдельных составляющих, межмолекулярные взаимодействия компонентов придают липидной системе как целому качественно новые свойства.

Механизм межмолекулярных взаимодействий  $\alpha$ -ТФ с  $\beta$ -каротином или витамином А, способный обосновать особенности кинетики окисления полиенов в присутствии их бинарных смесей, требует специальных исследований и является предметом дальнейшей работы.

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Абдуллабекова Р.М., Бабанова Н.К., Патокина Е.В. и др. // Фармация. — 1988. — N 1. — С. 38-41.
2. Бурлакова Е.Б., Храпова Н.Г. // Успехи химии. — 1985. — Т. 54. — С. 1540-1553.
3. Давыдова Г.В., Плечитый А.М., Фомина В.Г. // Клиническая витаминология. — М., 1991. — С. 326-327.
4. Кислородные радикалы в химии и биологии. — Рига, 1989.
5. Конь И.Я., Горгошидзе Л.Ш. // Бюл. exper. биол. — 1985. — N 4. — С. 428-429.
6. Кухтина Е.Н., Бурлакова Е.Б., Храпова Н.Г. и др. // Докл. АН СССР. — 1983. — Т. 272, N 3. — С. 729-732.
7. Наумов В.В., Храпова Н.Г. // Биофизика. — 1985. — Т. 30, N 1. — С. 5-9.
8. Сергеев А.В., Ананьев В.С., Атониязов М.К. // Клиническая витаминология. — М., 1991. — С. 108-110.
9. Сергеев А.В., Коростелев С.А., Шерепешева Н.И. // Вопр. мед. химии. — 1992. — N 4. — С. 42-45.
10. Якушина Л.М., Бекетова И.А., Бейзер Е.Д., Харитончик Л.А. // Вопр. питания. — 1993. — N 1. — С. 43-47.
11. Burton G.W., Ingold K.U. // Science. — 1984. — Vol. 224, N 91842 — P. 561-573.
12. Krinski J. // Free Radical Biol. Med. — 1989. — Vol. 7, N 6. — P. 617-635.
13. Terao J. // Lipids. — 1989. — Vol. 24, N 7. — P. 659-661.

Поступила

#### INHIBITORY EFFECTS OF MIXTURES OF $\alpha$ -TOCOPHEROL WITH $\beta$ -CAROTENE OR VITAMIN A DURING OXIDATION OF POLYUNSATURATED FATTY ACID ESTERS

N. M. Storozhok, I. V. Kutuzova

Tyumen Medical Institute

The inhibitory activities of individual natural antioxidants (AOs), such as  $\alpha$ -tocopherol (I),  $\beta$ -carotene (II), vitamin A(III) and their mixtures were comparatively studied when oxidation of microbial polyunsaturated fatty acid esters that predominately contain ethyl arachidonate was initiated; effects of antagonism were found in the combined action of I and II, I and III. The magnitude of antagonism effect was estimated from the difference between the total additive effects of individual AOs and the experimentally determined effects of their mixture. There is a U-dependence of changes in the antagonism values upon II concentrations at steady-state I levels. It was found that in the range of low ( $10^{-8}$  to  $10^{-7}$  M) and high ( $10^{-2}$  M) concentrations of II, the involvement of antagonism might be relatively low (3,5-4,0%); in the range of  $10^{-6}$  to  $10^{-5}$  M, there is a concentration "hole" whose peak ( $1,25 \cdot 10^{-6}$  M) is as high as 90%. As I levels elevated, antagonism in the mixture decreased. It is suggested that the intermolecular interactions of natural AO during oxidation represent a mechanism for the body's antioxidative homeostasis.