

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ
УДК-546.23:577.158

ИЗУЧЕНИЕ ВЛИЯНИЯ СЕЛЕНА IN VITRO НА ОБРАЗОВАНИЕ АКТИВНЫХ ФОРМ КИСЛОРОДА И ПЕРЕКИСНОЕ ОКИСЛЕНИЕ ЛИПИДОВ В МИКРОСОМАХ ПЕЧЕНИ КРЫС

Н.В. ЛАШНЕВА, Е. КАРГЕ, Ю. КНЕЛЛС, В. КЛИНГЕР, Ф.-К. ШПЛИНТЕР,
В.А. ТУТЕЛЬЯН

Институт питания РАМН, Москва, Институт фармакологии и токсикологии Йенского Университета им. Фридриха Шиллера, Германия

Изучено влияние *in vitro* селенита натрия на цитохром Р450-зависимое образование активных форм кислорода и ферментное перекисное окисление липидов (ПОЛ) в микросомах печени крыс. Генерацию активных форм кислорода в микросомах оценивали по интенсивности хемиллюминесценции, усиливаемой люминолом, или люцигенином, и продукции перекиси водорода в процессе окисления восстановленного НАДФ. Об активности ПОЛ судили по скорости НАДФН/Fe-зависимого накопления малонового диальдегида по реакции с тиобарбитуровой кислотой.

Селенит натрия в концентрациях 10^{-6} – 10^{-3} М не вызывал существенных изменений скорости иницируемого НАДФН/Fe образования активных форм кислорода ($O_2^{\cdot-}$, OH^{\cdot} , H_2O_2), а также скорости НАДФН-зависимого ПОЛ. Лишь при высокой, 10^{-3} М, концентрации селенита продукция перекиси водорода в микросомах достоверно уменьшалась. Полученные результаты свидетельствуют о том, что селенит натрия в концентрациях, близких к физиологическим, не оказывает существенного влияния на генерацию активных форм кислорода микросомальным цитохромом Р450 и скорость ферментного ПОЛ в микросомах печени крыс.

Эссенциальный микроэлемент селен играет важную роль в защите организма от токсического действия активных форм кислорода и липопероксидов. Как компонент глутатионпероксидазы он участвует в детоксикации (восстановлении до воды) перекиси водорода, предотвращая тем самым реакции ее разложения, ведущие к образованию

чрезвычайно реакционноспособного гидроксильного радикала — активного инициатора перекисного окисления липидов (ПОЛ) [1, 2, 3]. Именно антиоксидантной активностью объясняются защитные эффекты микроэлемента при недостаточности витамина Е, а также при воздействии ксенобиотиков и других факторов, стимулирующих процессы свободно-радикального окисления липидов [1, 2, 4, 5, 6, 7, 8]. Показана, например, способность селена ослаблять или предотвращать ПОЛ, индуцируемое четыреххлористым углеродом [9], железом [10], хлористой медью [11], эндотоксином [7]. Отмечена близкая эффективность селена и витамина Е как пищевых антиоксидантов [12]. Антиоксидантная активность селена продемонстрирована и в опытах *in vitro* [2, 12]. В то же время имеются сообщения о прооксидантных свойствах соединений селена, в частности, о способности селенита натрия генерировать реактивные формы кислорода при реакции с тиолами в бесклеточной системе и в присутствии клеток опухоли молочной железы [13], а также о его стимулирующем действии на ПОЛ *in vivo* и *in vitro* [14, 15, 16, 17].

Как известно, основным местом генерации активных форм кислорода в клетках печени является микросомальная монооксигеназная система, содержащая суперсемейство цитохромов P450 [18, 19]. Осуществляемый системой цитохрома P450 окислительный метаболизм липофильных соединений может сопровождаться образованием не только реакционно-способных производных этих соединений, но и продуктов неполного восстановления кислорода (таких как $O_2^{\cdot-}$, H_2O_2 , OH^{\cdot}), образующихся в результате разобщения монооксигеназных реакций. В отсутствие субстрата реактивные метаболиты кислорода продуцируются вследствие оксидазной функции цитохрома P450 [18, 19, 20]. Освобождающиеся при распаде окси- и перокси-комплексов цитохрома P450 активные формы кислорода способны вызывать инактивацию микросомальных ферментов (в первую очередь, самого цитохрома P450) и инициировать реакции перекисного окисления мембранных липидов, что может приводить к дезинтеграции мембран и другим неблагоприятным последствиям, вплоть до гибели клетки.

Целью настоящей работы явилось изучение влияния селенита натрия *in vitro* на цитохром P-450-зависимое образование активных форм кислорода (оцениваемое по интенсивности хемилюминесценции, усиливаемой люминолом или люцигенином, а также продукции перекиси водорода) и перекисное окисление липидов в микросомах печени крыс.

Материалы и методы. Опыты выполнены на микросомах, выделенных из печени крыс-самцов линии Вистар (возраст — 60 дней), содержащихся в пластиковых клетках и получавших стандартный брикетированный корм (Altromin 1316) и воду *ad libitum*. Крыс декапитировали под легким эфирным наркозом. Печень извлекали и гомогенизировали в 0,01 М Na/Na фосфатном буфере pH 7,4 (1:3, масса/объем). Микросомы получали путем осаждения в 25 мМ $MgCl_2$ по методу Silman et al. [21] при 4°C. Выделенные микросомы промывали, ресуспендировали в фосфатном буфере и хранили при -20°C не более 2-х недель.

Содержание белка в микросомах определяли модифицированным биуретовым методом [22].

Интенсивность НАДФН/Fe-зависимой хемилюминесценции (ХЛ) измеряли на хемилюминометре Berthold-AutoLumat LB 953 с использованием в качестве усилителей люминола или люцигенина [23, 24]. Инкубационная смесь содержала микросомы (1 мг белка/мл), железо, люминол или люцигенин и 0,1 М фосфатный буфер pH 7,4. Реакцию восстановления молекулярного кислорода инициировали добавлением НАДФН. Эмиссию фотонов измеряли через 3,5 мин. и выражали в относительных световых единицах (ОСЕ) в расчете на 1 мг белка за 1 мин.

НАДФН-зависимое образование перекиси водорода в микросомах определяли в присутствии азиды натрия для блокирования активности каталазы [20] и пероксидазной активности цитохрома P450 [23, 25].

Скорость ферментного ПОЛ определяли по образованию малонового диальдегида (МДА) с помощью теста с тиобарбитуровой кислотой [23, 26]. Концентрацию МДА в пробах рассчитывали с использованием коэффициента молярной экстинкции $1,56 \cdot 10^5 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$. Скорость образования H_2O_2 и МДА в микросомах печени выражали в нмолях в 1 мин на 1 мг белка.

Действие селенита натрия исследовали при добавлении его в опытные пробы в возрастающих концентрациях: от 10^{-6} до 10^{-3} М (в контрольные пробы добавляли равные

объемы растворителя — фосфатного буфера).

Для выяснения вероятности связывания селена с цитохромом Р450 изучали спектральные изменения суспензии микросом (1 мг белка/мл, 0,1 М фосфатный буфер, рН 7,4) после добавления селенита натрия в концентрации 10^{-3} М, которые регистрировали на Sresord M 40 по дифференциальной схеме (от 350 до 500 нм). В качестве положительного контроля записывали спектры связывания двух модельных субстратов — гексобарбитала и анилина [27].

Полученные результаты обрабатывали методом вариационной статистики с использованием *t* критерия Стьюдента.

Результаты и обсуждение. При изучении спектрального взаимодействия селенита натрия с микросомами не удалось выявить образования спектрально регистрируемых комплексов микроэлемента с цитохромом Р450, что может указывать на то, что он не связывается с железом гема или с апоферментной частью гемопротеида.

Интенсивность НАДФН/Fe-иницируемой хемилюминесценции микросом в присутствии 10^{-6} — 10^{-3} М селенита натрия существенно не изменялась в случае использования в качестве усилителя как люминола (рис. 1); так и люцигенина (рис. 2). Поскольку реакции люминол- и люцигенин-зависимой хемилюминесценции являются весьма чувствительными показателями образования супероксидного анион-радикала и гидроксильного радикала в биологических системах [5, 19], можно полагать, что селенит не оказывал существенного влияния на генерацию данных реактивных форм кислорода цитохромом Р450 в ходе окисления в микросомах восстановленного НАДФ.

Скорость НАДФН-зависимого образования H_2O_2 в микросомах печени крыс после добавления селенита натрия в концентрациях 10^{-6} — 10^{-4} М практически не изменялась. В то же время при концентрации 10^{-3} М она достоверно снижалась до 58% от контроля (рис. 3).

Как видно из рис. 4, активность ферментного, НАДФН-зависимого, ПОЛ при концентрации селенита натрия, равной 2 мкМ, несколько возрастала (скорость образования в микросомах конечного продукта ПОЛ, МДА, повышалась на 29% по сравнению с контролем, $p < 0,05$), однако при более высоких концентрациях (вплоть до 2000 мкМ) достоверных изменений скорости ПОЛ не наблюдалось. Обращает на себя внимание, что некоторое усиление ферментного ПОЛ имело место лишь при минимальной концентрации селенита. Как отмечалось выше, никаких изменений скорости образования

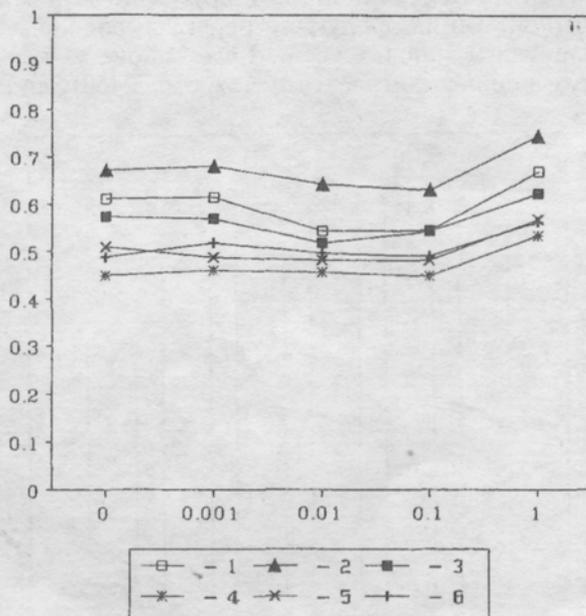


Рис. 1. Люминолзависимая хемилюминесценция микросом печени крыс в присутствии различных концентраций селенита натрия.

По оси абсцисс — концентрация селенита натрия, мМ; по оси ординат — интенсивность хемилюминесценции, ОСЕ (Е/мг/мг белка), 1—6 — номера препаратов микросом.

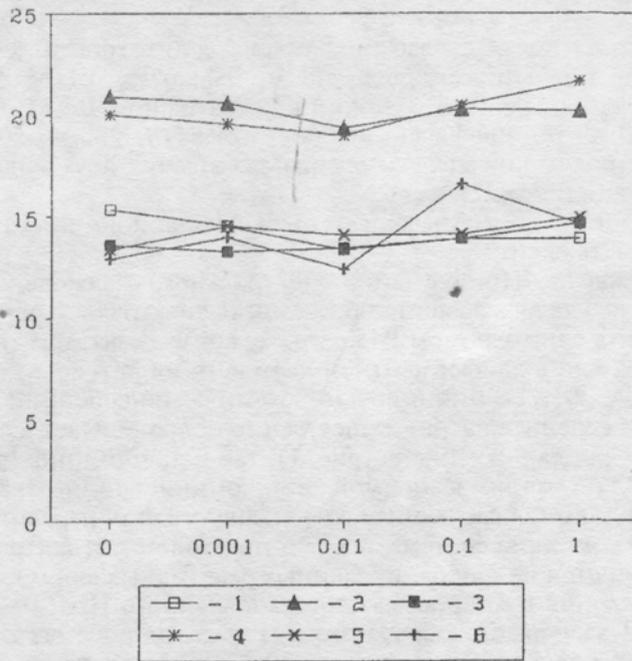


Рис. 2. Люцигензависимая хемилюминесценция микросом печени крыс в присутствии различных концентраций селенита натрия. Средние ($M \pm m$) данные из 6 опытов. По оси абсцисс — концентрация селенита натрия, мМ; по оси ординат — интенсивность хемилюминесценции, ОСЕ (Е/мг/мг белка), 1—6 — номера препаратов микросом.

активных форм кислорода, в частности, H_2O_2 либо $OH\cdot$ радикала, способных непосредственно инициировать ПОЛ, при данной концентрации селенита обнаружено не было. С другой стороны, снижение скорости образования H_2O_2 при высокой, миллимолярной, концентрации селенита не сопровождалось какими-либо изменениями скорости ПОЛ. Следует подчеркнуть, что случаи отсутствия параллелизма в изменениях указанных показателей были также отмечены и в других исследованиях [23].

Механизм выявленного снижения продукции перекиси водорода под влиянием высокой концентрации селенита не вполне ясен. В его основе может быть ингибирование прямого (при распаде пероксикомплекса цитохрома P450), либо непрямого (дис-

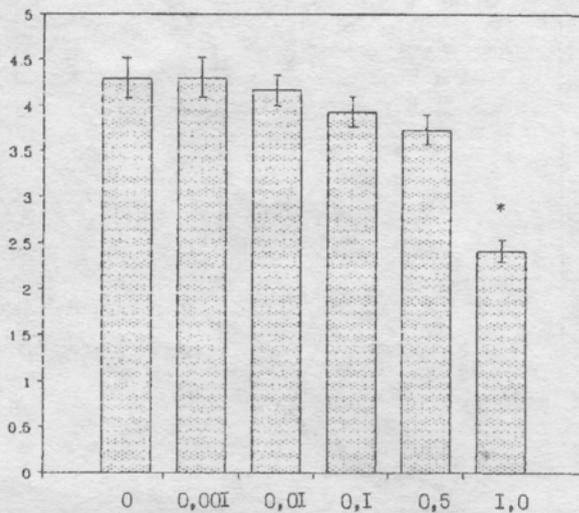


Рис. 3. Скорость образования перекиси водорода в микросомах печени крыс в присутствии различных концентраций селенита натрия. Средние данные ($M \pm m$) из 6 опытов. По оси абсцисс — концентрация селенита натрия, мМ; по оси ординат — H_2O_2 , нмоль/мин/мг белка. Звездочка — $p < 0,05$ по сравнению с контролем.

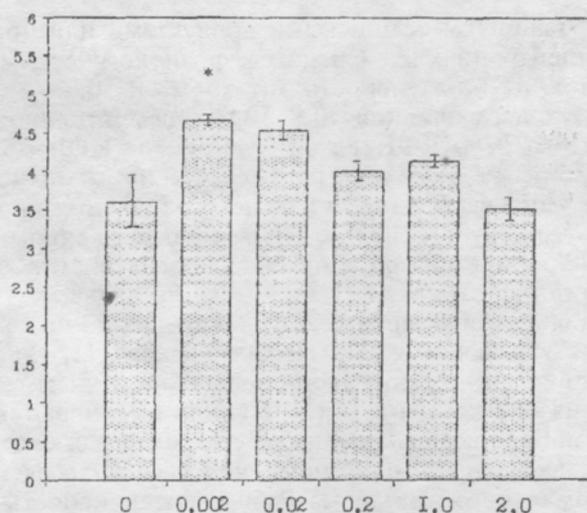


Рис. 4. Скорость NADPH/Fe-зависимого перекисного окисления липидов в микросомах печени крыс в присутствии различных концентраций селенита натрия.

Средние данные ($M \pm m$) из 6 опытов.

По оси абсцисс — концентрация селенита натрия, мМ; по оси ординат — МДА, нмоль/мин/мг белка. Звездочка — $p < 0,05$ по сравнению с контролем.

мутация супероксидного радикала) путей ее образования в микросомах печени. Судя по отсутствию изменений интенсивности как люминол-, так и люцигенин-зависимой хемилюминесценции, ингибирование генерации H_2O_2 в активном центре цитохрома Р450 маловероятно. В то же время нельзя исключить возможное участие в образовании H_2O_2 другого компонента электронотранспортной системы микросом, НАДФН-цитохром Р450 редуктазы [28] и вероятность ингибирования ее активности селенитом. Что касается влияния каталазы, то оно исключается, так как реакция проводилась в присутствии специфического ингибитора — азида натрия. Предположение о возможном неферментном разрушении H_2O_2 при высокой концентрации селенита натрия не имеет основания, так как данные о прямом взаимодействии соединений селена с перекисью водорода отсутствуют, подобная реакция в литературе не описана.

Таким образом, селенит натрия в концентрациях 10^{-6} — 10^{-4} М не вызывал изменений скорости цитохром Р450-зависимой генерации $O_2^{\cdot-}$, H_2O_2 и OH^{\cdot} радикала и только в 10^{-3} М концентрации достоверно ингибировал продукцию перекиси водорода в микросомах печени крыс.

Интересно, что в исследованиях, посвященных изучению влияния селена на монооксигеназную функцию цитохрома Р450, нами было обнаружено, что в диапазоне концентраций 10^{-4} — 10^{-2} М селенит натрия оказывает дозозависимое ингибирующее действие на О-деэтилирование 7-этоксикумарина в микросомах, выделенных из печени крыс и мышей. При концентрации селенита 1 мМ скорость окисления 7-этоксикумарина в микросомах печени крыс-самок снижалась с $1,13 \pm 0,08$ в контроле до $0,75 \pm 0,05$ нмоль/мин на 1 мг белка, а при концентрации 10 мМ — до $0,20 \pm 0,02$ нмоль/мин на 1 мг белка, или на 32% и 82% соответственно ($p < 0,05$). Эти данные свидетельствуют о способности селенита натрия в миллимолярных концентрациях ингибировать также и реакции монооксигеназного типа, катализируемые цитохромом Р450. Об ингибирующем действии селенита на некоторые монооксигеназные активности сообщают и другие авторы [2, 29]. Примечательно, что, по данным Marshall и соавторов [29], ингибирование селенитом натрия N-окисления 2-ацетиламинофлуорена в микросомах печени крыс сопровождается ускорением другого пути окисления ксенобиотика (с образованием 3-ОН производного), причем ощутимые изменения скорости обеих реакций наблюдаются при довольно высоких (около 10^{-3} — 10^{-2} М) концентрациях селенита.

Отмечая способность селенита натрия в миллимолярных концентрациях влиять на оксидазную и монооксигеназную функции микросомального цитохрома Р450, следует заметить, что эффекты селенита в концентрациях 10^{-3} М и выше вряд ли могут иметь практическое значение, так как данные концентрации значительно превышают таковые

при поступлении микроэлемента с пищевыми продуктами или при его применении в лечебных целях. В концентрациях же, близких к физиологическим, селенит не оказывает существенного влияния на активность цитохрома P450.

Отсутствие ингибирующего влияния 10^{-6} – 10^{-4} М селенита натрия на образование активных форм кислорода и НАДФН/Fe-стимулируемое ПОЛ может служить свидетельством того, что селенит не оказывает непосредственного антиоксидантного действия и не влияет на реакции свободнорадикального окисления липидов в микросомах печени крыс. Это соответствует общепринятым представлениям, согласно которым антиоксидантная активность селена обусловлена его действием в качестве компонента селензависимой глутатионпероксидазы [1, 2].

Как известно, для селена характерен весьма узкий диапазон между дозой суточной потребности и дозами, вызывающими токсические эффекты [1, 2, 17], причем механизм его токсического действия до сих пор окончательно не выяснен. Поскольку селенит натрия в широком диапазоне концентраций не влиял на генерацию реактивных форм кислорода и ферментное ПОЛ во фракции микросом, можно высказать предположение, что токсические эффекты селена, по-видимому, не связаны с воздействием на оксидазную функцию микросомального цитохрома P450 и интенсивность ферментного перекисного окисления липидов в печени.

ЛИТЕРАТУРА

1. Селен. Гигиенические критерии состояния окружающей среды 58. ВОЗ. Женева. — 1989. — 270 с.
2. Combs G.F., Combs S.B. The role of selenium in nutrition. — Acad. Press. Orlando, 1986. — 532 p.
3. Kivits G.A.A., Ganguli-Swarttouw M.A.C.R., Christ E. // J. Biochim. Biophys. Acta. — 1982. — Vol. 719, N 2. — P. 329–333.
4. Hafeman D.G., Hoekstra W.G. // Ibid. — P. 666–672.
5. Ip C. // Annals Clin. Res. — 1986. — Vol. 18, N 1. — P. 22 – 29.
6. Neve J. // Experientia. — 1991. — Vol. 47, N 2. — P. 187–193.
7. Sword J.T., Pope A.L., Hoekstra W.G. // J. Nutr. — 1991. — Vol. 121, N 2. — P. 251–257.
8. Wendel A., Feuerstein S. // Biochem. Pharmac. — 1981. — Vol. 30, N 18. — P. 2513–2520.
9. Hafeman D.G., Hoekstra W.G. // J. Nutr. — 1977. Vol. 107, N 4. — P. 656–665.
10. Dougherty J.J., Croft W.A., Hoekstra W.G. // J. Nutr. — 1981. — Vol. 111, N.10. — P. 1784–1796.
11. Dougherty J.J., Hoekstra W.G. // Proc. Soc. Exp. Biol. Med. — 1982. — Vol. 169, N 2. — P. 201–208.
12. Zamora R., Hidalgo J., Tappel A.L. // J. Nutr. — 1991. — Vol. 121, N 1. — P. 50–56.
13. Yan L., Spallholz J.E. // Biochem. Pharmacol. — 1993. — Vol. 45, N. 2. — P. 429–437.
14. Bunyan J., Green J., Edwin E.E., Diplock A.T. // Biochem. J. — 1960. — Vol. 77, N 1. — P. 47–51.
15. Csallany A.S., Su L.-C., Menken B.Z. // J. Nutr. — 1984. — Vol. 114, N 11. — P. 1582–1587.
16. Dougherty J.J., Hoekstra W.G. // Ibid. — P. 209–215.
17. Witting L.A., Horwitt M.K. // J. Nutr. — 1964. — Vol. 84. — P. 351–360.
18. Archakov A.I., Zhukov A.A. // Basis and mechanisms of regulation of cytochrome P450. /Eds. Ruckpaul K., Rein H. Akademie-Verlag. Berlin, 1989. — Vol. 1. — P. 151–175.
19. Klinger W. // Molecular Aspects of Oxidative Drug Metabolizing Enzymes. / Eds. Arinc E., Schenkman J.B., Hodgson E. NATO ASI Series. Springer-Verlag. Berlin – Heidelberg, 1995. — Vol. H 90. — P. 515–532.
20. Karuzina I.I., Archakov A.I. // Free Radic. Biol. Med. — 1994. — Vol. 170, N 6. — P. 557–567.
21. Silman N., Artman M., Engelberg H. // Biochem. Biophys. Acta. — 1965. — Vol. 103, N 2. — P. 231–240.
22. Klinger W., Muller D. // Z. Versuchstierk. — 1974. — Vol. 16. — P. 146–153.
23. Barth A., Kaiser N., Loffler U., Sorgens H., Klinger // Exp. Toxicol. Pathol. 1992. — Vol. 44. — P. 399–405.
24. Muller-Peddinchaus R., Wurl M. // Biochem. Pharmacol. — 1987. — Vol. 36, N 9. — P. 1125–1132.
25. Hildebrandt A.G., Roots I., Tjoe M. et al. // Methods Enzymol. — 1978. Vol. 52. — P. 342–350.
26. Buege J.K.A., Aust S.D. / Methods Enzymol. — 1978. Vol. 52. — P. 302–350.
27. Schenkman J.B., Remmer H., Estabrook R.W. // Mol. Pharmacol. — 1967. — Vol. 3, N 1. — P. 113–123.
28. Kuthan H., Ullrich V. // Europ. j. Biochem. — 1982. — Vol. 126, N 3. — P. 585–588.

IN VITRO STUDY OF SELEN INFLUENCE ON THE FORMATION OF ACTIVE OXYGEN SPECIES AND LIPID PEROXIDATION IN RAT LIVER MICROSOMES

Lashneva N.V., Karge E., Knells U., Klinger V., Splinter F.-K., O.V., Tutel'an V.A.

In vitro influence of sodium selenite on cytochrome P-450-dependent formation of active oxygen species on lipid peroxidation (LPO) in rat liver microsomes was studied. Sodium selenite (10^{-6} – 10^{-3} M) did not influence rates of NADPH/Fe-induced formation of active oxygen species ($O_2^{\cdot-}$, OH^{\cdot} , H_2O_2) and NADPH-dependent LPO. Only at 10^{-3} M selenite caused significant decrease in production of hydrogen peroxide in microsomes. Data obtained suggest that sodium selenite at physiological concentrations does not influence formation of active oxygen species by cytochrome P-450 and the rate of enzymatic LPO in rat liver microsomes.