

## ВЛИЯНИЕ ИОНОЛА НА МЕТАБОЛИЗМ СУПЕРОКСИДНЫХ РАДИКАЛОВ В ПЕЧЕНИ МЫШЕЙ

Л.С. ВАРТАНЯН, С.М. ГУРЕВИЧ

Институт биохимической физики им. Н.М. Эмануэля РАН 117977 Москва, ул. Косыгина, 4. Факс: (095) 137-4101. Эл. почта: chembio@glasnet.ru

Изучено влияние ионола (100 мг / кг) на скорость генерирования супероксидных радикалов (V) и активность антиоксидантных ферментов (А): CuZn- и Mn-СОД, глутатионпероксидазы (ГП), глутатионтрансферазы (GST) в различных компартментах клеток печени мышей. Ионол вызывает достоверные и синхронные изменения в активности всех изученных ферментов: CuZn-СОД в цитозоле печени и в крови, ГП и GST. На первые сутки происходит рост их активности в 1,5 раза, к третьим суткам активность нормализуется, что свидетельствует о сохранении регуляторной связи в цепи антиоксидантных ферментов на участке СОД-ГП в цитозоле. Активность Mn-СОД в митохондриях меняется антибатно по отношению к цитозольной СОД: к первым суткам падает в два раза и остается на пониженном уровне в течение всего времени наблюдения.

Величина V в микросомах находится на пониженном уровне. В СМЧ V через сутки после введения ионола повышается незначительно, однако, вследствие существенного снижения активности Mn-СОД на этот срок отношение V/A, характеризующее уровень супероксидных радикалов в данной структуре, увеличивается в 3 раза; в ядрах уже в первые часы после введения ионола V возрастает в 4-6 раз. Полученные результаты показывают, что высокие дозы ионола подавляют ферментную антиоксидантную систему митохондрий, вызывают резкое увеличение радикалообразования в ядрах и снижают функционирование цепи переноса электронов в микросомах. Обнаруженные нарушения носят кратковременный характер и нормализуются через 3 суток после введения препарата. Токсические эффекты ионола могут быть связаны с действием продуктов его окислительной модификации в организме.

**Ключевые слова:** ионол, супероксидные радикалы, антиоксидантные ферменты, субклеточные органеллы печени мышей

**ВВЕДЕНИЕ.** В обменных процессах всех организмов, утилизирующих кислород, образуются активные формы кислорода (кислородные радикалы и перекиси). Их уровень в организме регулируется как ферментативно, с помощью антиоксидантных ферментов, так и с помощью низкомолекулярных биоантиоксидантов. Биоантиоксиданты и антиоксидантные ферменты составляют единую защитную систему организма [1]. В связи с этим является актуальным выяснение взаимосвязи в функционировании антиоксидантных ферментов и биоантиоксидантов, возможности их взаимной компенсации. К антиоксидантным ферментам относят семейство супероксиддисмутаз (СОД), глутатионпероксидазу (ГП), каталазу, глутатионредуктазу, а также семейство глутатион-S-трансфераз (GST). Ранее было показано, что введением высоких доз экзогенного синтетического антиоксиданта ионола мышам можно существенно снизить уровень природных антиоксидантов в липидах печени [2]. Основываясь на этих результатах, для выявления взаимосвязи систем ферментативной и неферментативной регуляции уровня свободных радикалов мы провели эксперименты по влиянию высоких доз ионола на ферментные системы образования и детоксикации активных форм

кислорода в различных субклеточных органеллах печени здоровых животных. 2,6-Дитрет.бутил-4-метилфенол (ионол, дибунол, тонарол) широко используется в ведущих странах Европы и Америки в качестве пищевой и косметической добавки. Трудами академика Н.М.Эмануэля и его школы были показаны перспективы применения ионола в медицине, и в 70-х годах дибунол был разрешен для клинического применения при опухолях мочевого пузыря, для лечения лучевых циститов, лучевых и трофических повреждений кожи, ожогов и обморожений [3.4].

**МЕТОДИКА.** Работа проведена на мышах самцах массой 20-22 г. линии F1(C57/Bl/6/DBA2). Дибунол вводили в дозе 100 мг/кг однократно внутривентрально в виде озвученной суспензии в физиологическом растворе. Было проведено 3 независимых серии экспериментов. Группы опытных животных по 10 штук забивали декапитацией через определенные промежутки времени после введения препарата. Одновременно в таком же количестве забивали контрольных животных. После декапитации печень перфузировали и выделяли фракции ядер, митохондрий, микросом и цитозоля по стандартным методикам. Митохондриальную фракцию замораживали в жидком азоте на трое суток и затем после озвучивания на ультразвуковом дезинтеграторе УЗДН-2Т из нее осаждали субмитохондриальные частицы (СМЧ). Супернатант использовали для определения активности Мп-СОД. В цитозоле измеряли активности CuZn-СОД, ГП, GST-A и GST-B. Активность Мп-СОД и CuZn-СОД определяли в системе ксантин-ксантиноксидаза по ингибированию восстановления цитохрома с [5], ГП - по окислению НАДФН в сопряженной глутатионредуктазной системе с использованием в качестве субстрата гидропероксида трет-бутила [6]. Активность GST определяли по образованию тиозфинов из 1-хлор-3,4-динитробензола и этакриновой кислоты с восстановленным глутатионом. С первым субстратом определяется в основном GST-A, со вторым - GST-B [7]. В ядрах, СМЧ и микросомах определяли скорость генерирования супероксидных радикалов (V) по скорости НАДФН- и НАДН-зависимого окисления гидрохлорида 2,2,6,6-тетраметил-4-оксопиперидина до соответствующего нитроксильного радикала, регистрируемого методом ЭПР [8-10]. Все результаты представлены в относительных единицах к контролю, статистическую обработку результатов проводили по методу Стьюдента.

**РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ.** Введение ионола приводит к достоверным изменениям в активности всех изученных в настоящей работе ферментных систем. Как видно из рис. 1 ионол вызывает индукцию СОД в цитозоле и снижает активность СОД в митохондриях. Изменения в активности СОД носят экстремальный характер, и кривые для CuZn-СОД и Мп-СОД антибатны. Экстремальные изменения в активности обоих ферментов происходят через сутки после введения препарата, однако, если активность CuZn-СОД к третьим суткам возвращается к норме, то активность Мп-СОД к этому сроку все еще составляет лишь 40% от контрольного уровня. На том же рисунке приведена кривая изменения активности экстраклеточной СОД в эритроцитах, аналогичная кривой для CuZn-СОД.

Антибатные изменения в активности CuZn-СОД и Мп-СОД мы наблюдали также ранее в процессе регенерации печени после частичной гепатэктомии, однако, процесс регенерации происходил, наоборот, на фоне повышенной активности митохондриальной СОД и сниженной активности цитозольной СОД [11]. Существенное повышение активности Мп-СОД наблюдали в процессе реперфузии печени после ишемии [12]. Активация Мп-СОД происходила также в печени мышей после хронического облучения в суммарной дозе 5,4 сГр., когда есть основания предполагать включение механизмов репарации повреждений, вызванных действием малых доз облучения [13]. Приведенные результаты по активации Мп-СОД согласуются с данными, полученными на бактериях *E. coli* относительно того, что Мп-СОД, наряду с некоторыми другими белками, синтезируется в первую очередь, если клетка подвергается окислительному стрессу [14,15].



При опухолевом росте, при психоэмоциональном стрессе, как и в настоящих экспериментах по введению ионола здоровым животным, в печени животных-опухоленосителей происходило снижение активности Mn-СОД [16,17]. По-видимому длительное снижение активности Mn-СОД, обнаруженное в настоящих экспериментах, связано с токсическим действием высоких доз антиоксиданта. В использованной в данной работе дозе ионол обладает противоопухолевым действием [18].

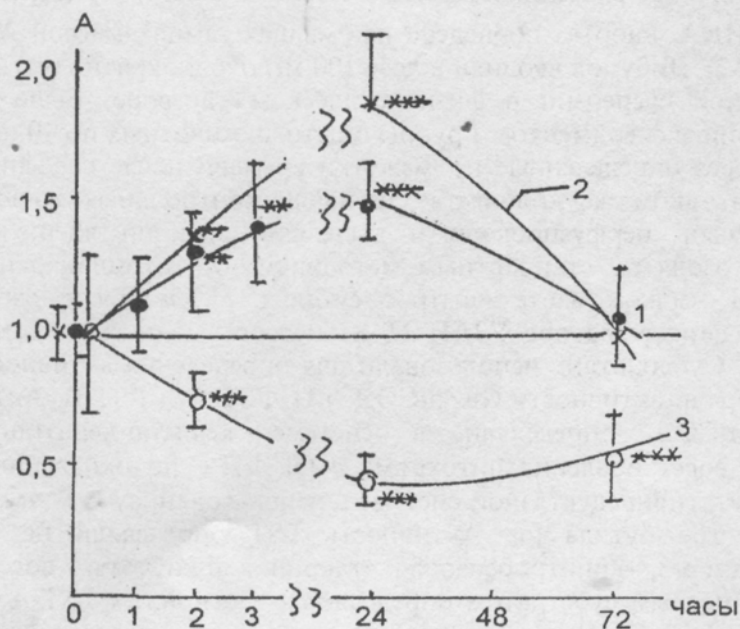


Рисунок 1.

Динамика изменения активности (А) CuZn-СОД в цитозоле печени (1), в крови (2) и Mn-СОД в митохондриях (3) после введения ионола в относительных единицах к контролю.

\* $P < 0,05$ , \*\* $P < 0,01$ , \*\*\* $P < 0,001$ .

По данным фармакокинетики при однократном введении ионола внутрибрюшинно или в желудок максимальная концентрация препарата в печени достигалась через 12-14 часов после введения, через 24 часа после введения в желудок количество препарата в печени уменьшалось в три раза. По внутриклеточному распределению препарата имеются данные по однократному введению в желудок ионола, меченого по метильной группе. В тяжелых митохондриях, ядрах и в цитозоле печени максимальная активность накапливается уже через 6 часов после введения, в легких митохондриях и в микросомах - через 12 часов, однако, через 48 часов максимальное содержание метки оказывается в микросомах, где ионол подвергается метаболизму. Через 24 часа в печени обнаруживали лишь 1% от введенной активности [19].

Несовпадение максимумов на кинетических кривых содержания ионола в различных субклеточных органеллах с экстремумами на кинетических кривых изменения активности СОД и других параметров системы образования и детоксикации активных форм кислорода, как будет показано ниже, указывает на опосредованное влияние ионола на изучаемую систему. Продукты метаболизма ионола обладают биологической активностью и, возможно, с ними связаны токсические эффекты ионола, стимуляция онкогенеза в легких [20].

Наиболее выраженные изменения в скоростях образования супероксидных радикалов также обнаружены через сутки после введения ионола. В микросомах величина  $V$  падает в 2 раза, в СМЧ незначительно увеличивается (20%) и резко возрастает в ядерных мембранах (рис. 2). Через трое суток величины  $V$  во всех субклеточных органеллах возвращаются к норме. На рис. 3 приведены кинетические

кривые, характеризующие состояние системы генерирования и утилизации супероксидных радикалов по величине отношения величины  $V$  к активности СОД соответствующей компартментализации. Видно, что в микросомах относительный уровень супероксидных радикалов составляет около 40% от контрольного уровня. В ядрах и в митохондриях под влиянием данной дозы ионола отношение  $V/A$  через сутки возрастает в 2,5-3 раза. Приведенные данные свидетельствуют о нарушении регуляции обмена супероксидных радикалов во всех субклеточных органеллах.

В микросомах, где около 75% поглощенного кислорода восстанавливается по одноэлектронному механизму, т.е. с образованием супероксидных радикалов, снижение уровня супероксидных радикалов может свидетельствовать об угнетении микросомальной цепи переноса электронов. В митохондриях и в ядрах в выбранной дозе ионол снижает уровень ферментной антиоксидантной защиты мембран от повреждающего действия супероксидных радикалов, однако, этот эффект снимается к третьим суткам после введения препарата.

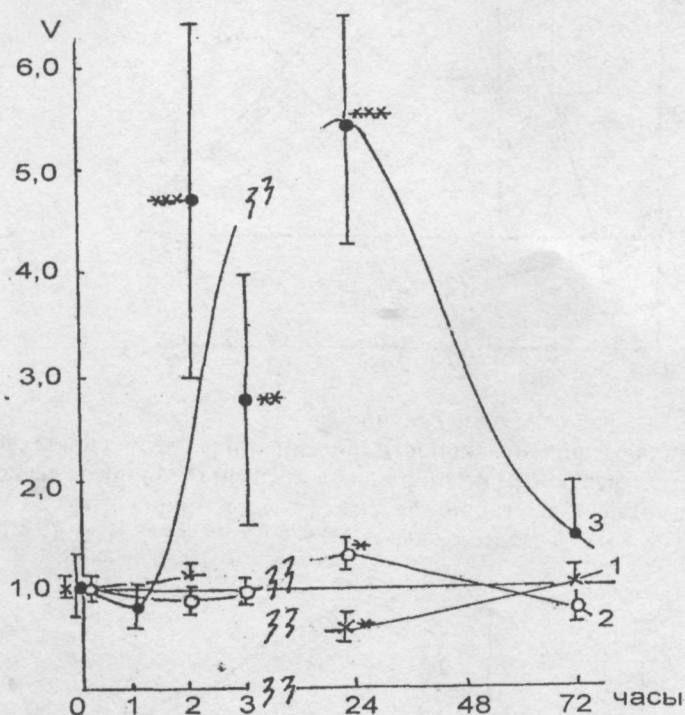


Рисунок 2.

Динамика изменения скорости образования супероксидных радикалов ( $V$ ) в микросомах (1), в СМЧ (2) и в ядрах (3) после введения ионола в относительных единицах к контролю.

\* $P < 0,05$ , \*\* $P < 0,01$ , \*\*\* $P < 0,001$ .

Рост величины  $V/A$  в ядрах может быть связан и с нормальными физиологическими функциями ядра. Так рост величины  $V/A$  в ядрах печени крыс наблюдали в экспериментах по частичной гепатэктомии печени на стадии активного роста органа и связывали этот рост с участием супероксидных радикалов в реорганизации ядра в процессе митоза [11]. Рост  $V/A$  имел место также в ядрах печени мышей после тотального хронического облучения малыми дозами [13]. Не исключено, что и в случае ионола имеет место кратковременная активация пролиферации.

На рис. 4 приведены кинетические кривые изменения активности ГП и GST. Как видно из рисунка, через сутки после введения препарата происходила активация ГП и GST-B, которая также обладает глутатионпероксидазной активностью. Это показывает, что под влиянием ионола индуцируются и Se-содержащая и неселеновая пероксидазы. Активность обоих ферментов изменялась синхронно. Активность GST-



А не изменялась. Полученные данные согласуются с результатами других авторов, которые обнаружили способность ионола вызывать индукцию ряда ферментов метаболизма ксенобиотиков, в том числе некоторых изоформ GST [21], ГП, [22] а также глутатионредуктазы [23].

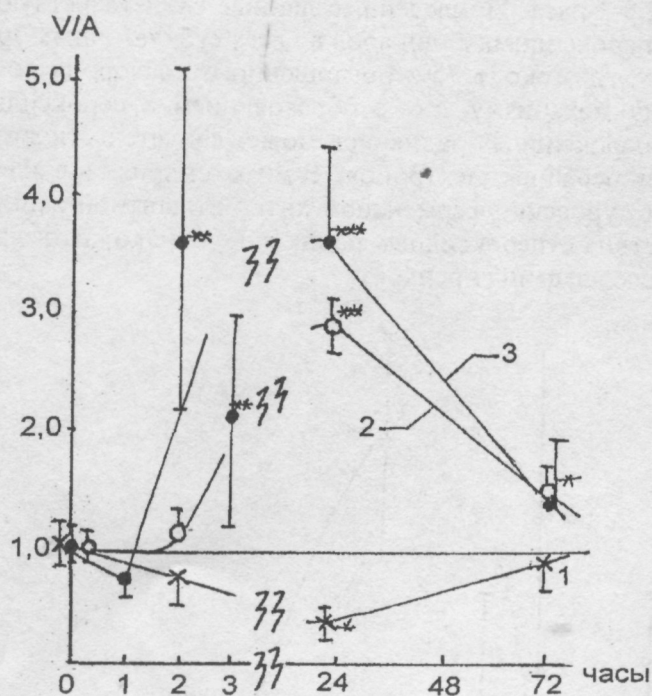


Рисунок 3.

Динамика изменения отношения скорости образования супероксидных радикалов к активности СОД соответствующей компарментализации (V/A) после введения ионола в относительных единицах к контролю. 1 - V/A CuZn-SOD в микросомах; 2 - V/A Mn-SOD в митохондриях; 3 - V/A CuZn-SOD в ядрах. \*P < 0,05, \*\* P < 0,01, \*\*\*P < 0,001.

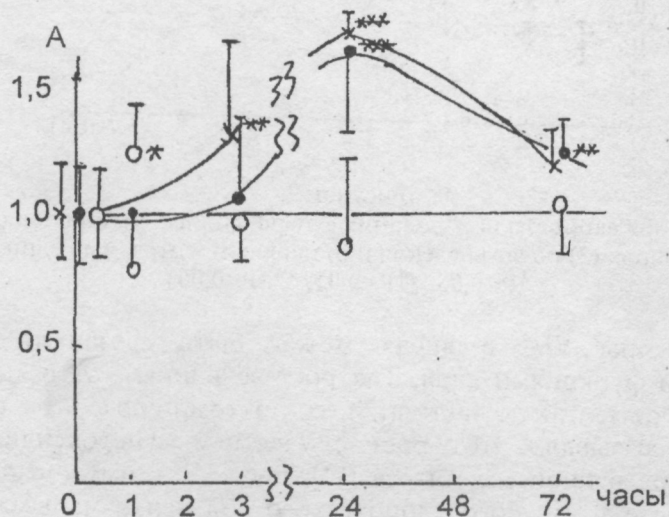


Рисунок 4.

Динамика изменения активности (A) ГП (•), GST-B (x) и GST-A (°) после введения ионола в относительных единицах к контролю. \* P < 0,05, \*\* P < 0,01, \*\*\* P < 0,001

При введении ионола в дозе 30 мг/кг мы, также как и в случае дозы 100 мг/кг, наблюдали через 24 часа активацию ГП в цитозоле в 1,8 раза и двукратный рост

величины V в ядрах; в СМЧ величина V оставалась в пределах нормы. Полученные результаты показывают, что уменьшение дозы ионола не привело к качественным различиям в ответной реакции системы образования и детоксикации супероксидных радикалов на введение экзогенного антиоксиданта, изменился лишь масштаб этого ответа.

Антиоксидантные ферменты образуют единую метаболическую цепь, в которой продукт первой реакции является субстратом последующей. В связи с этим для нормального функционирования всей ферментной антиоксидантной системы важно сохранение определенных соотношений в активности отдельных ферментов цепи. В первую очередь это касается СОД и ГП, поскольку при несбалансированном росте активности СОД может повыситься стационарная концентрация перекисей, токсичных для клетки. В наших экспериментах отношение СОД/ГП в цитозоле возрастало на 20-30 % только в первые часы после введения препарата, а затем возвращалось к норме. Отсюда следует, что под влиянием ионола не нарушается регуляторная связь в цепи антиоксидантных ферментов, катализирующих реакции образования и детоксикации перекисей.

По данным Бурлаковой с соавторами высокие дозы ионола вызывают снижение уровня природных антиоксидантов на 60-80% , и этот низкий уровень сохраняется по крайней мере в течение 7 суток, сопровождаясь резким снижением антиокислительной активности липидов печени и ростом их окисляемости. При введении ионола в дозе 30 мг/кг уменьшения антиокислительной активности не происходило [2]. Это означает, что индукция антиоксидантных ферментов не связана напрямую со снижением уровня природных антиоксидантов. Выше были приведены данные о практически полном выведении метки через сутки после введения меченого по 4 положению ионола, что характеризует его быстрый метаболизм [19]. При модификации ионола образуются продукты, обладающие прооксидантными свойствами [20,24]. По-видимому, изменения в системе супероксидный радикал - СОД при введении ионола вызваны продуктами его метаболизма, обладающими прооксидантными свойствами. Полученные данные показывают, что ферментная антиоксидантная система существенно быстрее, чем система природных антиоксидантов возвращается на нормальный уровень и может осуществлять защиту мембран от окислительных повреждений на фоне сниженного уровня природных антиоксидантов.

## ЛИТЕРАТУРА

1. Fridovich I. (1978) Science, **201**, 875-880.
2. Бурлакова Е.Б., Алесенко А.В., Молочкина Е.М. и др. (1975) в кн. Биоантиоксиданты в лучевом поражении и злокачественном росте, М., Наука, 50-59.
3. Эмануэль Н.М. (1977) Кинетика экспериментальных опухолевых процессов, М., Наука, 1-416.
4. Корман Д.Б. (1982) Биоантиокислители в регуляции метаболизма в норме и патологии. М., Наука, 213-222.
5. Kuthan H, Hausmann H-J., Werringloer J. (1986) Biochem. J., **237**, 175-180.
6. Ланкин В.З., Гуревич С.М. (1976) Докл. АН СССР, **216** 705-708..
7. Habig W.H., Pabst M.J., Jakoby W.B. (1974) J. Biol. Chem., **249**, 7130-7139.
8. Вартамян Л.С., Гуревич С.М. (1989) Биохимия, **54**, 1020-1025.
9. Раиба Ю.Э., Вартамян Л.С., Байдер Л.М., Криницкая Л.А. (1989) Биофизика, **34**, 57-62.
10. Раиба Ю.Э., Черников И.А., Байдер Л.М., Вартамян Л.С. (1986) Биол. мембр., **3**, 838-845
11. Вартамян Л.С., Садовникова И.П., Гуревич С.М., Соколова И.С. (1992) Биохимия, **57**, 671-678



12. Раиба Ю.Э., Вартамян Л.С., Серезина Л.А., Комаров П.Г., Биленко М.В. (1986) Бюлл. экспер. биол. мед., 111, 559-561.
13. Вартамян Л.С., Гуревич С.М., Козаченко А.И., Наглер Л.Г., Лозовская Е.Л., Бурлакова Е.Б. (1999) Биохимия, в печати.
14. Fridovich I. (1995) in: The Oxygen Paradox (Davies K.J.A., Ursini F., ed., Cleup University Press, Padova, Italy) 19-22.
15. Wu J., Weiss B. (1991) J.Bacteriol., 173, 2864-2871.
16. Гуревич С.М., Вартамян Л.С., Наглер Л.Г. (1993) Вопр. мед. химии, 39, 16-20.
17. Рухирева Г.Т., Маклецова М.Г., Менджерицкий А.М. и др. (1993) Изв. РАН, сер. биол., № 2, 243-256.
18. Бурлакова Е.Б., Гаинцева В.Д., Эмануэль Н.М. (1996) Изв. АН СССР, сер. биол. №4, 511-516.
19. Дегтерев И.А., Заиков Г.Е. (1985) Хим. фарм. журн., 19, 910-919.
20. Dwer-Dield L.D., Thompson J.A., Peljak G., e.a. (1998) Toxicology, 130, 115-127.
21. McLellan L.J., Judah D.J., Ntal G.E., Hayes J.D. (1994) Biochem. J., 300, 117-124.
22. Lankin V., Korchin V., Konovalova G., Jarkova R. (1994) Free Rad. Biol. Med., 16, 15.
23. Martin-Aragon S., Benedi J.M., Villar A.M. (1998) Gerontology, 44, 21-25.
24. Siman C.M., Eriksson U.J. (1996) Toxicol. Lett., 87, 103-108.

Поступила 24.04.99.

## THE INFLUENCE OF IONOL ON SUPEROXIDE RADICAL METABOLISM IN MOUSE LIVER

VARTANYAN L.S., GUREVICH S.M.

Emanuel Institute of Biochemical Physics Russian Academy of Science, Moscow

Kosygin street 4, Moscow 117334, Russia. Fax (095) 137-4101. E-mail: chtmbio @ glasnet. Ru

The influence of ionol (100mg/kg) on the rate of superoxide generation (V) and activities of antioxidant enzymes: CuZn- and Mn-SOD, glutathione peroxidase (GSH-Px), glutathione S-transferase (GST) in different subcellular organelles of mice liver was studied. Ionol is shown to result in reliable a synchronous changes of all studied antioxidant enzyme activities in cytosol and whole blood.

On the first day the level of these enzymes increased by 1.5 times and on the third day it returned to normal. The obtained data indicate retention of regulatory relation in antioxidant system in liver cytosol within the sector SOD-GSH-Px.

In the mitochondria the Mn-SOD activity changes in antipath manner as compared CuZn-SOD activity, on the first day Mn-SOD activity decreases and remains on lowered level during the whole period investigated. In microsomes the value of V is found to be reduced. In the case of SMP on the first day after the administration of ionol V value didn't increase significantly. However, owing to Mn-SOD activity decrease the ratio V/A, showing the level of superoxide radicals in subcellular organelles grows 3-fold. In nuclei V value increases 4-6-fold during 1-3 hours after ionol injection.

The data obtained show that administration of high dose of ionol to intact mice suppresses antioxidant enzyme system of mitochondria, induces abrupt production of superoxide radicals in nuclei and reduces of functioning of electron transport chain in microsomes. The observed disturbances have short-lived character and are normalized during 3 days after administration of ionol. The toxic effects of ionol may be connected with the action of oxidative modification products formed in organism.

**Key words:** ionol, superoxide radicals, antioxidant enzymes, subcellular organelles, mouse liver.