

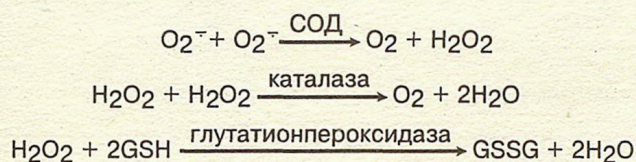
Е.С.Дремина, В.С.Шаров, Ю.А.Владимиров

ОПРЕДЕЛЕНИЕ АНТИОКСИДАНТНОЙ АКТИВНОСТИ БИОЛОГИЧЕСКИХ И ЛЕКАРСТВЕННЫХ ПРЕПАРАТОВ: МЕТОДОЛОГИЧЕСКИЕ АСПЕКТЫ

НИИ физико-химической медицины МЗ РФ, г.Москва

В настоящее время не вызывает сомнений, что в развитии многих заболеваний определенную роль играют свободнорадикальные процессы и антиоксидантная терапия является важным компонентом мероприятий по реабилитации больных [17]. Поэтому определение антиоксидантной активности (АОА) тканей, биологических жидкостей, а также лекарственных препаратов является важной задачей для медико-биологических и клинических исследований.

Изучение механизмов антиоксидантной защиты позволило установить, что основными внутриклеточными ингибиторами свободнорадикальных процессов являются специальные ферменты супероксиддисмутаза (СОД), каталаза и глутатионпероксидаза, которые катализируют реакции с активными формами кислорода, приводящие к образованию неактивных продуктов [9,15,17]:



Субстратом последней реакции являются также первичные продукты перекисного окисления липидов (ПОЛ), гидроперекиси липидов и других органических молекул, которые могут участвовать в дальнейшем развитии свободнорадикального повреждения биосубстратов и являются токсичными соединениями для клеток [8]. Кроме ферментных систем, в клетках существуют также соединения, которые способны перехватывать свободные радикалы и таким образом тормозить цепные реакции свободнорадикального окисления. Из них наибольшей специфичностью и эффективностью обладают липидные антиоксиданты α -токоферол, каротиноиды, убиноны и флавоноиды. Наконец существуют системы, предназначенные для связывания и инактивации ионов металлов с переменной валентностью, главным образом железа, которые являются эффективными катализаторами образования свободных радикалов в биологических системах. Кроме специфических белков (ферритин, лактоферрин), к их числу следует отнести также другие белки, пептиды и низкомолекулярные соединения, способные хелатировать катионы металлов с переменной валентностью [18].

Вопрос о том, что является основным ингибитором ПОЛ во внеклеточных жидкостях *in vivo*, широко обсуждается. Биологические жидкости, такие как плазма крови, тканевая жидкость, ликвор, синовиальная жидкость, обладают очень низкой каталазоподобной и СОД-активностью. Marklund et al. выделили внеклеточную СОД (ВК—СОД), которая хотя и содержит Zn и Cu, но отличается от внутриклеточной СОД более высоким молекулярным весом и способностью связываться с углеводами [21]. Биологическая роль такой внеклеточной СОД не ясна, так как активность этого фермента очень низка; тем не менее было показано, что ВК—СОД связывает гепарин и, вероятно, *in vivo* может связываться с поверхностью эндотелия сосудов и образовывать защитный слой на клетках. В

плазме крови была обнаружена селенсодержащая глутатионпероксидаза, причем эта внеклеточная глутатионпероксидаза отличается от внутриклеточной [18]. Однако следует учитывать, что в плазме крови мышей содержится всего 20 мкМ глутатиона, а в плазме крови человека его концентрация еще меньше — 2 мкМ [8]. В то же время общепризнано, что плазма крови обладает выраженной способностью ингибировать развитие ПОЛ в различных системах [16]. По-видимому, наибольшее значение в антиокислительном действии плазмы крови имеют неферментативные механизмы ингибирования свободнорадикальных реакций.

Таким образом, в соответствии с классификацией, приведенной в обзоре [18], необходимо учитывать наличие нескольких возможных механизмов антиокислительного действия:

- 1) снижение локальной концентрации кислорода,
- 2) ферментативное и неферментативное ингибирование свободнорадикальных активных форм кислорода,
- 3) тушение синглетного возбужденного кислорода ($^1\text{O}_2$), способного образовывать гидроперекиси липидов, специфическими и неспецифическими ингибиторами (ликопен, β -каротин и др.) [12,29],
- 4) снижение концентрации перекисей с образованием продуктов нерадикальной природы,
- 5) снижение концентрации ионов металлов с переменной валентностью, в особенности железа, которые катализируют образование активных форм кислорода, таких как гидроксильный радикал ($\text{HO}\cdot$), или специфических комплексов железа (феррил и пр.), необходимых для инициирования процесса ПОЛ, а также разложение липидных перекисей с образованием пероксильных и алкоксильных радикалов,
- 6) обрыв цепей свободнорадикального окисления липидов на липидных антиоксидантах, которые могут реагировать с липидными радикалами и инактивировать их.

При изучении АОА тканей, биологических жидкостей и лекарственных препаратов следует помнить не только о многообразии механизмов АОА, но и о том, что роль каждого из них может существенно различаться при различных способах активации свободнорадикальных процессов. Поэтому выбор адекватных систем для оценки АОА имеет первостепенное значение для правильной интерпретации получаемых результатов.

Среди методов, предложенных в настоящее время для определения АОА, следует выделить методы, которые позволяют обнаружить "интегральную" АОА препаратов, однако не дают возможность определить механизм антиокислительного действия.

Наиболее известным среди таких подходов является метод, основанный на измерении способности плазмы крови тормозить автоокисление гомогената мозга [26]. Для количественной оценки степени окисления гомогената использовали определение вторичных продуктов ПОЛ альдегидной природы, реагирующих с 2-тиобарбитуровой кислотой (ТБК-реактивные продукты). В такой системе АОА сыворотки крови определяется в основном церулоплазмином (ЦП), трансферрином (ТР) и α -токоферолом, причем в физиологических концентрациях α -токоферол вносил сравнительно небольшой вклад в суммарную АОА (менее 10%). Vidlakova et al. [28]

предложили аналогичный метод определения АОА сыворотки крови по степени ингибирования ею ПОЛ, развивающегося в процессе автоокисления гомогенатов печени крыс. Было обнаружено, что фракция апо-β-липопротеинов сыворотки крови человека, содержащая основное количество α-токоферола, и в этом случае обладала очень слабыми антиокислительными свойствами по сравнению с цельной сывороткой крови. Очевидно, эти результаты свидетельствуют о ведущей роли эндогенных ионов железа в механизме "автоокисления" гомогенатов тканей, так как трансферрин является высокоспецифичным хелатором железа, а церулоплазмин осуществляет феррооксидазную функцию, переводя ионы двухвалентного железа в менее активную трехвалентную форму. Следует заметить, что методы, основанные на торможении автоокисления гомогенатов различных тканей, вероятно, наиболее точно определяют реальную АОА препаратов *in vivo*, однако их нельзя отнести к специфическим методам, позволяющим определить конкретный механизм антиокислительного действия.

Существует другой подход к определению АОА, который основан на исследовании препарата в "чистых" модельных системах с генерацией определенного типа радикалов либо специфических индукторов ПОЛ; использование достаточно полного набора таких систем в принципе позволяет выяснить конкретный механизм или оценить вклад различных механизмов АОА препаратов. К настоящему времени было предложено несколько таких моделей, в которых, в частности, исследовался эффект плазмы крови и ее отдельных компонент.

В работе [23] было изучено взаимодействие липидов и белков плазмы крови человека с активными формами кислорода (АФК), образующимися при окислении гипоксантина (ГК) ферментом ксантиноксидазой (КО). В этой реакции образуется супероксид-анион-радикал; его дальнейшие реакции приводят к образованию других активных форм кислорода. Инкубация плазмы крови с ГК и КО приводила в этих экспериментах, в первую очередь, к окислению более 50% сульфгидрильных (-SH) групп белков, при этом образование продуктов ПОЛ (ТБК-активных продуктов и диеновых конъюгатов) еще не регистрировалось. Был сделан вывод о том, что АОА плазмы крови по отношению к АФК в основном определяется сульфгидрильными группами белков плазмы крови.

Wayner et al. [30] предложили метод определения АОА биологических жидкостей по торможению ими перекисного окисления эмульсии линолевой кислоты, индуцированного добавлением к ней водорастворимого инициатора азобис-2-амидинопропан гидрохлорида (АБАП). Термическая декомпозиция АБАП приводит к образованию радикалов инициатора перекисного типа. Было обнаружено, что взаимодействие плазмы крови с перекисными радикалами в водной фазе в основном определяется уратом (35—60%), аскорбатом (0—24%), белками, содержащими SH-группы, в частности альбумином (10—50%), и α-токоферолом (5—10%). С другой стороны, на модели термической декомпозиции липидорастворимых азосоединений была показана высокая антиокислительная активность эндогенных липидных антиоксидантов (α-токоферол) и фармакологических препаратов антиоксидантного действия по отношению к радикалам перекисного типа в липидной фазе [14,19].

В настоящее время появляется все большее число работ, посвященных возможной роли одной из АФК, синглетного кислорода (1O_2), в развитии окислительного повреждения клеток [24]. Предложены достаточно удобные системы для генерации 1O_2 при фотовозбуждении водорастворимых и липидорастворимых фотосенсибилизаторов [20,22], а также при темновом термическом распаде эндоперекисей [10,11,25,27,29].

В работе [29] было показано, что при действии 1O_2 на плазму крови происходило полное окисление аскорбата и частичное окисление урата (на 75%), убихинона-10 (85%), протеиновых теолов (80%) и билирубина (25%), при этом уровень α-токоферола, β-каротина и ликопена практически не изменялся. Модельную систему, основанную на термическом разложении эндоперекисей, успешно применяли для количественной оценки АОА природных и синтетических каротиноидов и флавоноидов [10,25,27] по отношению к 1O_2 -индуцированному перекисному окислению биологических субстратов с целью прогнозирования их антиоксидантного терапевтического действия.

Безусловно, исследование АОА препаратов, проведенное в модельных системах с генерацией определенного типа радикалов, может дать наиболее полную информацию о механизме АОА, однако такого рода исследования являются очень трудоемкими и требующими дорогостоящих биохимических препаратов. Поэтому в наших исследованиях мы предприняли попытку использовать преимущества доступности простых моделей для исследования "интегральной" АОА в соединении с возможностью более специфического анализа механизмов антиокислительного действия. Принимая во внимание

тот факт, что *in vivo* наиболее вероятным индуктором ПОЛ являются металлы с переменной валентностью (в особенности ионы железа), подходящей моделью для изучения АОА является железоиндуцированное ПОЛ в биомембранах [2]. Известно, что в присутствии ионов железа образуются не только липидные радикалы, но и большое количество АФК. Таким образом, эта система могла бы быть удобной моделью для изучения различных механизмов АОА при возможности селективного исследования кинетики реакций различных типов радикалов в этой системе. Для определения АОА уже достаточно давно было предложено измерение хемилюминесценции (ХЛ), сопровождающей процесс Fe^{2+} -индуцированного ПОЛ мембран и липопротеинов в фосфатном буфере [1,6,7]. Однако главным недостатком такой модели является как раз то, что соединения с совершенно различными механизмами антиокислительного действия (хелаторы ионов железа, липидные антиоксиданты, ловушки АФК) одинаковым образом уменьшали интенсивность хемилюминесценции на протяжении всей кинетики процесса.

В наших исследованиях [3—5] было предложено использовать для скрининга химических соединений и изучения механизма антиокислительной активности биологических препаратов кинетику ХЛ при Fe^{2+} -индуцированном ПОЛ в трис-буферной суспензии липосом. Преимущество этой системы заключается в том, что кинетика ХЛ разделена на четко выраженные стадии, связанные с протеканием различных элементарных реакций ПОЛ [3,13]. Для изучения АОА наибольший интерес представляют первые три стадии кинетики (быстрая вспышка, латентный период и медленная вспышка), которые отражают развитие процесса Fe^{2+} -индуцированного ПОЛ. Ранее [3,13] нам удалось показать, что в данной системе:

- 1) вещества, блокирующие места связывания железа на поверхности липидных мембран, уменьшают латентный период и не влияют на накопление продуктов ПОЛ;
- 2) вещества, взаимодействующие с Fe^{2+} (связывающие либо окисляющие его), вызывают уменьшение латентного периода, но могут также приводить к уменьшению накопления продуктов ПОЛ, если кинетика взаимодействия с Fe^{2+} сравнима с кинетикой процесса ПОЛ;
- 3) липидные антиоксиданты, наоборот, тормозят наступление стадии медленной вспышки и уменьшают накопление продуктов ПОЛ. В этой системе мы провели исследование механизмов АОА плазмы крови и ее отдельных компонент по отношению к Fe^{2+} -индуцированному ПОЛ [5]. При добавлении к суспензии липосом плазмы крови уже при концентрации 4 об % происходило сильное сокращение латентного периода кинетики ХЛ и уменьшение образования ТБК-активных продуктов. Было обнаружено, что все исследованные основные компоненты плазмы крови, кроме альбумина, при концентрациях, соответствующих их содержанию в плазме крови, уменьшали количество ТБК-активных продуктов в суспензии липосом, т.е. обладали антиокислительным действием. Величина этого эффекта уменьшалась в ряду ЦП>ТР> HCO_3^- >α-токоферол. Таким образом, АОА плазмы, судя по уменьшению накопления продуктов ПОЛ, может быть результатом суммарного действия ЦП, ТР, HCO_3^- и α-токоферола.

Эффект уменьшения латентного периода кинетики ПОЛ под действием плазмы крови обусловлен совместным действием ЦП, ТР и HCO_3^- . Был сделан вывод, что этот эффект определяется взаимодействием данных соединений с ионами железа и частичным изъятием его из реакций ПОЛ за счет окисления (в случае ЦП) или за счет необратимого связывания (в случае ТР и HCO_3^-). Поскольку альбумин не оказывал влияния на накопление продуктов ПОЛ, сокращение латентного периода при его добавлении обусловлено блокированием мест связывания ионов железа на липосомах.

Следует еще раз подчеркнуть, что представленные данные о механизме антиокислительного действия плазмы крови справедливы только по отношению к Fe^{2+} -индуцированному ПОЛ и могут отличаться от результатов, полученных при других способах инициирования. Тем не менее, представленную в настоящей работе модель целесообразно использовать для изучения механизма АОА фармакологических препаратов, биологических жидкостей и тканей в клинических исследованиях.

ЛИТЕРАТУРА

1. Атанаев Т.Б., Шерстнев М.П., Владимиров Ю.А. // Биофизика.— 1990.— Т.35.— С.610—613.
2. Владимиров Ю.А., Арчаков А.И. Перекисное окисление липидов в биологических мембранах.— М.: Наука, 1972.

3. Дремина Е.С. Хемилюминесценция, сопровождающая процессы Fe^{2+} -индуцированного перекисного окисления липидов в мембранах: Автореф. дис. ... канд. биол. наук. — М., 1992.
4. Дремина Е.С., Шаров В.С., Владимиров Ю.А. // Биофизика. — 1993. — Т.38. — С.1047—1052.
5. Рубене Д.Я., Шаров В.С., Оленов В.И., Турзит Г.Я., Дубур Г.Я., Владимиров Ю.А. // Журн. физ. химии. — 1981. — Т.55. — С.511—512.
6. Теселкин Ю.О., Клебанов Г.И., Владимиров Ю.А. // Биофизика. — 1988. — Т.33. — С.512—516.
7. Фархутдинов Р.Р. // Клин. мед. — 1984. — № 12. — С.18—23.
8. Anderson M.E., Meister A. // J. Biol. Chem. — 1980. — Vol.255. — P.9530—9533.
9. Aruoma O.I., Halliwell B., Laughton M.J., Gutteridge J.M.C. // Biochem. J. — 1989. — Vol.258. — P.617—620.
10. Devasagayam T.P.A., Ippendorf H., Werner T., Martin H.D., Sies H. // Lipid-Soluble Antioxidants / Ed. R.T. Ong. — Basel, 1992. — P.255—264.
11. Di Mascio P., Sies H. // J. Am. Chem. Soc. — 1989. — Vol.111. — P.2909—2914.
12. Di Mascio P., Gutteridge J.M.C. // Arch. Biochem. Biophys. — 1989. — Vol.274. — P.532—538.
13. Driomina E.S., Sharov V.S., Vladimirov Yu.A. // Free Radical Biol. Med. — 1993. — Vol.15. — P.239—247.
14. Fiorentini D., Cabrini L., Landi L. // Free Radical Res. Commun. — 1993. — Vol.18. — P.201—209.
15. Fridovich I. // J. Biol. Chem. — 1989. — Vol.264. — P.7761—7764.
16. Halliwell B., Gutteridge J.M.C. // Arch. Biochem. Biophys. — 1986. — Vol.246. — P.501—514.
17. Halliwell B., Gutteridge J.M.C. Free Radicals in Biology and Medicine. — Oxford: Clarendon Press, 1989.
18. Halliwell B., Gutteridge J.M.C. // Arch. Biochem. Biophys. — 1990. — Vol.280. — P.1—8.
19. Kagan V.E., Tsuchiya M., Serbinova E., Packer L., Sies H. // Biochem. Pharmacol. — 1993. — Vol.45. — P.393—400.
20. Kanofsky J.K. // Photochem. Photobiol. — 1990. — Vol.51. — P.299—303.
21. Karlsson K., Marklund S.L. // Biochem. J. — 1988. — Vol.255. — P.223—228.
22. Ojima F., Sakamoto H., Ishiguro Y., Terao J. // Free Radical Biol. Med. — 1993. — Vol.15. — P.377—384.
23. Radi R., Bush K.M., Cosgrove T.P., Freeman B.A. // Arch. Biochem. Biophys. — 1991. — Vol.286. — P.117—125.
24. Sies H., De Groot H. // Toxicol. Lett. — 1992. — Vol.64—65. — P.547—551.
25. Sies H., Kaiser S., Di Mascio P., Murphy M.E. Vitamine E and Health Disorders / Eds L.Packer, K.Lester. — New York: Acad. Press, 1993. — P.141—152.
26. Stocks J., Gutteridge J.M.C., Sharp R.J., Dormady T.L. // Clin. Sci. Med. — 1974. — Vol.47. — P.223—233.
27. Tournaire C., Croux S., Maurette M.T., Beck I., Hocquaux M., Braun A.M., Oliveros E. // Photochem. Photobiol. — 1993. — Vol.19. — P.205—215.
28. Vidlakova M., Erazimova J., Horky J., Placer Z. // Clin. Chim. Acta. — 1972. — Vol.36. — P.61—66.
29. Wagner J.R., Motchnik P.A., Stocker R., Sies H., Ames B.N. // J. Biol. Chem. — 1993. — Vol.268. — P.18502—18506.
30. Wayner D.D.M., Burton G.W., Ingold K.U. // Biochim. Biophys. Acta. — 1987. — Vol.924. — P.408—419.

Поступила 21.12.94.

© СООДАЕВА С.К., 1995

УДК 612.215.015.32.014.46

С.К.Соодаева

РАЗВИТИЕ СВОБОДНОРАДИКАЛЬНЫХ РЕАКЦИЙ В ЛЕГОЧНЫХ КЛЕТКАХ ПРИ ВОЗДЕЙСТВИИ АСБЕСТА (ОБЗОР)

НИИ пульмонологии МЗ и МП РФ

Асбесты вызывают воспалительные процессы в легких, развитие интерстициального фиброза-асбестоза, возникновение опухолей — бронхогенного рака легких и мезотелиомы плевры [3,13,33,40]. По классификации Международного агентства по изучению рака, асбесты входят в группу достоверно доказанных канцерогенов [34].

В настоящее время патологические процессы, обусловленные асбестом, связывают с развитием свободнорадикальных реакций в организме [4,24,31,33]. Асбест способен инициировать образование активных форм кислорода (АФК) по двум механизмам. Во-первых, химические свойства асбестовых волокон и в особенности содержание в них ионов железа обуславливают заметную каталитическую активность в различных реакциях с образованием АФК [31,44]. Во-вторых, асбест вызывает активацию "дыхательного взрыва" фагоцитирующих клеток с образованием метаболитов кислорода [31,44].

Взаимодействие фагоцитов с чужеродными частицами вызывает существенную перестройку окислительного метаболизма клеток. При этом происходит увеличение ионной проницаемости клеточной мембраны, усиление окисления глюкозы, резкое возрастание потребления кислорода, сопровождающееся образованием супероксидного радикала. Этот феномен получил название "дыхательного" или "респираторного взрыва" [1,5,9,10,38]. В основе "дыхательного взрыва" лежит резкое повышение образования НАДФН в клетке в результате активации гексозомонофосфатного шунта и окисления НАДФН ферментативным комплексом — НАДФН-оксидазой, восстанавливающей молекулярный кислород до супероксидного радикала (O_2^-) [1,10]. Генерация фагоцитами O_2^- приводит к образованию в результате их дисмутации пероксида водорода (H_2O_2). В присут-

ствии ионов металлов переменной валентности H_2O_2 становится источником чрезвычайно реакционноспособных гидроксильных радикалов ($HO\cdot$), образующихся по реакции Фейтона [1,19]. При взаимодействии H_2O_2 и анионов Cl^- в присутствии миелопероксидазы (фермента азурофильных гранул фагоцитов) образуется сильнейший окислитель — гипохлорит ($HOCl$). Реакция же $HOCl$ и H_2O_2 сопровождается продукцией синглетного кислорода (1O_2).

Образующиеся фагоцитами АФК являются важным элементом защиты организма от чужеродных объектов, так как обладают антибактериальными, антипаразитарными, противоопухолевыми и другими свойствами [5,19,21,26]. Фагоцитированные бактерии или простейшие гибнут под действием АФК (так как токсические метаболиты кислорода модифицируют их макромолекулы), затем разрушаются протеолитическими ферментами, "перевариваются". Одновременно с исчезновением активатора фагоцитоза происходит инактивация супероксидпродуцирующего ферментного комплекса — НАДФН-оксидазы [7]. При взаимодействии же фагоцитов с асбестом образование АФК безудержно нарастает, так как волокна нечувствительны к АФК постоянно стимулируют клетки, и вдобавок, катализируют генерацию $HO\cdot$. Чрезмерная продукция АФК приводит к повреждению собственных клеток, инактивации ферментов, повреждению ядерных структур из-за окислительной модификации белков, липидов и нуклеиновых кислот [1,2,7,19].

Модификация белков вызывает в них появление антигенных свойств, а окисление липидов (в первую очередь, арахидоновой кислоты), приводит к появлению хематтрактантов, увеличивающих миграцию фагоцитов к месту их образования [1,19]. Таким образом,