



УДК 577.352

А.И.ПОТАПОВИЧ, В.А.КОСТЮК

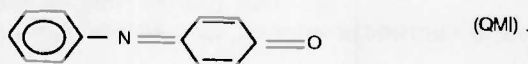
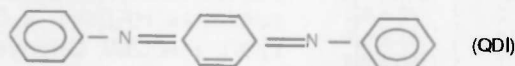
## ИССЛЕДОВАНИЕ АНТИОКИСЛИТЕЛЬНЫХ И АНТИРАДИКАЛЬНЫХ СВОЙСТВ ХИНОНИМИНОВ

In the present study antioxidant effects of two compounds N-phenyl-1,4-benzoquinonemonoimine (QMI) and N,N'-diphenyl-1,4-benzoquinonediimine (QDI) on NADPH- and  $\text{CCl}_4$ -dependent lipid peroxidation in liver microsomes were investigated. We found that both quinoneimines were much stronger inhibitors of these processes as comparison with the phenolic antioxidant – butylated hydroxytoluene. It was found that each quinoneimine molecule could be involved in manifold inhibition of lipid peroxidation unlike the free radical scavengers of a phenolic type. In the following experiments, scavenging properties of QMI and QDI to superoxide ion were elucidated. Quinoneimines are effective scavengers of superoxide. The following values of the rate constants were obtained:  $k(\text{QMI})=7,0 \cdot 10^5 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ ,  $k(\text{QDI})=3,2 \cdot 10^5 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ . We supposed that quinoneimines are promising compounds in view of the pharmacological implication.

В настоящее время не вызывает сомнений, что свободнорадикальные процессы играют важную роль в возникновении целого ряда серьезных заболеваний, часто объединяемых общим термином "свободнорадикальные патологии". Гиперпродукция свободных радикалов и развитие окислительного стресса могут быть вызваны воздействием на организм радиации, минеральной пыли, ксенобиотиков и других неблагоприятных факторов [1–3]. Имеются многочисленные данные, свидетельствующие, что низкомолекулярные природные и синтетические антиоксиданты защищают клетки и ткани от повреждающего действия свободных радикалов и эффективны при лечении и профилактике инициируемых ими патологических процессов [4, 5]. Наблюдающийся в последнее время рост числа "свободнорадикальных патологий", обусловленный обострением экологической ситуации, делает актуальным поиск новых препаратов, обладающих выраженным антиоксидантным действием, что предполагает проведение комплексных исследований с использованием различных физико-химических и биологических систем. По данным литературы [6, 7], новые соединения из группы хинониминнов обладают высокой антирадикальной активностью в некоторых химических модельных системах. В данной работе было изучено антиокислительное действие N-фенил-1,4-бензохинонмоноимина и N,N'-дифенил-1,4-бензохинондиимина в различных системах микросомального перекисного окисления липидов (ПОЛ), оценена способность этих соединений взаимодействовать с анион-радикалом кислорода и методом конкурентного ингибирования определены константы скорости данной реакции.

### Материал и методика

В работе использованы N,N'-дифенил-1,4-бензохинондиимин (QDI) и N-фенил-1,4-бензохинонмоноимин (QMI), синтезированные в Институте проблем химической физики РАН:



Фракцию микросом выделяли из печени крыс методом дифференциального скоростного центрифугирования (центрифуга VAC-601). Гомогенат печени центрифугировали 20 мин при 20 000 g. Полученную надосадочную жидкость вновь центрифугировали в течение 60 мин при 105 000 g. Все операции проводили при 0–4°C.

НАДФН-зависимое перекисное окисление липидов проводили в 0,05 М фосфатном буфере, pH 7,4, содержащем 0,02 М KCl, 10 мкМ FeSO<sub>4</sub>, 0,3 мМ НАДФН, 1,2–1,3 мг/мл микросомального белка в конечном объеме 2 мл.

CCl<sub>4</sub>-зависимое перекисное окисление липидов проводили в 0,05 М фосфатном буфере, pH 7,4, содержащем 0,02 М KCl, 0,6 мМ ЭДТА, 3,4 мМ CCl<sub>4</sub>, вносимого в виде спиртового раствора с конечной концентрацией этилового спирта 2%, 0,3 мМ НАДФН, 1,2–1,3 мг/мл микросомального белка в конечном объеме 2 мл.

Исследованные хинониминны растворяли в этаноле и добавляли к стандартной среде инкубации в объеме 0,1 мл. Реакцию начинали внесением НАДФН и проводили при 37°C (термостат NESLAB). Реакцию останавливали добавлением 0,5 мл 30%-го раствора трихлоруксусной кислоты. В среде инкубации определяли содержание ТБК-активных соединений, используя коэффициент молярной экстинкции  $\epsilon=1,56 \cdot 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$  [8].

Реакцию супероксид-зависимого восстановления паранитротетразолия хлористого (ПНТХ, 85 мкМ) проводили в 0,175 М фосфатном буфере, pH 7,8, содержащем 0,06 мМ ЭДТА, 0,6 мМ ТМЭДА, 6 мкМ рибофлавина в конечном объеме 5 мл [9, 10]. В качестве источника света использовали лампу дневного света (ЛД-20, мощность 20 Вт), удаленную на 20 см от исследуемых образцов. После прекращения освещения в пробы вносили 0,02 мл СОД (5мкг/мл). Пробы спектрофотометрировали при 515 нм (СФ-46).

#### Результаты и их обсуждение

В данной работе антиокислительное действие хинониминнов QDI и QMI изучалось в двух различных системах инициирования свободнорадикальных процессов в микросомах печени крыс – НАДФН- и CCl<sub>4</sub>-зависимом перекисном окислении липидов.

Таблица 1

**Ингибирование хинониминами НАДФН-зависимого перекисного окисления липидов в микросомах печени крыс**

Концентрация мкМ	Ингибирование, %	
	Хинонимин QDI	Хинонимин QMI
0	0	0
0,01	22 ± 2,5	Н/О
0,02	45 ± 3,5	10 ± 4,2
0,05	89 ± 3,0	31 ± 4,7
0,1	99 ± 0,4	43 ± 7,9
0,2	Н/О	60 ± 0,2

Таблица 2

**Ингибирование хинониминами CCl<sub>4</sub>-зависимого перекисного окисления липидов в микросомах печени крыс**

Концентрация мкМ	Ингибирование, %	
	Хинонимин QDI	Хинонимин QMI
0	0	0
0,01	44 ± 15,0	Н/О
0,02	53 ± 4,0	30 ± 11,0
0,05	75 ± 7,2	42 ± 6,4
0,10	91 ± 3,9	51 ± 8,2
0,20	Н/О	65 ± 9,4

Полученные результаты свидетельствуют, что хинониминны QDI и QMI являются эффективными ингибиторами как НАДФН-, так и CCl<sub>4</sub>-зависимого ПОЛ (табл. 1, 2). Как следует из приведенных в табл. 1 и 2 данных, эффективность ингибирования хинониминами НАДФН- и CCl<sub>4</sub>-зависимого ПОЛ в микросомах печени возрастает с увеличением концентрации QDI и QMI. На основании зависимости доза-эффект были определены значения I<sub>50</sub>, соответствующие концентрациям антиоксидантов, ингибирующим перекисное окисление липидов на 50 % (табл. 3).

Результаты, приведенные в таблице 3, свидетельствуют, что QDI обладает более выраженным антиокислительным действием в модельных системах НАДФН- и CCl<sub>4</sub>-зависимого ПОЛ, чем QMI. Следует отметить, что хинониминны значительно эффективнее (более чем на порядок) фенольных

антиоксидантов, в частности ионола, для которого в данных системах ПОЛ I<sub>50</sub>=1,1 мкМ.

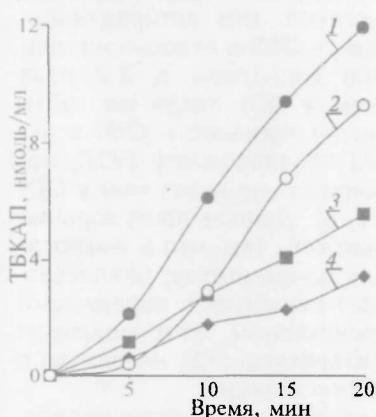
Таблица 3

Антиоксигентная активность (значения  $I_{50}$ ) хинониминов в различных системах перекисного окисления липидов

Антиоксидант	$I_{50}$ (мкМ)	
	НАДФН-зависимое ПОЛ	CCl <sub>4</sub> -зависимое ПОЛ
Хинонимин QDI	0,025	0,018
Хинонимин QMI	0,140	0,090

(рисунок). Эти результаты можно объяснить, допустив, что в процессе реакции в системе сохраняется постоянная концентрация хинонимина или его активной формы, способной эффективно перехватывать радикалы, инициирующие ПОЛ или радикалы липидов, т.е. имеет место следующий механизм:

хинонимин + R<sup>\*</sup> → продукт + RH, продукт + R<sup>\*</sup> → хинонимин + RH и  $k_1$  сравнима с  $k_3$ .

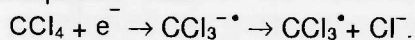


Зависимость эффективности антиоксидантного действия хинониминов и ионола от времени окисления: 1 — контроль; 2 — ионол (1,6 мкМ); 3, 4 — хинонимин QMI (0,15 мкМ) и QDI (0,10 мкМ).

При исследовании кинетики НАДФН-зависимого перекисного окисления липидов в присутствии ионола и хинониминов установлено, что ингибирующий эффект ионола быстро снижается в ходе реакции по мере расходования антиоксиданта. В то же время хинонимины были эффективны в течение всего периода инкубации

Поскольку хинонимины полностью ингибируют процессы перекисного окисления липидов, можно говорить о способности этих соединений нейтрализовать свободные радикалы, образующиеся на стадии инициирования свободнорадикального окисления.

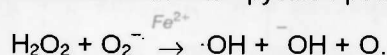
В случае CCl<sub>4</sub>-зависимого ПОЛ стадия инициирования включает образование CCl<sub>3</sub><sup>\*</sup> и CCl<sub>3</sub>O<sub>2</sub><sup>\*</sup>. Как известно [11, 12], метаболизм четыреххлористого углерода протекает в эндоплазматическом ретикулуме с участием цитохрома P-450:



Показана возможность протекания этой реакции в микросомах печени в присутствии CCl<sub>4</sub> и НАДФН [12]. Известно, что CCl<sub>3</sub><sup>\*</sup> быстро реагирует с кислородом, образуя перекисный радикал CCl<sub>3</sub>O<sub>2</sub><sup>\*</sup>, который запускает

реакции пероксидации мембранных фосфолипидов [13].

Существует две точки зрения на процесс инициирования НАДФН-зависимого перекисного окисления липидов в микросомах печени. По мнению ряда авторов [14] стадия инициирования ПОЛ включает ферментативное одноэлектронное восстановление кислорода в микросомальной электрон-транспортной цепи и образование анион-радикала кислорода или супероксид-иона (O<sub>2</sub><sup>-</sup>). Токсическое действие анион-радикала кислорода в биологических системах связывают с образованием гидроксильного радикала (·OH) в соответствии с известной железокатализируемой реакцией Габера-Вейса:



По мнению других авторов [15], инициирование НАДФН-зависимого ПОЛ происходит в результате активации кислорода при комплексовании с ионами железа и других металлов переменной валентности. Наиболее вероятным инициатором ПОЛ в микросомах печени считается АДФ-перферрил-ион, существующий в двух формах:



Он способен внедрять активированный кислород по месту двойных связей в молекулы полиненасыщенных жирных кислот, переводя их в соответствующие гидроперекиси.

Учитывая, что анион-радикал кислорода может играть ключевую роль в механизме инициирования НАДФН-зависимого перекисного окисления липидов в микросомах печени, была исследована антирадикальная актив-

ность хинониминов QDI и QMI в отношении  $O_2^-$ . Эффективность антирадикального действия оценивалась по степени торможения исследуемыми соединениями  $O_2^-$ -зависимого восстановления ПНТХ до диформаза в рибофлавин-содержащей системе фотогенерации  $O_2^-$ .

Установлено, что хинонимины QDI и QMI являются эффективными ловушками анион-радикала кислорода и ингибируют образование диформаза. На основании полученных данных были определены значения  $I_{50}$ , соответствующие концентрациям хинониминов, ингибирующим  $O_2^-$ -зависимое восстановление ПНТХ на 50 %. При расчете констант скорости реакции второго порядка для взаимодействия хинониминов с анион-радикалом кислорода были использованы значения  $I_{50}$ :

$$k_X/k_{\text{СОД}} = I_{50}(\text{СОД})/I_{50}(X),$$

$$k_X = k_{\text{СОД}} \cdot I_{50}(\text{СОД})/I_{50}(X),$$

где  $k_{\text{СОД}} = 2 \cdot 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$  [16].

Таблица 4

Эффективность ингибирования ( $I_{50}$ ) хинониминами и  $\text{СОД } O_2^-$ -зависимого восстановления ПНТХ в рибофлавин-содержащей системе и константы скорости реакции взаимодействия ингибиторов с анион-радикалом кислорода (k)

Ингибитор	$I_{50}$	k $\text{M}^{-1} \text{s}^{-1}$
СОД	0,7 нМ	$2,1 \cdot 10^9$
Хинонимин QDI	4,6 мкМ	$3,2 \cdot 10^5$
Хинонимин QMI	2,1 мкМ	$7,0 \cdot 10^5$

Представленные в табл. 4 данные свидетельствуют, что антирадикальная активность QMI в отношении анион-радикала кислорода в 2,2 раза больше, чем у QDI, тогда как антиокислительная активность QMI в условиях НАДФН-зависимого ПОЛ, напротив, значительно ниже, чем у QDI (см. табл.1, 3). Данное противоречие можно объяснить тем, что в микросомах печени, по-видимому, реализуется механизм инициирования процессов НАДФН-зависимого перекисного окисления липидов, запускаемый АДФ-пер-феррил-ионом. Этот механизм инициирования, как свидетельствуют данные литературы [13], не связан с образованием в среде инкубации анион-радикала кислорода.

Таким образом, в результате проведенного исследования установлено, что хинонимины являются новой группой эффективных антиоксидантов, способных ингибировать свободнорадикальные процессы, имеющие различные механизмы инициирования. Очевидно, что хинонимины могут быть предложены в качестве потенциальных средств коррекции свободнорадикальных патологий.

- Hennig B., Chow C.K. // Free Radic. Biol. Med. 1988. Vol.4. P.99.
- Esterbauer H. // Book of abstracts inter.symp. in antioxidant and disease prevention. Stockholm, 1993. P. 53.
- Zanfey H., Sarr M.G., Burkley G.B., Cameron J.L. // Acta Physiol.Scand. 1986. Vol. 548. P. 109.
- Велена А.Х., Дубур Г.Я. // II Всесоюзный симпозиум по острой ишемии органов и ранним постишемическим расстройствам: Тез.докл. М., 1978. С. 70.
- Меерсон Ф.З., Каган В.Е., Голубева Л.Ю. и др. // Кардиология.1979. Т. 19. Вып. 8. С. 108.
- Варламов В.Т., Денисова Л.Н., Денисов Е.Т. // Докл. РАН. Физическая химия. 1993. Т. 328. С. 63.
- Варламов В.Т. // Докл. РАН. Химия. 1993. Т. 332. С. 457.
- Костюк В.А., Потапович А.И. // Вопр.мед.химии. 1987. Вып. 3. С. 115.
- Beauchamp C., Fridovich I. // Anal. Biochem. 1971. Vol. 44. P.276.
- Чумаков В.Н., Осинская Л.Ф. // Вопр.мед.химии. 1977. Вып. 5. С. 712.
- Арчаков А.И. Микросомальное окисление. М, 1975.
- Pasquali-Ronchetti I., Bini A., Botti B. et al. // Lab. Investigation. 1980. Vol. 42. P. 457.
- Slater T.F., Cheeseman K.H., Inqold K.U. // Phil. Trans. R. Soc. Lond. 1985. Vol. 311. P. 633.
- Afanas'ev I.B., Dorozhko A.I., Polozova N.I. et al. // Arch. Bioch. Bioph. 1993. Vol. 302. P. 200.
- Halliwell B., Gutteridge J.M.C. // Biochem. J. 1984. Vol. 219. P. 1.
- Фридович И. // Свободные радикалы в биологии. М., 1979. Т. 1. С. 272.

Поступила в редакцию 13.04.99.

