

ИССЛЕДОВАНИЕ IN VITRO АНТИОКСИДАНТНЫХ СВОЙСТВ ЭНОМЕЛАНИНА

Antioxidant activity of enomelanin — melanin pigment of cultural grape *Vitis Vinifera* L. — is investigated. Enomelanin effectively inhibits lipid peroxidation in rat liver microsomes. Intensity of antioxidant action of enomelanin depends on systems of activation of lipid peroxidation: NADPH-dependent lipid peroxidation is more sensitive to enomelanin, than Fe^{2+} -ascorbate-dependent.

В настоящее время уделяется большое внимание изучению биологически активных соединений природного происхождения. Меланиновые пигменты занимают среди них особое положение, поскольку встречаются почти у всех живых организмов [1]. Меланины — природные и синтетические пигменты, образующиеся в результате окислительной полимеризации тирозина, диоксифенилаланина или катехоламинов [2]. Меланины характеризуются специфической реакционной способностью, обусловленной действием многочисленных парамагнитных центров [3]. В молекулах меланинов содержится большое число *o*-гидрохинонных, *o*-хинонных и семихинонных групп, которые главным образом определяют окислительно-восстановительные свойства этих соединений [4]. Известно также, что меланины являются сильными хелатообразующими агентами и содержат ряд функциональных групп, способных связывать ионы металлов [4]. Установлено участие меланинов в окислительно-восстановительных и свободнорадикальных процессах в клетке [2,5]. Биологически важной функцией меланинов является их способность ингибировать процессы перекисного окисления липидов [6]. Известно защитное действие меланина от ионизирующей радиации [7]. Однако в указанных работах рассматривались лишь меланины бактериального или животного происхождения. Что касается растительных меланинов, то изучению их физиологической активности и механизмов ингибирования ими свободнорадикальных реакций посвящены очень немногочисленные работы [8–10]. Так, показано, что меланин, выделенный из винограда, обладает широким спектром фармакологической активности, в том числе антистрессорной [8], противосудорожной [9]. В работе [10] изучена антиоксидантная активность эномеланина, однако эффективность ингибирующего действия препарата оценивали в условиях, далеких от физиологических — по торможению процесса свободнорадикального окисления *транс*- β -каротина в растворе диоксана при 50°C.

В настоящей работе изучена антиоксидантная активность эномеланина (ЭМ) — меланинового пигмента культурного винограда *Vitis Vinifera* L. по способности тормозить перекисное окисление липидов (ПОЛ), инициированное в микросомах печени крыс и в суспензии линоленовой кислоты. Степень ингибирования эномеланином интенсивности процессов ПОЛ оценивали по количеству ТБК-активных продуктов, образующихся в среде инкубации без и в присутствии антиоксиданта различной концентрации.

Материал и методика

Антиоксидантные свойства эномеланина изучали по способности тормозить перекисное окисление липидов в микросомальной фракции печени крыс. Микросомы печени представляют собой наиболее простую систему, в которой возможно инициировать ПОЛ различными способами [11], что позволяет создавать удобную воспроизводимую модель и стандартизировать экспериментальные условия. Поэтому такой методический прием как исследование антиокислительной активности потенциальных антиоксидантов на модели инициируемого в микросомах печени ПОЛ широко используется для изучения антиоксидантных свойств различных препаратов.

Микросомальную фракцию выделяли из печени беспородные белых крыс-самцов стадного разведения, находящиеся на стандартной диете с соответствующими нормами содержания лабораторных животных. Животные брались в эксперимент после 12-часового голодания [12]. Крыс умер-

щивляли эфирным наркозом, что является наиболее безболезненным способом. Вскрывали брюшную и грудную полости и через нижнюю полую вену перфузировали печень охлажденной средой выделения (0,25 М сахараза, 0,01 М *трис*-HCl, pH 7,4) до светло-желтого цвета. Печень удаляли, взвешивали и измельчали ножницами. Все процедуры проводили при 0–+4°C. Фракцию микросом выделяли стандартным методом дифференциального скоростного центрифугирования [13]. Гомогенат приготавливали в гомогенизаторе Поттера с тефлоновым пестиком при соотношении массы ткани к объему раствора 1:4. Затем гомогенат переносили в пробирки к центрифуге PC-6 с рабочим объемом 10 мл и центрифугировали при 600 g в течение 10 мин при 0°C для осаждения неразрушенных клеток и ядер. Осадок отбрасывали, а супернатант подвергали дальнейшему 15-минутному центрифугированию при 12000 g для осаждения митохондрий. Полученный супернатант центрифугировали при 105 000 g 60 мин на центрифуге «УЦП1-35М» (Львов) для осаждения микросомальной фракции. Полученный осадок микросом промывали еще один раз средой выделения, суспендировали в ней и использовали в экспериментах.

Для того чтобы оценить влияние микросомальной системы окисления на величину антиокислительной активности эномеланина, сравнивали ингибирующую активность препарата в условиях ПОЛ, инициированного в микросомах печени с таковой в условиях ПОЛ, стимулируемого в модельной системе, содержащей только линоленовую кислоту.

Диапазон концентраций эномеланина был выбран, исходя из данных литературы [8,9,14,15]. Растворы антиоксиданта готовили на дистиллированной воде непосредственно перед применением. В работе была использована водорастворимая форма меланина из виноградной кожуры, молекулярная масса препарата 5 кД, концентрация парамагнитных центров $5 \cdot 10^{-7}$ спин • г, степень полуокисленности 0,6. К стандартной среде инкубации растворы антиоксиданта добавляли в объеме 0,1 мл. Контрольные пробы содержали такой же объем растворителя. С целью предотвращения увеличения общего объема проб предварительно уменьшали объем буфера в среде инкубации.

Среда инкубации при НАДФН-стимулируемом ПОЛ была следующего состава: 130 mM NaCl, 10 mM *трис*-HCl, pH 7,4, белок 1 мг/мл, 0,05 mM НАДФН. Реакцию начинали введением НАДФН и проводили в течение 20 мин при 37°C [16]. Время реакции соответствовало линейному увеличению количества ТБК-активных продуктов. Реакционная среда при Fe²⁺-аскорбат-зависимом ПОЛ содержала 130 mM NaCl, 10 mM *трис*-HCl, pH 7,4, белок 1 мг/мл, 0,8 mM аскорбиновую кислоту, 15 мкМ FeSO₄. Реакцию начинали внесением аскорбиновой кислоты и проводили в течение 20 мин при 37°C [16], что соответствовало линейному участку кривой зависимости образования ТБК-активных продуктов от времени реакции. Среда инкубации при спонтанном ПОЛ состояла из 130 mM NaCl, 10 mM *трис*-HCl, pH 7,4, белок 1 мг/мл. Время реакции и условия проведения были аналогичны предыдущей процедуре.

ПОЛ в суспензии линоленовой кислоты инициировали добавлением аскорбиновой кислоты (8 mM) и FeSO₄ (1 mM), время реакции 20 мин. Суспензию линоленовой кислоты готовили следующим образом: к 50 мл дистиллированной воды добавляли 50 мкл тритона X-100 и 200 мкл линоленовой кислоты, смесь тщательно встряхивали до получения однородной эмульсии.

Об интенсивности процессов ПОЛ судили по количеству ТБК-активных продуктов, определяемых по методу [17], который был выбран с учетом анализа методов определения продуктов ПОЛ, проведенного в работе [18]. Этот метод широко используется для определения продуктов ПОЛ в биологических объектах [18,19], хотя молекулярный состав ТБК-активных соединений еще полностью не выяснен. Нагревание перекисленных липидов с тиобарбитуровой кислотой при кислых значениях pH приводит к образова-

нию пигмента красного цвета [19], который является продуктом взаимодействия ТЕК с альдегидами и гидроперекисями липидов. Авторы работы [20] определили, что существует достоверная взаимосвязь между различными параметрами, используемыми для характеристики процессов ПОЛ: количеством ТЕК-активных соединений и диеновых конъюгатов, потерей полиненасыщенных жирных кислот в печени мышей, интоксцированных бромбензеном. Таким образом, было показано, что различные методы определения ПОЛ сопоставимы между собой. Процедура определения ТЕК-активных продуктов состояла в следующем: к 0,1 мл исследуемого образца добавляли 0,1 мл 8,1%-го додецилсульфата натрия; 1,5 мл 20%-й уксусной кислоты, pH 3,5; 1,5 мл 0,8%-й тиобарбитуровой кислоты; 0,8 мл дистиллированной воды. Затем пробы нагревали в течение 60 мин при 95°C на водяной бане; охлаждали проточной водой, приливали 1,0 мл дистиллированной воды; экстрагировали *n*-бутанолом (5 мл), центрифугировали при 600g в течение 10 мин. Отбирали органический слой и измеряли поглощение при 532 нм. Одновременно с величиной оптической плотности в максимуме поглощения (D_{532}) определяли показатель $\Delta D_{532-580} = D_{532} - D_{580}$, что позволяет учитывать вклад неспецифического поглощения и повышает точность измерения продуктов ТЕК-реакции. Количество ТЕК-активных продуктов рассчитывали, используя коэффициент молярной экстинкции комплекса МДА-ТЕК $1,56 \cdot 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ см}^{-1}$ с учетом коэффициента пересчета для оптического показателя $\Delta D_{532-580}$, предложенного в работе [18].

Содержание белка в митохондриальной фракции определяли методом Петерсона, представляющим собой модификацию метода Лоури для определения белка в мембранных фракциях [21]. Образцы спектрофотометрировали при 750 нм (СФ-46). В качестве стандарта использовали бычий сывороточный альбумин.

Экспериментальные данные обрабатывали статистически с подсчетом среднего арифметического и средней квадратичной ошибки среднего арифметического [22].

Результаты и их обсуждение

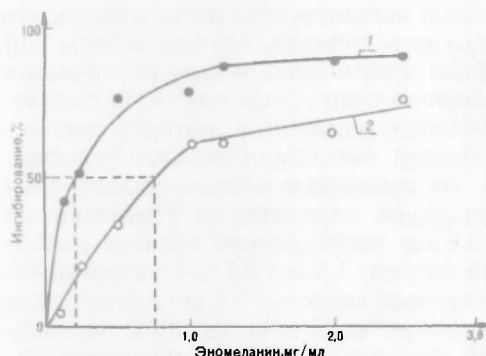
В табл. 1 представлены данные ингибирующего действия эномеланина на процесс ПОЛ в микросомах печени крыс. Как видно, эномеланин уже в достаточно низкой концентрации эффективно ингибирует спонтанное, НАДФН- и Fe^{2+} -аскорбат-зависимое ПОЛ.

Таблица 1
Влияние эномеланина на интенсивность перекисного окисления липидов в микросомах печени крыс

Концентрация антиоксиданта мг/мл	Системы окисления		
	НАДФН	Fe^{2+} -аскорбат	спонтанное
Контроль	4,5±0,3	4,1±0,2	0,70±0,08
ЭМ, 0,125	2,6±0,1	3,9±0,2	0,24±0,05
ЭМ, 0,25	2,2±0,1	3,3±0,1	0,23±0,04
ЭМ, 0,5	1,1±0,09	2,7±0,09	0,23±0,02
ЭМ, 1,0	1,0±0,07	1,6±0,09	0,19±0,03
ЭМ, 1,25	0,6±0,03	1,6±0,1	0,17±0,03
ЭМ, 2,0	0,5±0,03	1,4±0,1	0,15±0,01
ЭМ, 2,5	0,4±0,01	1,0±0,07	0,15±0,02

Примечание: представлены средние значения трех экспериментов.

Для сравнения эффективности антиокислительного действия ЭМ в различных системах индукции ПОЛ графически определяли концентрацию антиоксиданта, при которой наблюдается 50%-е ингибирование образования ТЕК-активных продуктов (рисунок). Как видно из рисунка, наиболее эффективно ингибируется НАДФН-зависимое ПОЛ, 50%-е уменьшение количества ТЕК-активных продуктов в модельной системе наблюдается при концентрации эномеланина 0,2 мг/мл. Перекисное окисление липидов, стимулированное аскорбатзависимой системой индукции, оказалось менее чувствительным к действию эномеланина (см. табл. 1, рисунок), 50%-ое ингибирование образования вторичных продуктов ПОЛ происходит при концентрации антиоксиданта 0,8 мг/мл. Обращает на себя внимание также тот факт, что спонтанное ПОЛ в микросомах печени крыс практически в одинаковой степени ингибируется при использовании различных концентраций эномеланина (см. табл. 1).

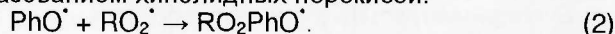


Ингибирование интенсивности перекисного окисления липидов в микросомах печени крыс различными концентрациями эномеланина:
1 – НАДФН-зависимое ПОЛ. 2 – Fe^{2+} -аскорбат-зависимое ПОЛ

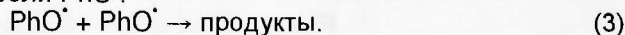
перекисными радикалами окисляющегося субстрата – принципиальная реакция, которая прежде всего определяет способность фенольных соединений тормозить цепное окисление [27]. Первичным продуктом реакции является феноксильный радикал:



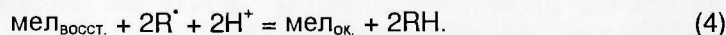
В дальнейшем феноксильные радикалы могут вступать в различные реакции [27]. От направления этих реакций зависит как набор молекулярных продуктов, так и в значительной степени эффективность антиоксиданта. Феноксильный радикал, например, может взаимодействовать с перекисными радикалами с образованием хинолидных перекисей:



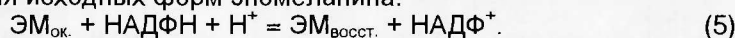
В условиях ингибированного окисления с реакцией (2) конкурируют процессы бимолекулярной гибели $\text{PhO}^\bullet$:



Реакция (3) может протекать внутри одной полимерной молекулы меланина. Поэтому, при взаимодействии с радикалами происходит окисление меланина [25]:



Этот процесс обратим, и окисленные остатки в молекуле полимерного меланина могут восстанавливаться в присутствии различных восстанавливающих агентов (например, НАДФН, аскорбата, GSH) [28]. Поэтому, основываясь на полученных данных о том, что в условиях НАДФН-индуцируемого ПОЛ значительный ингибирующий эффект эномеланина наблюдается уже при низких концентрациях антиоксиданта, мы предположили, что имеет место регенерация исходных форм эномеланина:



В свою очередь, большая эффективность ингибирующего действия эномеланина в условиях НАДФН-зависимого ПОЛ, чем активируемого системой Fe^{2+} -аскорбат, обусловлена, по-видимому, тем, что НАДФН более эффективно восстанавливает эномеланин, чем аскорбат.

Полученные *in vitro* данные об эффективном ингибирующем действии эномеланина на процессы НАДФН-стимулируемого ПОЛ хорошо согласуются с результатами экспериментов *in vivo*. Как было показано нами ранее [29], эномеланин при совместном введении с бензидином способствует уменьшению интенсивности бензидин-зависимого ПОЛ в поздние сроки наблюдений: на 30-е сут количество ТБК-активных продуктов в микросомах печени крыс, получавших бензидин совместно с эномеланином, в 3,9 раза ниже, чем в группе, которой вводили только бензидин.

Дополнительно была изучена антиокислительная активность эномеланина в модельной системе с использованием линоленовой кислоты. Как видно из табл. 2, в концентрациях 0,125 мг/мл и 0,25 мг/мл эномеланин не ингибировал, а стимулировал образование ТБК-активных продуктов. Рас-

Полагают, что механизм ингибирующего действия меланинов на процессы свободнорадикального окисления обусловлен как связыванием прооксидантных ионов в неактивные комплексы [23], так и антирадикальной активностью [6, 24]. Показано, что меланин эффективно взаимодействует с гидроксильными радикалами и гидратированными электронами [25], супероксидным анион-радикалом [26].

Как известно, меланиновые пигменты образуются при окислительной полимеризации фенолов, как содержащих азот, так и не содержащих его. Взаимодействие с

смотрим возможные реакции, приводящие к проокислительным эффектам эномеланина.

Принципиально фенолы в условиях ингибированного окисления могут взаимодействовать с гидроперекисями [27]:

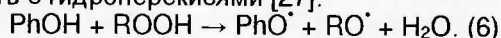


Таблица 2

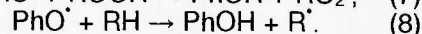
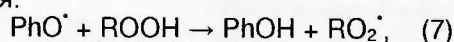
Влияние эномеланина на интенсивность перекисного окисления липидов в модельной системе, содержащей линоленовую кислоту

Концентрация антиоксиданта, мг/мл	ТБК-активные продукты, мкМ на 1 мг	% ингибирования или активирования
Контроль	1.6±0.10	—
ЭМ, 0.125	2.0±0.10	25.0 %
ЭМ, 0.25	1.8±0.07	12.5 %
ЭМ, 0.5	1.2±0.05	25.0 %
ЭМ, 1.0	1.2±0.08	25.0 %
ЭМ, 1.25	1.1±0.03	31.0 %
ЭМ, 2.0	0.7±0.02	66.0 %
ЭМ, 2.5	0.8±0.06	50.0 %

Примечание: представлены средние значения трех экспериментов.

Образующиеся в этой реакции алкоксильные радикалы частично входят в объем и могут служить дополнительным источником иницирования перекисного окисления.

К усилению интенсивности перекисного окисления при введении в среду эномеланина могут приводить также реакции с участием феноксильного радикала [27], среди которых отметим реакции радикального окисления:



Реакция (7) обратна реакции (1), ответственной за ингибирование цепного окисления. Понятно, что в случае

преобладания реакции (7) над реакцией (1) антиоксидант не может эффективно тормозить окисление.

Реакция (8), в которой сравнительно инертный феноксильный радикал замещается на активный радикал алкильного типа, приводит к регенерации цепи.

С увеличением концентрации эномеланина до 0,5 мг/мл проявляется ингибирующее действие препарата на процесс перекисного окисления линоленовой кислоты (см. табл. 2).

Таким образом, в ходе исследований по изучению антиоксидантных свойств эномеланина *in vitro* установлено, что данный антиоксидант эффективно ингибирует ПОЛ, стимулируемое в микросомальной фракции печени крыс. Интенсивность антиоксидантного действия эномеланина зависит от системы активации ПОЛ: НАДФН-зависимое ПОЛ более чувствительно к эномеланину, чем Fe^{2+} -аскорбат-зависимое.

1. Курбанов Х. Структура и функции меланосом. Ашхабад, 1985.
2. Островский М.А., Донцов А.Е. // Физиология человека. 1985. Т.11. №4. С.670.
3. Аверьянов А.А., Лапикова В.П., Петелина Г.Г. и др. // Биохимия. 1987. Т.52. №9. С.1539.
4. Sealy R.C., Felix C.C., Hyde J.S., Swartz H.M. // Free Radicals in Biology / Ed W.A. Pryor. NewYork, 1980. Vol.4. P.210.
5. Донцов А.Е., Островский М.А. // Итоги науки и техники. Сер. Физиология человека и животных. 1984. Т.28. С.127.
6. Сакина Н.Л., Донцов А.Е., Островский М.А. // Биохимия. 1986. Т.51. №5. С.864.
7. Юсифов Э.Ю., Донцов А.Е., Островский М.А. // Радиобиология. 1987. Т.27. №1. С.8.
8. Жеребин Ю.Л., Бондаренко Н.А., Малан С.Ю. и др. // Докл. АН УССР. Сер. Б. Геол. хим. и биол. науки. 1984. №3. С.64.
9. Кржжановский Т.Н., Барцевич Л.Б., Лобасюк Б.А. и др. // Бюлл. эксперим. биологии и медицины. 1986. №2. С.174.
10. Жеребин Ю.Л., Сава В.М., Колесник А.А., Богатский А.В. // Докл. АН СССР. 1982. Т.263. №1. С.112.
11. Владимиров Ю.А., Арчаков А.И. Перекисное окисление липидов в биологических мембранах. М., 1972.
12. Мэдди Э. Биохимическое исследование мембран. М., 1979. С.76.
13. Карузина И.И., Арчаков А.И. // Современные методы в биохимии. М., 1977. С.49.
14. Ковалев И.Е., Данилова Н.П., Андронати С.А., Жеребин Ю.Л. // Фармакология и токсикология. 1986. №4. С.89.
15. Подымова Н.Г., Ковалев И.Е., Жеребин Ю.Л., Андронати С.А. // Химико-фарм. журн. 1988. Т.22. №5. С.529.
16. Сакина Н.Л., Донцов А.Е., Кузнецова Г.П. и др. // Биохимия. 1980. Т.45. №8. С.1476.

17. Ohkawa H., Ohishi N., Yagy K. // *Analyt. Biochem.* 1979. Vol.95. №2. P.351.
18. Гаврилов В.Б., Гаврилова А.Р., Мажуль Л.М. // *Вопр. мед. химии.* 1982. Т.33. №1. С.118.
19. Saito M. // *Biochim. Biophys. Acta.* 1990. Vol.1046. №3. P.162.
20. Pompella A., Maellaro E., Caslini A.F. et al. // *Lipids.* 1987. Vol.22. №3. P.206.
21. Peterson G.L. // *Analyt. Biochem.* 1977. Vol.83. №2. P.346.
22. Рокицкий П.Ф. *Биологическая статистика.* Мн., 1973. С.5.
23. Лапина В.А., Донцов А.Е., Островский М.А. // *Укр. биохим. журн.,* 1985. Т.57. №1. С.12.
24. Лапина В.А., Донцов А.Е., Островский М.А., Эмануэль Н.М. // *Докл. АН СССР.* 1985. Т.280. №6. С.1463.
25. Sarna T., Pilas B., Land E.J., Truscott T.G. // *Biochim. Biophys. Acta.* 1986. Vol.883. №1. P.162.
26. Korytowski W., Kalyanaraman B., Menon I.A. et al. // *Biochim. Biophys. Acta.* 1986. Vol.882. №2. P.145.
27. Рогинский В.А. *Фенольные антиоксиданты: реакционная способность и эффективность.* М., 1988.
28. Korytowski W., Sarna T. // *J. Biol. Chem.* 1990. Vol.265. №21. P.12410.
29. Ломоносова Е.Е., Пикулев А.Т., Курченко В.П. // *Биохимия.* 1993. Т. 58. №4. С.580.

Поступила в редакцию 06.05.99.

УДК 581.132

Л. В. КАХНОВИЧ, Т. В. САМОВИЧ

ВЛИЯНИЕ 2,4-ДИХЛОРФЕНОКСИУКСУСНОЙ КИСЛОТЫ (2,4-Д) НА ПИГМЕНТНЫЙ АППАРАТ

2,4-D influence on the barley pigment apparatus has been investigated. It has been demonstrated that 20 mg/1 xenobiotics induces decreased total pigment fund in chloroplasts and changed pigment ratio in pigment-protein complexes of photosynthetic membranes.

Гербициды, применяемые в земледелии для борьбы с сорной растительностью, поступают также в культурные растения, накапливаются в почве и атмосфере. Они могут быть одинаково фитотоксичны как для сорных, так и для культурных растений. Попавшие в природную среду гербициды разрушаются как абиотическим, так и биотическим путем. Превращение гербицидов осуществляется за счет фотохимических, окислительно-восстановительных реакций и гидролиза [1]. В результате этого в растении образуются соединения с меньшей токсичностью. Инактивация 2,4-Д сопровождается как разрушением молекул гербицида, так и связыванием их с метаболитами растений до образования нефитотоксичных соединений [2].

2,4-Д—препарат системного действия — проникает в растения через корни и листья, передвигается по проводящим системам во все органы и ткани, где некоторая часть ее может превращаться в нетоксические для растения соединения, но некоторая часть оказывает ингибирующее действие на ряд биохимических реакций растения. В частности, установлено, что 2,4-Д разобщающе действует на процесс окислительного фосфорилирования митохондрий [3], нарушает азотный и белковый обмен [4]. Под действием данного препарата может изменяться активность ферментов [5], происходит гидролитический распад крахмала и белков, ингибируются процессы синтеза [6]. Чувствительность растений к 2,4-Д зависит от видовых особенностей, фазы развития и способов применения данного препарата. Многие стороны действия 2,4-Д как ксенобиотика на растения, начиная с его поступления в растительные ткани, транспорта и детоксикации, изучены детально. Однако недостаточно исследовано влияние данного препарата на фотосинтетические системы, от которых в значительной степени зависит активность основных метаболических процессов, обеспечивающих продуктивность растений.

В связи с этим исследовалось влияние 2,4-Д на формирование и состояние пигментных систем, оцениваемых по ряду показателей с учетом того факта, что ксенобиотик гербицидной природы может вызывать серьез-