

НАЦІОНАЛЬНА АКАДЕМІЯ НАУК УКРАЇНИ
ІНСТИТУТ БІОХІМІЇ ім. О.В. ПАЛЛАДИНА

На правах рукопису

ІСТОШИН ВАЛЕРІЙ МИХАЙЛОВИЧ

ТОКОФЕРОЛ, СЕЛЕН ТА ДИБУНОЛ, ЯК МОДУЛЯТОРИ ФЕРМЕНТНИХ
СИСТЕМ БІОТРАНСФОРМАЦІЇ КСЕНОБІОТИКІВ

03.00.04 - біохімія

А В Т О Р Е Ф Е Р А Т
дисертації на здобуття наукового ступеня
кандидата біологічних наук

Київ - 1996 р.

Дисертація є рукописом

Робота виконана на кафедрі біохімії Вінницького
державного медичного університета ім. М.І. Пирогова

Науковий керівник: доктор медичних наук,
професор Пентюк О.О.

Офіційні опоненти:

- доктор біологічних наук Пархоменко Ю.М.
- доктор біологічних наук Левицький Е.Л.

Провідна організація - Національний медичний університет
ім. О.О.Богомольця

Захист дисертації відбудеться " 20 " січня 1997 р.
о 14 годині на засіданні спеціалізованої вченої ради
Д 01.84.01 в Інституті біохімії ім.О.В.Палладіна НАН
України за адресою: 252601, Київ-30, вул. Леонтовича, 9.

З дисертацією можна ознайомитися в бібліотечі Інститута
біохімії ім. О.В.Палладіна

Автореферат розісланий "17" грудня 1996 р.

Вчений секретар спеціалізованої ради

кандидат біологічних наук



О.В.Кірсенко

ЗАГАЛЬНА ХАРАКТЕРИСТИКА РОБОТИ

Актуальність проблеми. Токоферол, препарати селену, синтетичні антиоксиданти знайшли широке застосування в медицині, сільському господарстві, харчовій промисловості. Властивості цих речовин вивчені досить добре і реалізуються через взаємодію з активними формами кисню, радикалами жирних кислот та ксенобіотиків (Ю.И.Губский, 1989; Е.Б.Бурлакова та співавт., 1991; А. James, 1995). Однак, дослідження останніх років показали, що вітамін Е, препарати селену - це сполуки з багатоплановим впливом на обмін речовин та фізіологічні функції, який далеко виходить за рамки антиоксидантних властивостей, їх дія торкається функціонування мітохондріальних та мікросомальних електротранспортних ланцюгів (Г.В.Донченко, 1988; M.Murray, 1991), проліферації клітин, синтезу простагландинів та лейкотриєнів (В.П.Пархомиць, Г.В.Донченко, 1992, Lui et al., 1995) та інших процесів. Розглядається окрема мембранна функція вітаміну Е, яка пов'язана з структуруванням ліпідного бішару, завдяки здатності токоферолу до взаємодії з фосфоліпідами (S.Urano et al., 1988, А.Н.Ерин та співавт., 1988; G.Burton, 1994). Не виключений і вплив токоферолу на генетичний апарат, оскільки були знайдені ядерні токоферолтранспортні білки та ядерні рецептори для токоферолу (Г.В.Донченко і співавт., 1992; K.Malecz et al., 1992; W.Cohn et al., 1992). Функції селену звичайно пов'язують з активністю глутатіонпероксидази, хоча відомі десятки інших селенових білків - феродокин та цитохром с, залізосіркопротеїн, йодтироніндейодиназа (Behne et al., 1989; B.Gomez, A.Tappel, 1989; M.Berger et al., 1994). Синтезована значна кількість речовин, що мають антиоксидантні властивості, серед яких найбільшого поширення набув бутилокситолуол (дibuнол).

В останні роки увага дослідників звернута на вивчення взаємодії антиоксидантів з ксенобіотиками (M. Cook, P. McNamara, 1980; T. Ong et al., 1989; Б.Л. Рубенчик, 1990; Н. Thompson, 1991; F. Peterson et al., 1992). Дефіцит токоферолу і селену підвищує токсичну і канцерогенну дію багатьох ксенобіотиків, а додаткове введення зменшує їх несприятливу дію на організм. Однак, мало вивчений їх вплив на активність ферментів детоксикації та метаболічної активації ксенобіотиків, стан мембран ендоплазматичного ретикулулу. Не вивчений вплив забезпеченості токоферолом на процеси індукції ферментів.

Антиоксиданти знайшли широке застосування в клінічній практиці як самостійні засоби лікування, а частіше як складова частина комплексної терапії. Однак, в їх призначенні хворим переважає емпіризм, а наукове обґрунтування застосування односторонньо акцентоване на антиоксидантних властивостях, що залишає поза увагою інші можливі напрямки використання антиоксидантів в фармакотерапії. Не в останню чергу це пов'язано з тим, що не з'ясовано, як впливає додаткове введення різних доз токоферолу, синтетичних антиоксидантів та препаратів селену на біотрансформацію, фармакологічну дію та токсичність лікарських засобів. Не вивчене питання про вплив недостатності токоферолу на біотрансформацію ліків, їх фармакологічну дію та токсичність, хоча субнормальне споживання вітамінів, в тому числі і токоферолу - це повсякденна реальність. Крім того, багато захворювань самі по собі приводять до розвитку вітамінної недостатності, що поглиблюється девітамінізуючим ефектом застосованої фармакотерапії.

Тому подальший прогрес у з'ясуванні біологічної дії вітаміну Е та селену, в розробці підходів до оптимізації

клінічного застосування антиоксидантів стає неможливим без детального вивчення їх взаємодії з ферментними системами, що метаболізують ксенобіотики, без з'ясування механізмів впливу антиоксидантів на токсичність і фармакологічний ефект лікарських речовин та токсикантів.

Мета роботи - порівняльне вивчення впливу токоферолу, селеніту натрію, дибунолу та недостатності вітаміну Е на активність ферментів метаболізму ксенобіотиків, біотрансформацію, фармакологічний ефект та токсичність речовин, що утворюють біологічно неактивні або токсичні метаболіти.

Задачі роботи:

1. Вивчити зміни в активності цитохром Р-450-залежних монооксигеназ, NADH- і NADPH-редуктаз, естераз, альдегідметаболізуючих ферментів, глутатіонзалежних ферментів печінки та легень щурів в залежності від різної забезпеченості вітаміном Е та під впливом селеніту натрію, дибунолу і фенобарбіталу.
2. Дослідити механізми стабілізуючого впливу вітаміну Е на стан мембран ендоплазматичного ретикулулу.
3. Дослідити вплив вітаміну Е, селеніту натрію і дибунолу на біотрансформацію тест-препаратів - ацетаніліду, амідспірину та бензоату натрію у щурів.
4. Оцінити фармакологічний ефект, фармакокінетику та токсичність ортофену, гепатотоксичну дію нітрозодиметиламіну під впливом вітаміну Е, селеніту натрію і дибунолу.

Наукова новизна роботи. Проведено комплексне вивчення впливу антиоксидантів на ферментні системи метаболізму ксенобіотиків в печінці та легенях, біотрансформацію ксенобіотиків у цілісному організмі, на інтегральні прояви дії

ксенобіотиків на організм - їх токсичність та фармакологічний ефект. Отримані результати експериментально обґрунтовують положення про системний вплив токоферолу, селену та дибунолу на вказані процеси.

Показано, що недостатність вітаміну Е пригнічує деметилазну, гідроксилазну, редуктазну, естеразну, альдегідгидрогеназну, глутатіонредуктазну та глутатіон-S-трансферазну активність печінки та легень щурів, зменшує рівень відновленого глутатіону і підвищує вміст окисленої його форми. При дефіциті вітаміну Е порушується фосфоліпідний спектр мембран мікросом, що призводить до зменшення їх стійкості до дії солюбілізуючих агентів. Додаткове введення токоферолу та селеніту відносно мало впливає на активність мікросомних монооксигеназ та редуктаз, однак сприяє зростанню вмісту відновленого глутатіону, активності глутатіонредуктази і глутатіон-S-трансферази. Дибунол проявляє значну активуючу дію, щодо більшості мікросомальних і немікросомальних ферментів.

Токоферол, дибунол та селеніт натрію активують процеси кон'югації ксенобіотиків з оцтовою кислотою та гліцином, гальмують утворення N-гідроксильованих метаболітів ацетаніліду. Однак, додаткове введення вітаміну Е мало впливає на мікросомні і цитозольні реакції, такі як C-гідроксильовання, N-деметильовання, гідроліз по ефірному та амідному зв'язкам, кон'югацію з глюкуроновою та сірчаною кислотами. Селеніт натрію, а особливо дибунол, активують вказані реакції. При дефіциті токоферолу гальмується перетворення бензоату, амідопіріну, ацетаніліду, але активується утворення реакційноздатних метаболітів ацетаніліду.

Вперше показано, що дефіцит вітаміну Е сповільнює виве-

дення незміненої (фармакологічно активної) форми ортофену з плазми крові і підсилює його протизапальну і ульцерогенну дію. Введення вітаміну Е мало впливає на фармакокінетику ортофена, але підвищує його фармакологічну дію внаслідок сумарної протизапальних ефектів ортофена і токоферола. Дибунол, в меншій мірі селен, проявляють протизапальні властивості і підсилюють фармакологічну активність ортофену.

Введення токоферолу, дибунолу та селеніту натрію зменшує токсичність нітрозодиметиламіну. Дефіцит вітаміну Е підсилює, а додаткове введення токоферолу зменшує, пошкоджуючу дію канцерогену на мембрани мікросом та активність ферментів. Модуляція активності ферментів метаболізму ксенобіотиків може бути одним з механізмів реалізації антитоксичної дії антиоксидантів.

Наукова та практична цінність. Отримані дані розширюють уявлення про взаємодію вітаміну Е, селену та дибунолу з обміном ксенобіотиків і експериментально обґрунтовують можливість застосування препаратів вітаміну Е, селену та дибунолу для корекції фармакологічного ефекту та токсичності лікарських речовин. Встановлені деякі закономірності взаємодії між антиоксидантами, зокрема показано, що введення дибунолу, селеніту натрію зменшує витрати вітаміну Е, а введення токоферолу та дибунолу підвищує вміст селену в крові.

Показано, що механізм дії токоферолу на активність мікросомальних ферментів реалізується через вплив на гідрофобні та полярні взаємодії і, відповідно, через модуляцію мікросточення ферментів в мембрані. При порівняно невеликому впливі селеніту натрію на активність мікросомальних ферментів метаболізму ксенобіотиків, він значно стимулює біо-

трансформацію тест-препаратів в цілісному організмі.

В клінічній практиці слід враховувати наявність у дибунолу властивостей індуктора ферментів метаболізму ксенобіотиків, що може модифікувати фармакокінетику, фармакологічний ефект та токсичність лікарських речовин, які призначаються одночасно з дибунолом.

Слід враховувати, що недостатність вітаміну Е суттєво підвищує токсичність ортофену, його ульцерогенну дію, сповільнює виведення активної форми ортофену з крові. На фоні дефіциту токоферолу послаблюється індукція ферментів під впливом фенобарбіталу, а введення фенобарбіталу зменшує забезпеченість тварин вітаміном Е. Дефіцит вітаміну Е збільшує, а додаткове введення токоферолу, дибунолу або селеніту натрію гальмує утворення реакціноздатних метаболітів.

В клінічній практиці для оптимізації фармакотерапії ортофеном доцільно його комбінувати з токоферолом та дибунолом, які підсилюють протизапальну дію ортофену, зменшуючи одночасно його ульцерогенну дію та токсичність. При призначенні хворим лікарських речовин, здатних до нітросування, доцільно застосовувати токоферол, дибунол та селеніт натрію, які зменшують шкідливий вплив нітросамінів на організм.

Розроблено доступні для впровадження в практику біохімічних лабораторій методи визначення амідопіріну та його метаболіту 4-аміноантипіріну у біологічних рідинах - авторські свідоцтва - N1691742 від 15.11.91 та N17055745 від 15.01.92, що підвищують специфічність та чутливість аналізу.

Основні результати дисертації викладені у 14 публікаціях.

Особистий внесок дисертанта в розробку наукових положень, що виносяться на захист. Пошукувачем самостійно проведені

всі експериментальні дослідження, здійснений аналіз отриманих результатів, розроблені основні положення та висновки.

ОСНОВНІ ПОЛОЖЕННЯ, ЩО ВІНОСЯТЬСЯ НА ЗАХИСТ

1. Дефіцит вітаміну Е зменшує деметилазну, гідроксилазну, редуктазну, естеразну активність мікросом, активність альдегід-метаболізуючих та глутатіон-залежних ферментів в легенях і печінці, обмежує індукуючу дію фенобарбіталу, ослаблює гідрофобні та полярні взаємодії в мембранах мікросом. Вищевказані зміни призводять до пригнічення біотрансформації тест-препаратів за рахунок гальмування реакцій С-гідроксилювання, N-деметилування, кон'югації с глюкуроновою, сірчаню, оцтовою кислотами, гліцином, до підсилення утворення глутатіонових кон'югатів.
2. Додаткове введення вітаміну Е мало впливає на активність вивчених ферментів, але в дозі 100 мг/кг токоферол дещо активує NADH- та NADPH-редуктази, естерази, глутатіонредуктазу, глутатіон-S-трансферазу, формальдегіддегідрогеназу, підвищує рівень відновленого глутатіону. Додаткове введення токоферолу дещо прискорює біотрансформацію амідопірину, бензоату, ацетаніліду, але гальмує утворення глутатіонових кон'югатів.
3. Дибунол проявляє значну активуючу дію по відношенню до більшості вивчених ферментів, прискорює біотрансформацію модельних препаратів. Селеніт натрію активує NADH-редуктазу та глутатіон-залежні ферменти, підвищує вміст відновленого глутатіону, активує реакції С-гідроксилювання, N-деметилування, реакції кон'югації тест-препаратів. Дибунол і селеніт натрію гальмують утворення реакційноздатних метаболітів ацетаніліду.

4. В умовах дефіциту токоферолу підсилюється протизапальна та ульцерогенна дія ортофену, сповільнюється його біотрансформація. При додатковому введенні токоферол, дибунол, в меншій мірі, селеніт натрію проявляють власну протизапальну дію і підсилюють (за рахунок сумачії ефектів) дію ортофену.
5. Додаткове введення вітаміну Е зменшує пошкоджуючу дію нітрозодиметиламіну по відношенню до ферментних систем печінки та мітросомальних мембран. Вітамін Е і дибунол зменшують загибель щурів під впливом нітрозодиметиламіну.

Апробація роботи. Матеріали роботи доповідались на VI Українському з'їзді біохіміків (Київ, 1992), 3 Всесоюзній конф. "Биоантиоксидант" (Москва, 1989), 4 респ. з'їзді лікарів-лаборантів (Ворошиловград, 1989), II Всесоюзному симп. "Образование канцерогенных нитрозосоединений в экосистемах" (Київ, 1990), Республіканському симп. "Монооксигеназная система" (Ташкент, 1992), на I Українській конференції "Актуальні проблеми клінічної фармакології" (Вінниця, 1993), засіданнях Вінницьких товариств біохіміків та фармакологів (1993, 1995).

Структура і обсяг роботи. Дисертація складається із вступу, огляду літератури, 5 глав власних досліджень, висновків і списку літератури, що містить 352 джерела. Дисертація викладена на 209 сторінках, містить 44 таблиці і 13 малюнків.

ЗМІСТ РОБОТИ

Матеріали, моделі та методи дослідження. Досліди проведено на 536 щурах-самцях популяції Вістар, що отримували напівсинтетичний раціон, збалансований за всіма нутрієнтами. Дефіцит вітаміну Е створювали утримуванням щурят з початковою масою 60-90 г на раціоні позбавленому вітаміну Е протя-

гом 14-15 тижнів. В окремій групі відновлювали дефіцит токоферолу, для чого щурів переводили на повноцінний раціон в останні 2 тижні дослідю. В інших групах тваринам вводили протягом 7 днів перорально альфа-токоферол ацетат - 20 і 100 мг/кг, дибунол - в дозі 80 мг/кг. Селеніт натрію вводили в дозі 30 мкг/кг (по селену) внутрішньоочеревинно.

Індукцію ферментів викликали внутрішньоочеревинним 5-денним введенням 70 мг/кг фенобарбіталу, а інгібування монооксигеназ 7-денним введенням в шлунок 100 мг/кг циметидину. Наркотичну дію тіопенталу та гексеналу оцінювали після їх внутрішньоочеревинного введення в дозах 70 та 75 мг/кг.

Ад'ювантний артрит викликали субплантарним введенням 0,1 мл повного ад'юванта Фрейнда, лікування ортофеном починали через 2 тижні (по 4 мг/кг протягом 6 днів). Фенобарбітал, циметидин, токоферол, дибунол, селеніт натрію вводили протягом 7 днів одночасно з ортофеном. Ульцерогенну дію ортофену вивчали після введення щурам в дозі 7 мг/кг ортофену протягом 5 днів, стан слизових оболонок оцінювали візуально.

Токсичність ксенобіотиків оцінювали по виживанню тварин. Ортофен вводили в шлунок в дозі 30 мг/кг (1 раз на день протягом 4-х днів), суміш амідопіріну і нітриту натрію вводили з розрахунку 100 мг/кг амідопіріну та 50 мг/кг нітриту натрію (1 раз на добу протягом 5 днів в шлунок). Токоферол, селен, дибунол починали вводити за 1-2 дні і продовжували введення до кінця дослідю. N-нітрозодиметиламін вводили перорально в дозі 10 мг/кг (2 введення з інтервалом в добу).

Біотрансформацію ацетанілідю вивчали після його внутрішньоочеревинного введення в дозі 74 мкмоль на 100 г маси. Загальну кількість метаболітів ацетанілідю в сечі (амінофе-

нольних та анілідних) оцінювали за реакцією діазосполучення, а частку амінофенольних метаболітів за реакцією утворення індофенолового барвника (И.М.Коренман, 1975). Вміст глюкуронідів визначали карбазоловим методом (H.Yuki, N.Fishman, 1963), сульфатів - турбідиметричним методом (И.А.Цевелева, 1971), після гідролізу кон'югатів бета-глюкуронідазою та арілсульфатазою. Меркаптурові кислоти визначали за реакцією з реактивом Елмана (V.Doorn et al., 1981). Метаболізм амідопірину оцінювали після його внутрішньоочеревинного введення в дозі 30 мг/кг. Метаболіти амідопірину визначали власними методами з використанням пероксидази (АС N16917442, від 15.11.1991 та АС N1705745, від 15.01.1992). Метаболізм бензойної кислоти оцінювали після її внутрішньоочеревинного введення в дозі 200 мг/кг. Вміст гіпурової кислоти в сечі визначали за реакцією з піридином (M.Ogata et al., 1981). Вміст ортофену в крові щурів визначали після внутрішньошлункового введення 30 мг/кг препарату, як описано раніше (Н.А.Станиславчук та співавт., 1989). Параметри фармакокінетики розраховували в рамках двохчастинної моделі (Л.Е.Холодов, В.П.Яковлев, 1985).

Субклітинні фракції печінки і легень отримували відомими методами (И.И.Карузина, А.И.Арчаков, 1977). Деметилазну активність визначали за утворенням формальдегіду з диметиланіліну, гідроксилазну - за утворенням 4-амінофенолу з аніліну, активність NADH- та NADPH-редуктаз (КФ 1.6.2.2 та 1.6.2.4) - за відновленням дихлорфеноліндофенолу і неотетразолію (И.И.Карузина, А.И.Арчаков, 1977). Активність альдегіддегідрогенази (КФ 1.2.1.3) та альдегідоксидази (КФ 1.2.3.1) оцінювали за зменшенням кількості оксибензальдегіду (Г.В.Холмина,

В.З.Горкин, 1979). Активність арилестерази (КФ 3.1.1.2), аліестерази (КФ 3.1.1.1) оцінювали за зменшенням концентрації фенолацетату або етилацетату (А.А.Покровский, А.И.Арчаков, 1968), в присутності прозерину або параксону. Активність ариламідази (КФ 3.1.1.1) оцінювали по гідролізу ацетаніліду (E. Neumann, R. Mentlein, 1981).

Активність гамма-глутамілтрансферази (КФ 2.3.2.2) оцінювали за вивільненням 4-нітроаніліну із гамма-глутамілнітроаніліду (G. Ceriotti, A. De Nadai-Frank, 1972-1973), глутатіон-S-трансферази (КФ 2.5.1.18) - по утворенню кон'югатів з 1-хлор-2,4-динітробензолом (ХДНБ) або по вивільненню нітриту із нітрогліцерину (W. Nabig, W. Jacoby, 1981), глутатіонредуктази (КФ 1.6.4.2) - за окисненням NADPH (R. Pinto, W. Bartley, 1969), формальдегіддегідрогенази (КФ 1.2.1.1) за зменшенням субстрату (J. Goodman, T. Terphly, 1971). Активність глутатіонпероксидази (КФ 1.11.1.9) визначали за швидкістю окислення NADPH (В.З.Ланкин, С.М.Гуревич, 1976).

Вміст токоферолу в сироватці крові визначали за реакцією Еммері-Енгеля (Ю.М.Островский, 1979), селену - кінетичним методом (О.А.Ефременко та співавт., 1985), білка - біуретовим методом (Г.А.Кочетов, 1980), фосфоліпідів - за утворенням гідрофобного комплексу з феротіоціанатом амонію (А.А.Пентюк та співавт., 1987). Фосфоліпіди розподіляли на фракції методом тонкошарової хроматографії (М.Кейтс, 1975). Пероксидацію ліпідів оцінювали за вмістом ТБК-реагуючих продуктів при стимуляції аскорбіновою кислотою або NADPH (Ю.В.Владимиров, А.И.Арчаков, 1972). В печінці та легенях визначали вміст глутатіону (K. Asaoka, K. Takahashi, 1981).

Полярні та гідрофобні взаємодії в мембранах мікросом

вивчали за допомогою мембраноактивних агентів. Бутанол додавали в інкубаційне середовище до кінцевої концентрації - 1%, дезоксихолат - 0,05%, сечовину - 2М, 6М. Обробку мікросом трипсином проводили з розрахунку 40 мкг на 1 мг білка.

РЕЗУЛЬТАТИ ДОСЛІДЖЕНЬ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

1. Вплив дефіциту токоферолу та додаткового введення токоферолу, дибунолу і селену на активність ферментів метаболізму ксенобіотиків у печінці та легенях щурів.

Нами була оцінена адекватність моделей різної забезпеченості антиоксидантами. У тварин, що отримували токоферол-дефіцитний раціон, рівень токоферолу в плазмі крові понизився в 6,9 разів, спонтанний гемоліз еритроцитів зріс з $5,14 \pm 0,53$ до 84,4%. При введенні токоферолу в дозі 20 мг/кг рівень токоферолу в плазмі підвищився в 1,32, а в дозі 100 мг/кг - 1,47 рази. Введення селену (30 мкг/кг) та дибунолу (80 мг/кг) збільшувало концентрацію токоферолу на 12 і 16%. Під впливом токоферолу (100 мг/кг) та дибунолу зростала концентрація селена у сироватці крові з $31,5 \pm 1,6$ до $40,0 \pm 0,2$ і $39,5 \pm 1,7$ нг/мл, а після введення селеніту натрію - до $43,3 \pm 2,3$ нг/мл. Це вказує на задовільне забезпечення щурів селеном і токоферолом та на збереження їх запасів в організмі при додатковому введенні інших антиоксидантів.

Дефіцит токоферолу супроводжується глибоким (більш ніж вдвічі) падінням деметилазної, гідроксилазної та редуктазної активності мікросом печінки та легень. Значно (на 30-40%) впала активність естераз і АДГ, дещо менше знижувалась активність Γ -S-T, Γ T. Активність АДО не змінювалась, а γ - Γ T - зростала. Знижувався вміст GSH і зростав рівень GS-SG. Акти-

увались процеси пероксидації ліпідів та різко змінювався фосфоліпідний спектр мікросом за рахунок зростання лізофосфатидилхоліну і зменшення фосфатидилетаноламіну. В легенях спостерігались близькі за напрямком, але менші за масштабами зміни. Відновлення дефіциту токоферолу призводило до повної або часткової компенсації порушених показників.

При додатковому введенні в дозі 20 мг/кг токоферол практично не викликав суттєвих змін показників мікросомної фракції, однак вірогідно підвищував активність Г-S-T, ГР, зменшував вміст GS-SG в печінці. В дозі 100 мг/кг вітамін E в більшій мірі впливав на вказані показники, вірогідно збільшуючи, крім того, активність ФДГ, аріл- та аліестераз. Подібний вплив спричиняв токоферол і в легенях.

Дибунол виявив властивості індуктора ферментів метаболізму ксенобіотиків (в 1,4 - 1,5 рази) зростав вміст фосфоліпідів мікросом, активність NADPH-редуктази, деметилазна та гідроксилазна активність мікросом. На 66% підвищувалась активність АДГ, в 1,4 раза - естераз. Різко зростала активність Г-S-T (на 95%), ГР (на 73%), ФДГ (на 82%), γ -ГТ (на 63%). В легенях дибунол викликав подібні зміни.

Введення селеніту натрію суттєво не впливало на активність монооксигеназ, але в печінці дещо зростала активність NADH-редуктази, а в легенях NADPH-редуктази. Активність естераз, АДГ, АДО в печінці та легенях істотно не змінювалась. Проте в печінці зростала активність ГПО (на 20%), ФДГ (на 28%), γ -ГТ (на 38%), ГР (на 37%). Менші зміни глутатіонзалежних ферментів селен викликав в легенях. Селен в більшій мірі, ніж токоферол та дибунол, сприяв підвищенню рівня GSH і GS-SG в печінці (на 31 і 45%) та легенях (на 16 і 35%).

Додаткове введення токоферолу в обох дозах сприяло підвищенню вмісту глюкуронідів та сульфату в печінці, що підвищує доступність кофакторів для кон'югації ксенобіотиків. Селеніт натрію не викликав вірогідних змін в рівні сульфатів і глюкуронідів, а дибунол, підвищуючи загальний вміст глюкуронідів та сульфатів, одночасно зменшував кількість вільного сульфату, можливо за рахунок кон'югації самого дибунолу з сульфатом, адже відомо, що метаболізм цього антиоксиданта йде шляхом кон'югації.

Показано, що недостатність вітаміну Е зменшує (майже вдвічі) активуючу дію бутанолу на активність мікосомальної NADH-редуктази і підсилює (в 1,3 - 1,5 раза) пошкоджуючу дію сечовини та трипсину, тоді як додаткове введення токоферолу протидіє цим змінам. Подібні зміни спостерігали і щодо інших ферментів, асоційованих з мембранами мікосом. При недостатності токоферолу значно зростає солюбілізація білка, фосфоліпідів і мікосомальних ферментів редуктаз, арілестерази, гідроксилази під впливом мембраноактивних речовин - дезоксихолату, трипсину. Ці дані свідчать, що при недостатності вітаміну Е значно погіршуються умови функціонування ферментів в мікосомних мембранах, змінюється гідрофобне та полярне оточення ферментів, зростає їх чутливість до дії пошкоджуючих факторів. Можливо подібні зміни і лежать в основі зменшення активності вивчених нами мікосомальних ферментів. Додаткове введення токоферолу збільшує кількість його молекул у мембрані, де він виконує роль гасника вільних радикалів та структуруючого компонента, що зменшує інтенсивність пероксидації мембранних ліпідів і стабілізує мембрану. А це забезпечує більш тривале існування активних форм ферментів.

Виявилось, що недостатність токоферолу суттєво обмежує індукуючу дію фенобарбіталу на ферменти метаболізму ксенобіотиків. Наприклад, у тварин оптимально забезпечених вітаміном Е, введення фенобарбіталу підвищувало активність деметилази, гідроксилази, NADPH-редуктази, арілестерази на 68, 62, 77 і 63%, тоді як у щурів дефіцитних по токоферолу - тільки на 44, 54, 54 і 39%, відповідно. В свою чергу, сам індуктор викликає падіння рівня токоферолу як у тварин оптимально забезпечених вітаміном Е (на 17%), так і у токоферол-дефіцитних щурів (на 50%).

Результати цих досліджень свідчать про залежність активності ферментів, що метаболізують ксенобіотики від антиоксидантного статусу тварин. Тому доцільно було дослідити, як зміни в активності ферментів позначаються на біотрансформації речовин на рівні цілого організму.

2. Вплив токоферолу, дибунолу та селену на біотрансформацію модельних тест-препаратів у щурів.

Дефіцит токоферолу сповільнює кон'югацію бензойної кислоти з гліцином. Так, в контрольній групі за 12 годин з сечею виділялось $116 \pm 3,5$ мкмоль гіпурової кислоти, а у токоферолдефіцитних тварин - тільки $90,0 \pm 4,47$ мкмоль. Додаткове введення 20 та 100 мг/кг токоферолу, 80 мг/кг дибунолу, 30 мкг/кг селену стимулює цей процес на 12, 26, 30 і 20%.

При недостатності вітаміну Е гальмується деметилювання амідопіріну до 4-аміноантипіріну та кон'югація цього метаболіта з ацетил-КоА. Так, якщо в контрольній групі за добу з сечек екскретувалось $4,27 \pm 0,098$ мкмоль загального 4-аміноантипіріну (з $12,8$ мкмоль введенного щурам амідопіріну), то у тварин з недостатністю токоферолу - тільки $2,72 \pm 0,082$

мкмоль. Кількість ацетильованого 4-аміноантипірину зменшується з $3,57 \pm 0,096$ до $2,20 \pm 0,075$ мкмоль. При додатковому введенні токоферолу в дозі 20 мг/кг не спостерігається вірогідних змін в екскреції загального та ацетильованого 4-аміноантипірину, тоді як введення вітаміну Е в дозі 100 мг/кг прискорює їх виведення на 9 і 13%. Дибунол та селен в більшій мірі підсилювали перетворення амідопірину. Так, екскреція загального 4-аміноантипірину зростала на 31 і 30%, а ацетильованого метаболіту на 40 і 34%.

При дефіциті вітаміну Е сповільнювався метаболізм ацетаніліду. Зменшувалась швидкість його С-гідроксилювання, оскільки кількість екскретованих амінофенольних метаболітів зменшувалась з $38,1 \pm 0,80$ до $24,5 \pm 0,73$ мкмоль. Падала інтенсивність гідролізу ацетаніліду по амідному зв'язку, про що свідчило зростання частки зв'язаних анілідів (з $5,6 \pm 0,33$ до $6,5 \pm 0,25$ мкмоль). Зменшувалось виведення зв'язаних амінофенольних метаболітів (з $38,1 \pm 0,80$ до $24,5 \pm 0,73$ мкмоль), що вказує на порушення реакцій кон'югації метаболітів ацетаніліду. Зменшувалось виведення сульфатних і глюкуронідних метаболітів (в контролі $31,5 \pm 0,85$ і $11,4 \pm 0,41$ мкмоль, у токоферолдефіцитних тварин - $19,7 \pm 0,84$ і $8,2 \pm 0,48$ мкмоль, відповідно). Разом з тим, у щурів з дефіцитом вітаміну Е посилюється утворення реакційноздатних метаболітів ацетаніліду в реакції N-гідроксилювання та їх екскреція у вигляді меркаптурових кислот - $2,83 \pm 0,136$ мкмоль, а в контролі з сечку екскретується $2,04 \pm 0,078$ мкмоль меркаптурових кислот.

Додаткове введення токоферолу в обох дозах практично не змінювало швидкість біотрансформації ацетаніліду, лише зменшувалась на 20% екскреція меркаптурових кислот, що можна

розцінити як здатність токоферолу гальмувати утворення реакційноздатних метаболітів. В той же час введення дибунолу викликало значне посилення метаболізму ацетаніліду. Зростала інтенсивність ароматичного гідроксилювання ацетаніліду (екскреція амінофенольних метаболітів збільшилась до $54,4 \pm 1,18$ мкмоль), швидкість його гідролізу (частка зв'язаних анілідів зменшувалась на 23%), підвищувалась кон'югація амінофенольних метаболітів з глюкуроною кислотою (на 24%) та сульфатом (на 43%). При цьому гальмувалось утворення меркаптурових кислот (на 21%). Селеніт натрію викликає подібні, але менші за масштабами зміни в біотрансформації ацетаніліду.

В загальному вигляді вплив вітаміну Е, селену та дибунолу на активність ферментів метаболізму ксенобіотиків та реакції біотрансформації тест-препаратів в організмі щурів приведено у таблиці.

3. Вплив токоферолу, дибунолу та селену на фармакологічний ефект та токсичність ксенобіотиків.

Індуктор ферментів метаболізму ксенобіотиків фенобарбітал зменшував ефект тіопенталу в 4 рази, і повністю виключав наркотичну дію гексеналу у щурів. Інгібітор мікросомальних ферментів циметидин збільшував тривалість тіопенталового сну і підсилював дію гексеналу у щурів. Додаткове введення щурам токоферолу (100 мг/кг) не викликало вірогідних змін в ефекті тіопенталу чи гексеналу.

Нестероїдний протизапальний препарат ортофен під час метаболізму в організмі утворює метаболіти, які не мають протизапальної дії, тому ефективність ортофену фактично визначається швидкістю його біотрансформації. На моделі ад'ювантного артриту встановлено, що індуктор фенобарбітал зменшу-

Вплив токоферолу, дибунолу, селену на активність ферментів
та реакції біотрансформації ксенобіотиків у щурів

ПОКАЗНИКИ	Токоферол			Дибунол	Селен, 30
	дефіцит	20 мг/кг	100 мг/кг		
Деметилаза	↓↓	0	0	↑	0
Гідроксилаза	↓↓	0	0	↑	0
NADH-редуктаза	↓↓	0	↑	↑	↑
NADPH-редуктаза	↓↓	0	↑	↑	0
Алієстераза	↓	0	↑	↑↑	0
Арієстераза	↓↓	0	↑	↑↑	0
АДГ	↓↓	0	0	↑↑	0
АДО	0	0	↑	0	0
Г-ST	↓	0	↑↑	↑↑	0
ГР	↓	↑	↑↑	↑↑	↑
γ-ГТ	↑	0	0	↑	↑
ГПО	↓	0	0	0	↑
С-гідроксилювання	↓↓	0	0	↑↑	↑
N-деметилування	↓↓	0	0	↑↑	↑↑
N-гідроксилювання	↑	↓	↓↓	↓	↓↓
Гідроліз ефірів	↓↓	0	0	↑↑	↑
Кон'югація:					
з глюкуронатом	↓↓	0	0	↑↑	↑
з сульфатом	↓↓	0	0	↑↑	↑
з ацетатом	↓	0	↑	↑↑	↑
з гліцином	↓↓	↑	↑↑	↑↑	↑

0 - без змін; ↑ - активація; ↑↑ - значна активація;

↓ - пригнічення активності; ↓↓ - значне пригнічення.

вав, а інгібітор монооксигеназ циметидин підсилював протизапальну та анальгетичну дію ортофену.

Дефіцит токоферолу призводить до сповільнення елімінації ортофену з плазми крові і підсилення його анальгетичної дії. Площа під фармакокінетичною кривою зросла з 3482 до 4796 (мкг.хв/мл), період напівелімінації з 98,2 до 130,0 хв. кліренс ортофену упав з 1,42 до 1,06 мл/хв. Додаткове введення токоферолу не змінює швидкість виведення препарату з крові і його фармакологічну дію. Токоферол, дибунол, в меншій мірі селен, гальмували розвиток ад'ювантного артриту, що свідчить про наявність у них власної протизапальної дії, а при поєднанні з ортофеном мало місце додавання протизапальних ефектів антиоксидантів і ортофену.

Ортофен, як і більшість нестероїдних препаратів проявляє ульцерогенну дію. При дефіциті вітаміну Е зростає пошкоджуюча дія ортофену на слизові оболонки травного тракту - кількість пошкоджень, з розрахунку на одну тварину, зростає до $- 10 \pm 0,82$ проти $6,1 \pm 0,65$ в контролі. В 3,5 рази збільшилась кількість важких виразок (4 ступеня). Додаткове введення токоферолу значно зменшувало кількість виразок (з $5,8 \pm 0,18$ в контролі до $2,2 \pm 0,85$) і повністю попереджувало виразки 4 та 3-го ступенів важкості. Ефективно профілакував ушкодження слизових оболонок дибунол (кількість виразок зменшилась з $6,1 \pm 0,33$ до $2,5 \pm 0,11$), але він, на відміну від токоферола, менше впливав на виразки важких ступенів. Анти-ульцерогенні властивості селену виявились незначними.

Додаткове введення токоферолу, дибунолу та селену зменшувало загибель тварин, що отримали суміш попередників нітрозодиметиламіну. Так, середня тривалість життя щурів в

контролі становила $2,0 \pm 0,38$ дня, в групах тварин, що отримували додатково токоферол, дибунол, селеніт - відповідно - $4,07 \pm 0,69$, $4,46 \pm 0,66$ та $4,40 \pm 0,62$ дні.

При дефіциті вітаміну Е підсилювалась несприятлива дія нітрозодиметиламіну (НДМА) на активність ферментів печінки щурів, тоді як додаткове введення токоферолу зменшувало її. Так, у щурів з дефіцитом токоферолу під впливом НДМА деметилазна, гідроксилазна активність зменшувались на 55-54%, а при його додатковому введенні - лише на 24%. Подібні зміни спостерігались і по відношенню до інших показників - вмісту GSH, активності глутатіонтрансферази, NADPH-редуктази.

Таким чином, проведені дослідження виявили значний вплив антиоксидантів, який проявляється не тільки на рівні ферментних систем печінки та легень, але й на рівні цілісного організму - при вивченні біотрансформації модельних препаратів, фармакологічного ефекту та токсичності ксенобіотиків, що свідчить про системний характер впливу антиоксидантів. Отримані результати обґрунтовують перспективність використання антиоксидантів як засобів корекції фармакологічного ефекту та токсичності лікарських препаратів та ксенобіотиків.

Скорочення:

АДГ- альдегіддегідрогеназа; АДО- альдегідоксидаза;
ГР- глутатіонредуктаза; ФДГ- формальдегіддегідрогеназа;
Г-S-T - глутатіон-S-трансфераза; ГПО- глутатіонпероксидаза;
γ-ГТ- гама-глутамілтрансфераза; GSH - відновлений глутатіон;
GS-SG - окислений глутатіон

ВИСНОВКИ

1. Дефіцит вітаміну Е зменшує деметилазну, гідроксилазну і редуктазну активність мікосом, активність альдегіддегідрогенази, алі- та арілестераз, глутатіон-S-трансферази, глутатіонредуктази, глутатіонпероксидази постмітохондріальної фракції печінки та легень, рівень відновленого глутатіону в легенях і печінці. Дефіцит токоферолу обмежує індукуючу дію фенобарбіталу щодо цих ферментів.
2. Додаткове введення вітаміну Е мало впливає на активність зивчених ферментів, але в дозі 100 мг/кг дещо підвищує активність NADH- та NADPH-редуктаз, естераз, глутатіонредуктази, глутатіон-S-трансферази та формальдегіддегідрогенази, рівень відновленого глутатіону.
3. Дибунол підвищує деметилазну, гідроксилазну та редуктазну активності мікосом, активність естераз, альдегідметаболізуючих та глутатіонзалежних ферментів. Селеніт натрію не змінює активність монооксигеназ, NADPH-редуктази, естераз, альдегіддегідрогенази, альдегідоксидази, однак активує NADH-редуктазу, глутатіонредуктазу, формальдегіддегідрогеназу, глутатіонпероксидазу, гама-глутамілтрансферазу та підвищує вміст відновленого глутатіону.
4. Дефіцит токоферолу послаблює гідрофобні та полярні взаємодії в мембранах мікосом, що супроводжується збільшенням сольобілізації білків, фосфоліпідів і ферментів, зростанням чутливості ферментів до дії мембраноактивних речовин. Додаткове введення токоферолу стабілізує мембрани мікосом.
5. Додаткове введення дибунолу та селену збільшує вміст токоферолу в плазмі крові, а введення дибунолу та токоферо-

лу підвищує рівень селену. Це свідчить, що в умовах надлишку одних антиоксидантів створюються умови для заощадження інших.

6. Недостатність токоферолу пригнічує біотрансформацію тест-препаратів за рахунок гальмування реакцій N-деметилування, C-гідроксилування, гідролізу, кон'югації з оцтовою, глюкуроною та сірчаною кислотами, гліцином, але підсилює виведення глутатіонових кон'югатів N-гідроксильованих метаболітів ацетанілідів (меркаптурових кислот). Введення токоферолу мало впливає на реакції C-гідроксилування, N-деметилування, гідролізу, кон'югації з глюконатом, сульфатом, тоді як введення дибунолу та селену стимулює їх. Вітамін E, селен та дибунол підсилюють реакції кон'югації з гліцином та оцтовою кислотами і гальмують утворення меркаптурових кислот.
7. Недостатність токоферолу погіршує перебіг ад'ювантного артриту у щурів, але підсилює протизапальну активність та ульцерогенну дію ортофену. При додатковому введенні токоферолу, дибунолу, в меншій мірі селену, гальмують розвиток ад'ювантного артриту, підсилюють протизапальну дію ортофену (сумація протизапальних ефектів), зменшують ульцерогенну дію та гостру токсичність ортофену.
8. Введення вітаміну E та дибунолу зменшує токсичність нітрозодиметиламіну. Дефіцит вітаміну E підсилює, а додаткове введення токоферолу зменшує пошкоджуючу дію канцерогену на мікросомальні мембрани, вміст відновленого глутатіону, активність ферментів, що приймають участь в детоксикації токсичних метаболітів канцерогену.

СПИСОК РОБІТ, НАДРУКОВАНИХ ЗА ТЕМОЮ ДИСЕРТАЦІЇ

1. Фотометрическое определение амидопирина и 4-аминоантипирина при совместном присутствии/ Журнал аналит. химии. - 1991. - т. 46. вып. 6. - с. 1230-1232 (спільно з Р. А. Мусінім, О. І. Дацюком, О. О. Пентюком)
2. Порівняльне дослідження впливу токоферолу, дибунолу та селеніту натрію на активність мікросомальних ферментів метаболізму ксенобіотиків в печінці та легенях щурів /Депоновано в УкрІНТЕІ, N245 - Ук96 від 02.12.1996.
3. Вплив дефіциту токоферолу, додаткового введення токоферолу, дибунолу та селеніту натрію на активність немікросомальних ферментів, що приймають участь в метаболізмі ксенобіотиків/ Депоновано в УкрІНТЕІ, N246 - Ук96 від 02.12.1996
4. Способ определения амидопирина в биологических жидкостях / АС N16917442. - Бюллетень N42; 15.11.1991г. (спільно з О. О. Пентюком, М. Б. Луцюком, В. І. Богомазом та ін.)
5. Способ определения 4-аминоантипирина в биологических жидкостях /АС N1705745, Бюллетень N2; 15.01.1992г. (спільно з О. О. Пентюком, Р. А. Мусінім, Г. З. Личик та ін.)
6. Антиоксидантная регуляция активности ферментов метаболизма ксенобiotиков и их биотрансформации/ Тез. докл. III Всесоюз. конф. "Биоантиоксидант", Москва, 1989. - т. 2, С. 251-252. (спільно з О. О. Яковлевою, О. О. Пентюком, Б. О. Борисенко)
7. Влияние витаминов и коферментов на токсичность нитрозодиметиламина для крыс / Матер. II Всесоюзн. симпозиума по экологической онкологии "Образование канцерогенов нитрозосоединений в экосистемах", Киев. - 1990. - С. 48-49. (спільно з О. О. Пентюком, Г. З. Личик, О. І. Штатсько/

8. Порівняльне вивчення впливу токоферолу та дибунолу на біотрансформацію ксенобіотиків / Тези доповідей VI Укр. біохім. з'їзду. - Київ. - 1992. - С.120 (спільно з О.О.Пентюком, М.Б.Луцюком, Б.О.Борисенко)

9. Некоторые мембранные механизмы регуляции активности монооксигеназ витаминами. - Тез. докл. Респ. Симпоз. "Монооксигеназная система. Теоретические и прикладные аспекты". 22-24 октября. 1992 г., Ташкент. - с.23-24 (спільно з О.О.Пентюком, В.І.Гуцолом)

10. Барьерные функции легких при экспериментальном дефиците токоферолу у крыс - Там само, с. 106-108 (спільно з О.О.Яковлевою)

11. Применение токоферолу, ретинолу, викасола и кокарбоксылазы в комплексном лечении больных ревматоидным артритом // Респ. науч. конф. "Новое в клинической фармакологии заболеваний внутренних органов" Тез. докл., Харьков, 1993. - С.113 (спільно з Р.Аль Хадуром, В.І.Райковою, Р.А.Мусінім О.В.Ільченко, О.О.Пентюком, М.А.Станіславчуком)

12. Биотрансформация тест-препаратов при различной обеспеченности крыс антиоксидантами. - Тези I Укр. наукової конференції "Актуальні проблеми клінічної фармакології" Вінниця. - 1993 - с.15-16.

13. Роль токоферолу в местной и системной защите легких - Там само. - С.141-143 (спільно з О.О.Яковлевою, О.О.Пентюком)

14. Порівняльні ефекти додаткового введення токоферолу та селеніту натрію. - Видання до 60-річчя Вінницького державного медичного університету. Вінниця, 1994. - с.144-145.

Истошин В.М. Токоферол, селен и дибунол как модуляторы ферментных систем биотрансформации ксенобиотиков. На правах рукописи, диссертация на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 03.00.04 - биохимия, Институт биохимии им. А.В.Палладина НАН Украины, Киев, 1996.

Проведено сравнительное изучение влияния токоферола, селенита натрия и дибунола на активность ферментов метаболизма ксенобиотиков в субклеточных фракциях печени и легких крыс. Изучено также состояние микросомальных мембран, биотрансформацию модельных тест-препаратов, фармакологический эффект и токсичность ксенобиотиков. Установлены общие и специфические особенности влияния антиоксидантов на вышеуказанные показатели. Экспериментально обоснована возможность применения антиоксидантов в качестве модуляторов биотрансформации, токсичности и фармакологического эффекта лекарственных веществ и токсикантов.

Istoshin V.M. Tocopherol, selenium and dibunol can modify of enzyme systems of biotransformation of xenobiotics. In the rights of the manuskript. The dissertation on degree of candidate of biological sciens (speciality 03.00.04 - Biochemistry). Palladin Institut of Biochemistry NAS, Ukrainian, Kiev, 1996.

The comparative study of influence of tocopherol, sodium selenite and dibunol on the drug-metabolising enzymes activity in subcellular fractions in rat's lung and liver was carried out. The state of microsomal membranes, biotransformation rate of model compounds, pharmacological effect and toxicity of xenobiotics were also studied. Some general and specific effects in the action of this antioxidants were found. The possibility of using of the antioxidants as modifiers of the biotransformation, toxicity and pharmacological action of drugs and toxicants was experimentally ground.

Ключові слова: токоферол, селен, дибунол, ферменти біотрансформації ксенобіотиків, ортофен, нітрозодиметиламін.