

Биохимические механизмы взаимодействия производных 1,2-бензохинона с метгемоглобинредуктазными системами эритроцитов

Экспериментально доказано наличие высокой противогипоксической активности у обладающих новизной производных 1,2-бензохинонов. Создана модель токсического повреждения кислородтранспортной системы крови. Показано наличие эффекта активации восстановления метгемоглобина 1,2-бензохинонами *in vivo*. Высказаны обоснованные предположения о механизмах образования и восстановления метгемоглобина, а также влияния на эти процессы 1,2-бензохинонов, в условиях острого отравления животных азотистокислым натрием.

Ключевые слова: гемическая гипоксия, эритроциты, метгемоглобин, 1,2-бензохиноны.

E. С. Speranskaya, E. V. Barkousky

Biochemical mechanisms of 1,2-benzoquinone interaction with erythrocyte methemoglobinreductase systems

Experimentally proved high antihypoxic action of new 1,2-benzoquinone derivatives. The original model of toxic damage oxygen transport system of blood was created. The results received have shown effect of *in vivo* methemoglobin reduction activation by new 1,2-benzoquinones. The ideas about mechanisms of methemoglobin formation, reduction and its 1,2-benzoquinone activation under acute poisoning of animals by sodium nitrite have been developed.

Key words: hemic hypoxia, erythrocytes, methemoglobin, 1,2-benzoquinones

Гипоксические состояния, возникающие в результате ограничения поступления кислорода в клетку, играют чрезвычайно важную роль в жизнедеятельности организма. Поэтому вопросы, связанные с гипоксией, выходят далеко за пределы патофизиологии, становятся социальной проблемой и требуют разработки новых эффективных методов и фармакологических средств, облегчающих адаптацию организма к гипоксии, или предотвращающих ее развитие, ускоряющих нормализацию функции в постгипоксический период.

В течение ряда лет проводилось изучение механизмов гипоксических повреждений органов и поиск фармакологических средств на основе аминопроизводных 1,2-бензохинона. Установлено, что эти соединения могут использоваться в качестве лекарственных препаратов противогипоксического [1], антиоксидантного [2] и противоопухолевого [3] действия. Поэтому необходимо, на наш взгляд, изучить влияние этих соединений на процессы токсического повреждения физиологической системы транспорта кислорода кровью.

Материалы и методы исследования

Исследуемые аминопроизводные 1,2-бензохинона были получены методом Wanzlik H.W., Januke U. [5]. Чистоту полученных соединений контролировали методом тонкослойной хроматографии, ИК-спектроскопии и элементным анализом.

Кинетические исследования с участием 1,2-бензохинонов проводили на спектрофотометре остановленного потока "D-110" фирмы "Durrum" (США) и на специально сконструированной приставке для изучения кинетики химических реакций к спектрофотометру "Specord-M40".

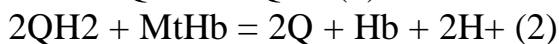
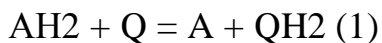
Для экспериментов *in vivo* и *in vitro* использовали мышей и кроликов, кровь и эритроциты лабораторных животных, донорскую кровь, кровь гематологических больных.

Гемическую гипоксию у животных вызывали внутривенным введением азотистокислого натрия.

Результаты и обсуждение

Было показано, что в условиях острой гемической гипоксии, вызванной у животных окислением оксигемоглобина азотистокислым натрием, аминоксигемоглобин 1,2-бензохинона обладает защитным эффектом за счет активации восстановления метгемоглобина [4,5].

С целью выяснения механизма этого эффекта нами были изучены 4 производных 1,2-бензохинона: 4-N-анилино-5-метокси-1,2 бензохинон (АМОБХ), 4-N-(п-сульфанилин) -5-метокси-1,2-бензохинон (АМОБХС), 4-(N-натрий-N-ацетилсульфамидофенил-амино)-5-метокси-1,2-бензохинон (ОБХ-130) и 4 - [N-натрий-N-(5-этил-1,3,4-тиадиазол-2-ил)] сульфамидо-5-метокси - 1,2-бензохинон (ОБХ-136). Мы предположили, что в условиях нарушения естественных физиологических метгемоглобинредуктазных систем эти вещества осуществляют перенос электронов от восстановителей (аскорбиновой кислоты, глутатиона и NADH) за счет циклического восстановления - окисления на трехвалентное железо метгемоглобина восстанавливая его до феррогемоглобина в соответствии со схемой:



С целью изучения возможности протекания реакции (1) была исследована способность 1,2-бензохинонов восстанавливаться полярографически на ртутном капельном электроде. На полярограммах этих соединений присутствует единственная волна, характеризующая обратимый процесс. Сравнение значений E_0 для 1,2-бензохинонов (от 0,18 у АМОБХ до 0,22 В у ОБХ-136) со значениями E_0 для эндогенных редокс - систем показало, что ОБХ могут выступать в качестве окислителей для важных биологических субстратов таких, как аскорбат - дигидроаскорбат (0,08 В), глутатион (восстановленный) - глутатион (окисленный) (-0,23В), NAD(P)H - NAD(P)⁺ (-0,32В), а также находиться в окислительно-восстановительном равновесии с системой гемоглобин - метгемоглобин.

Изучение возможности протекания реакции (2) в анаэробных условиях показало, что диоксибензолы эффективно восстанавливают трехвалентное железо метгемоглобина. Кинетика подчиняется закономерностям реакции второго порядка. Константы скоростей реакций (k_2) представлены в таблице 1. В таблице также представлены значения констант скоростей обратной реакции окисления феррогемоглобина 1,2 бензохинонами (k_{-2}). Скорость этой реакции значительно ниже скорости восстановления метгемоглобина.

Таблица 1

Кинетические параметры реакции взаимодействия 1,2-бензохинонов и 1,2-диоксибензолов с гемопропротеидами

Вещество	$k_2 \cdot 10^4 \text{ M}^{-1}\text{c}^{-1}$	$k_{-2} \text{ M}^{-1}\text{c}^{-1}$
АМОБХ	1,20	0,42
АМОБХС	0,11	0,89
ОБХ-130	0,96	0,85
ОБХ-136	1,50	0,41

где k_2 - константа скорости восстановления метгемоглобина а k_{-2} - окисления гемоглобина

Известно, что восстановление производных 1,2-бензохинона в биологических системах NADH и NADPH реализуется, главным образом, ферментативно соответствующими оксидоредуктазами [6]. В связи с этим мы изучили возможность протекания такой ферментативной реакции в гемолизате эритроцитов. Исследование кинетики реакции и ингибиторный анализ показали, что 1,2-бензохиноны ферментативно восстанавливаются флавопротеидом - цитоплазматической NADH-цитохром в5 редуктазой. Кинетические параметры ферментативной реакции константа Михаэлиса (K_m) и максимальная скорость (V_m) представлены в таблице 2.

Таблица 2

Кинетические параметры ферментативной реакции восстановления 1,2-бензохинонов NADH-цитохром в5 редуктазой

Вещество	$V_m \text{ мкМ/с г}$	$K_m, \text{мкМ}$	
		NADH	ОБХ
АМОБХ	25,0	81,96	1000,0
АМОБХС	200,0	71,40	1110,0
ОБХ-130	125,0	94,34	1110,0
ОБХ-136	125,0	94,34	1110,0

Из таблицы видно, что все изученные вещества имеют близкие значения K_m по хинону и по NADH, но разные значения V_m , что обусловлено различными электронакцепторными свойствами и полярностью молекул 1,2-бензохинонов.

Таким образом, результаты исследования кинетических закономерностей ферментативного восстановления хинонов и взаимодействия диоксибензолов с метгемоглобином свидетельствуют о возможности опосредованного хинонами переноса восстановительных эквивалентов с NADH на метгемоглобин в реальных физиологических условиях.

Для подтверждения такой возможности были изучены реакции восстановления $MtHb$ в гемолизате эритроцитов - системе, моделирующей условия *in vivo*. Установлено, что все указанные вещества активируют NADH-зависимое восстановление метгемоглобина. Причем скорость реакции восстановления в значительной степени зависит от структуры 1,2-бензохинона и определяется их электронакцепторными свойствами.

Так, максимальное значение скорости восстановления метгемоглобина у ОБХ-136 (65,49 мкМ /с гНв), минимальное - у АМОБХ (14,70 мкМ /с гНв); для АМОБХС она составляет 47,84 мкМ /с гНв, для ОБХ-130 - 44,22 мкМ /с гНв. Анализ кинетики суммарной реакции показал, что лимитирующей стадией процесса является ферментативное восстановление 1,2-бензохинонов до диоксибензолов, которые затем неферментативно передают восстановительные эквиваленты на трехвалентное железо метгемоглобина.

Завершающим этапом работы явилось определение эффективности 1,2-бензохинонов при восстановлении метгемоглобина *in vivo* и выяснение механизма их защитного действия при остром отравлении животных азотистокислым натрием.

В экспериментах на кроликах, которым вводился азотистокислый натрий (40 мг/кг), было показано, что скорость восстановления метгемоглобина в крови увеличивается на 20 и 39% по отношению к контролю при введении им ОБХ-136 в дозах 50 и 100 мг/кг соответственно (таблица 3).

Таблица 3

Содержание метгемоглобина в крови кроликов при введении им азотистокислого натрия и ОБХ-136

Контроль (г%) (нитрит 40мг/кг)		ОПЫТ (г%) (нитрит 40мг/кг + ОБХ 50мг/кг)		ОПЫТ (г%) (нитрит 40 мг/кг + ОБХ 100мг/кг)	
Мак уровень MtHb	Уровень MtHb через 60 минут	Мак уровень MtHb	Уровень MtHb через 60 минут	Мак уровень MtHb	Уровень MtHb через 60 минут
4,23±0,15	2,41±0,18*	4,33±0,21	1,6±0,13*	4,27±0,09	0,77±0,24*

* - статистически достоверные изменения ($p < 0,05$)

Изучение влияния 1,2-бензохинонов на выживаемость в условиях отравления азотистокислым натрием показало, что она увеличивалась при введении ОБХ-130 (доза 150 мг/кг) на 27%, а - ОБХ-136 (доза 100 мг/кг) на 17% по сравнению с контрольными животными (без введения хинонов) [5]. Причем это увеличение идет за счет практически 100% выживаемости опытных животных в период восстановления уровня оксигемоглобина в крови до нормы (50 - 120 минут после введения NaNO_2), в то время, как в остром периоде гемической гипоксии (1 - 50 минут после введения NaNO_2) препараты не проявляли защитного эффекта.

Выводы.

1. Производные 1,2-бензохинона эффективно восстанавливаются в присутствии NADH и цитоплазматической NADH-цитохром b5 редуктазы эритроцитов до 1,2-диоксибензолов.
2. Производные 1,2-диоксибензола способны восстанавливать метгемоглобин путем обычной химической реакции передачи электрона на трехвалентное железо.
3. В условиях гемолизата, 1,2-бензохиноны активируют процесс восстановления метгемоглобина за счет скорость лимитирующей NADH-зависимой ферментативной реакции образования диоксибензолов и последующего неферментативного восстановления ими метгемоглобина.
4. Производные 1,2-бензохинона (ОБХ-136) увеличивают скорость восстановления уровня оксигемоглобина *in vivo* в условиях острого отравления азотистокислым натрием и оказывают защитное действие на животных в условиях острой гемической гипоксии, вызванной отравлением азотистокислым натрием. Причем эффект реализуется в период восстановления кислородтранспортной функции крови.

Литература

1. Лунец Е.Ф. Исследование патологических реакций, развивающихся в ткани головного мозга при острой ишемии: Дис...д-ра.мед.наук: 14.778. - Москва, 1971. - 320с.
2. Костюк В.А., Лунец Е.Ф. . Ингибирование производными о-бензохинона перекисного окисления липидов в микросомах печени.// Биохимия. - 1983. - Т.48. - N 9. - С.1491 - 1494.
3. Сперанский С.Д., Зорин В.П., Погирницкая А.В., Сперанская Е.Ч. Изучение механизма токсического действия 1,2-бензохинонов на опухолевые клетки // Экспериментальная онкология. - 1991. -Т.13. - N 3. - С.55-58.
4. Сперанская Е.Ч. Активация восстановления метгемоглобина 1,2-бензохинонами // Молекулярно-клеточные основы функционирования биосистем: // 2 съезд Белорусского общества фотобиологов и биофизиков. Тез. докл. Съезда. - Минск, 1996.
5. Сперанский С.Д., Полюхович Г.С., Сперанская Е.Ч., Терещенко С.М. Сравнительное изучение активности противогипоксических средств при гемической гипоксии // Экспериментальная и клиническая фармакология. - 1992. - Т.55. - N 4. - С.38-40.
6. Титовец Э.П. Окисление некоторых субстратов при участии NAD(P)H-зависимых оксидоредуктаз и 4-(анилин)-5-метокси-1,2-бензохинона с переносом восстановительных эквивалентов на кислород. // Биохимия. - 1978. - Т.43. - N 8. - С.1377-1380.
7. Лунец Е.Ф., Сперанский С.Д., Сперанская Е.Ч. Определение активности NADH - метгемоглобинредуктазы с помощью аминокпроизводных орто-бензохинона. // Вопр.мед.химии. - 1987. - Т.33. - N 3. - С.126-129.