

Н.А. Бизунок¹, Б.В. Дубовик¹, Г.И. Полозов², О.И. Шадыро²

**АНТИОКСИДАНТНЫЙ ПОТЕНЦИАЛ СЕРОСОДЕРЖАЩИХ СТРУКТУРНЫХ
АНАЛОГОВ α -ТОКОФЕРОЛА НА МОДЕЛИ РЕСПИРАТОРНОГО ВЗРЫВА
ФАГОЦИТОВ**

¹ УО «Белорусский государственный медицинский университет»,

² УО «Белорусский государственный университет»

Установлены количественные закономерности ингибирующего действия α -токоферола и ряда его оригинальных структурных аналогов на модели генерации активных форм кислорода (АФК) в макрофагах; показано, что появление в молекуле аналогов α -токоферола атома серы не повышает их антиоксидантный потенциал в сравнении с прототипом.

Ключевые слова: α -токоферол, активные формы кислорода, макрофаги.

N.A. Bizunok, B.V. Dubovik, G.I. Polozov, O.I. Shadyro

**α -TOCOPHEROL AND RELATED COMPOUNDS MODULATE THE REACTIVE
OXYGEN SPECIES GENERATION BY PHAGOCYTES**

Effects of α -tocopherol and a number of the respective sulfur-containing analogues on reactive oxygen species (ROS) generation by macrophages were studied. The test compounds were found to inhibit ROS production by macrophages in dose dependent manner. The presence of a sulfur atom in structures of the respective analogues did not increase its activity versus α -tocopherol.

Key words: α -tocopherol, reactive oxygen species, macrophages.

Несмотря на веские теоретические предпосылки и многочисленные экспериментальные доказательства эффективности фенольных соединений различной структуры при свободнорадикальной патологии, клинический опыт их применения разочаровывает. Причины неудач многообразны. Одной из них является представление о полифенолах, как «универсальных» антирадикальных агентах, способных ингибировать любые свободнорадикальные реакции *ex vivo*. Действительно, в модельных химических системах показано, что блокирование фенолами окислительных процессов обусловлено их способностью восстанавливать кислород-центрированные органические радикалы до гидропероксидов, давая при этом стабильные, мало активные феноксильные радикалы (PhO•). В то же время, участие фенолов в регуляции процессов окисления, протекающих в сложных биосистемах, не столь однозначно и требует дополнительного изучения на доказательных моделях. В этой связи представляется интересным испытание ряда серосодержащих аналогов α -токоферола на модели респираторного взрыва фагоцитов – одного из важнейших источников оксидантного стресса в

организме млекопитающих. Предварительные исследования показали, что эти соединения модулируют свободнорадикальные превращения, протекающие с участием кислород- и углерод-центрированных радикалов при радиоллизе гексана и этанола [3, 6].

Методы исследования

Исследования проведены на изолированных перитонеальных макрофагах крыс-самцов линии Вистар массой 180–220 г. Клетки получали промыванием брюшной полости 20 мл среды Хенкса с гепарином (10 ЕД/мл), отмывали и ресуспендировали в бесцветной среде Хенкса. Полученная суспензия содержала более 98% жизнеспособных клеток по результатам теста с трипановым синим (0.1%), при дифференцированном подсчете которых в окрашенных мазках макрофаги составляли около 90%.

Макрофагальную продукцию оксидантов исследовали методом люминолзависимой хемилюминесценции (ХЛ) в условиях взрывной генерации АФК на люминометре LKB-Wallac 1251–002 (Финляндия).

В работе использовали α -токоферол (α -ТсОН) фирмы «Aldrich»; структурные формулы исследованных соединений представлены в таблице 1. Серосодержащие аналоги α -токоферола синтезированы на кафедре радиационной химии и химико-фармацевтических технологий БГУ, строение полученных соединений подтверждалось данными масс- и ЯМР-спектроскопии, чистота субстанций составляла не менее 99% по данным ТСХ и ГЖХ.

Генерацию АФК оценивали после 10-минутной инкубации клеток с изучаемым агентом в интервале концентраций 10^{-9} – 10^{-4} М при температуре 20–25 °С; контрольные пробы агентов не содержали. Каждый опыт проводился на клетках одного животного и включал группу проб, содержащих индуктор фагоцитоза, в которых оценивали индуцированную хемилюминесценцию (ИХЛ), и группу проб, лишенных индуктора, для регистрации спонтанной хемилюминесценции (СХЛ). При исследовании ИХЛ проба содержала в 1 мл бесцветной среды Хенкса: 10^6 жизнеспособных макрофагов, люминол ($7 \cdot 10^{-5}$ М), опсонизированный зимозан ($5 \cdot 10^7$ частиц), который вносили непосредственно перед регистрацией свечения, изучаемое вещество (10^{-9} – 10^{-4} М); в контрольные пробы добавляли эквивалентное количество среды.

Люминесценцию регистрировали поочередно в пробах, содержащих изучаемый агент, и контрольных, при постоянной температуре (37 °С), в дискретном режиме с интервалом 2–3 мин на протяжении 30 мин. Продукцию АФК оценивали по площади под кривой ХЛ (AUC) и площади под кривой ХЛ, исключая фоновое свечение клеток (DAUC). Последний показатель отражает вклад НАДФН-оксидазы фагоцитов (Nox2) в продукцию общего пула АФК.

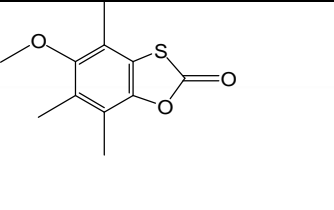
Показатели ХЛ проб, содержащих изучаемые агенты, выражали в % к контрольным. Количество повторных опытов варьировало от 3 до 6. Статистическую обработку результатов проводили с использованием парного t-критерия, различия считали достоверными при вероятности ошибки < 5%. Антиоксидантную активность соединений оценивали по степени подавления ХЛ, вычисляя эффективные ингибирующие концентрации (IC₁₆ – IC₈₄) методом регрессионного анализа с использованием программного пакета «Statistica 6,1» и математических преобразований по Chou [5].

Таблица 1. Перечень исследованных соединений

Шифр	Структура	Название	Диапазон [C] ¹ , М
α-ТсОН		2,5,7,8-Тетраметил-2-(4,8,12-триметил-ридецил)хроман-6-ол (α-токоферол)	10 ⁻⁹ -10 ⁻⁵
C1		6-Гидрокси-1,4-бензоксантиин-2(3H)-он	10 ⁻⁹ -10 ⁻⁵
C2		6-Метокси-1,4-бензоксантиин-2(3H)-он	10 ⁻⁷ -10 ⁻⁴
C3		6-Гидрокси-5,7,8-триметил-1,4-бензоксантиин-2(3H)-он	10 ⁻⁹ -10 ⁻⁵
C4		6-Метокси-5,7,8-триметил-1,4-бензоксантиин-2(3H)-он	10 ⁻⁷ -10 ⁻⁴
C5		6-Гидрокси-3,5,7,8-тетраметил-1,4-бензоксантиин-2(3H)-он	10 ⁻⁸ -10 ⁻⁵

¹ Диапазон изученных концентраций, моль/л.

C6		2-(6-Гидрокси-5,7,8-триметил-2-оксо-2,3-дигидро-1,4-бензоксантиин-3-ил) уксусная кислота	$10^{-8}-10^{-5}$
C7		5,7,8-Триметил-2,3-дигидро-1,4-бензоксантиин-6-ол	$10^{-8}-10^{-5}$
C8		2,5,7,8-Тетраметил-2,3-дигидро-1,4-бензоксантиин-6-ол	$10^{-8}-10^{-5}$
C9		2-(Гидроксиметил)-5,7,8-триметил-2,3-дигидро-1,4-бензоксантиин-6-ол	$10^{-8}-10^{-5}$
C10		2-(2,5-Дигидрокси-3,4,6-триметилфенилтио) уксусная кислота	$10^{-9}-10^{-4}$
C11		2-(2,5-Дигидроксифенилтио) уксусная кислота	$10^{-9}-10^{-4}$
C12		5-Гидрокси-1,3-бензоксатиол-2-он	$10^{-9}-10^{-5}$
C13		5-Гидрокси-4,6,7-триметил-1,3-бензоксатиол-2-он	$10^{-9}-10^{-5}$
C14		5-Гидрокси-1,3-бензоксатиол-2-тион	$10^{-7}-10^{-5}$
C15		5-Гидрокси-4,6,7-триметил-1,3-бензоксатиол-2-тион	$10^{-7}-10^{-5}$
C16		5-Метокси-1,3-бензоксатиол-2-он	$10^{-7}-10^{-4}$

C17		5-Метокси-4,6,7-триметил-1,3-бензоксатиол-2-он	10^{-8} - 10^{-5}
-----	--	--	-----------------------

Результаты и обсуждение

Антиоксидантная активность α -токоферола в клеточном тесте относительно невысока (таблица 2), что характерно для действия токоферолов в гетерогенных системах, содержащих структурированные липиды, к которым относится и наша модель. Этот феномен объясняется тем, что в подобных условиях α -токоферол действует в водной фазе, куда вытесняются пероксидные радикалы и где подвижность атома водорода гидроксильной группы снижена из-за сильного сольватационного эффекта воды, а также склонностью α -токоферола накапливаться в липидах, что ведет к снижению его реальной концентрации в водной фазе по сравнению с расчетной величиной [2]. Кроме того, при взаимодействии с пероксидами α -токоферол превращается в α -Тс-О-радикалы, которые за счет раскрытия пиранового цикла и внутримолекулярной перегруппировки трансформируются в углерод-центрированные интермедиаты, окисляющие биосубстраты [3].

Известно, что способность производных 2,2,5,7,8-пентаметилхроман-6-ола ингибировать перекисное окисление липидов в биомембранах тем ниже, чем больше длина фитильной цепи молекулы [4]. Изученные нами соединения не содержали фитильной цепи, а также имели в составе молекулы атом серы по 4- положению у бензоксантиинов (C1-C9), и 3- положению у бензоксатиолов и бензоксатионов. Соединения C10 и C11 – производные фенилтиоуксусной кислоты – использованы для сравнения.

В результате исследования установлено, что активность одних соединений (C1, C8, C11, C16) сопоставима с таковой α -токоферола, других (C2 и C10) – на порядок ниже, большая часть обладает еще меньшей активностью, либо не проявляет антиоксидантных свойств (C4, C6, C15, C17) (таблица 2).

Таблица 2. Эффективные ингибирующие концентрации α -токоферола и его серосодержащих аналогов (IC_{16} - IC_{84} , мкмоль/л)²

² Указано среднее значение и доверительный интервал.

Фр	AUC XЛ			DAUC XЛ		
	16	50	84	16	50	84
OH	0,4 (0,1÷1,2)	8,8 (2,8÷27,8)	—	0,3 (0,1÷0,8)	6,1 (1,9÷19,5)	—
C1	1,4 (0,7÷2,9)	5,7 (2,8÷11,8)	—	1,2 (0,6÷2,6)	4,5 (2,1÷9,7)	—
C2	5,0 (1,6÷16,1)	37,0 (11,4÷119,0)	—	4,0 (0,9÷16,8)	32,0 (7,5÷134,0)	—
C3	3,3 (1,2÷8,8)	—	—	2,1 (0,8÷5,5)	8,9 (3,4÷23,0)	—
C4	NI ³	—	—	NI	—	—
C5	29,0 (7,5÷113,0)	—	—	20,0 (4,6÷89,0)	—	—
C6	NI	—	—	NI	—	—
C7	4,5 (1,9÷10,7)	—	—	0,09 (0,03÷0,3)	5,1 (1,7÷15,3)	—
C8	0,7 (0,3÷1,7)	—	—	0,2 (0,1÷0,3)	1,9 (1,2÷3,1)	—
C9	8,0 (4,1÷15,8)	—	—	0,04 (0,01÷0,1)	0,8 (0,3÷2,4)	—
C10	5,7 (4,6÷7,0)	22,0 (18,0÷27,1)	86,0 (70,2÷105,0)	2,9 (0,8÷10,4)	6,0 (1,7÷21,6)	13,0 (3,5÷44,8)
C11	1,1 (0,7÷1,7)	7,7 (5,1÷11,6)	53,0 (34,8÷79,4)	1,0 (0,4÷2,6)	3,3 (1,3÷8,7)	11,0 (4,3÷29,8)
C12	2,0 (1,2÷3,5)	16,0 (9,2÷27,0)	—	2,6 (1,3÷5,3)	14,0 (6,8÷28,3)	—
C13	5,6 (1,1÷29,0)	—	—	4,7 (0,8÷28,3)	—	—
C14	0,6 (0,4÷0,9)	—	—	0,2 (0,1÷0,4)	12,0 (7,2÷21,5)	—
C15	NI	—	—	NI	—	—
C16	0,3 (0,05÷1,2)	5,7 (1,2÷27,8)	130,0 (27,6÷634,0)	0,5 (0,1÷2,0)	22,0 (5,8÷80,6)	—
C17	NI	—	—	NI	—	—

Активность соединений в клеточной системе зависит от характера и местоположения заместителей в хромановом фрагменте молекулы. Интересно, что соединения C2 и C16, содержащие карбонильную группу, но лишённые гидроксильной, проявляют заметные

³ Не ингибирует в исследованном диапазоне концентраций.

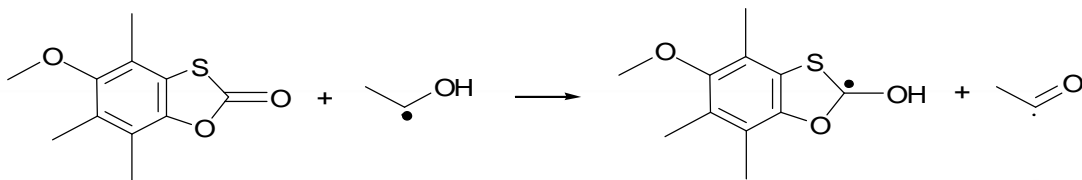
антиоксидантные свойства в исследованном диапазоне концентраций. Подобный факт зафиксирован нами ранее при скрининге ди-трет-бутильных производных фенола и пирокатехина [1].

Вне зависимости от исходной активности соединения, появление метильных заместителей в положении 5-,7- и 8- у бензоксантиинов и 4-,6-,7- у тиольных и тионных аналогов приводит к снижению или полной утрате антиоксидантных свойств (пары C1 — C3, C12 — C13, C14 — C15, C16 — C17). Возможно, это происходит за счет увеличения электронной плотности у атома кислорода гидрокси- группы и её экранирования, что является следствием появления в молекуле электронодонорных заместителей. Следует отметить, что 2-(2,5-дигидроксифенилтио) уксусная кислота (C11) и её 3,4,6-метилованное производное (C10) существенно не различаются по активности в отношении Nox2-зависимой генерации АФК, в отношении общей продукции оксидантов (AUC ХЛ) C10 уступает в активности C11.

Таким образом, способность соединения действовать в качестве восстановителя (донора протонов), обеспечивает его антиоксидантный эффект в нашей модельной системе. Этот механизм является ведущим при перехвате кислород-центрированных радикалов, которыми насыщена окружающая активированный фагоцит среда [6].

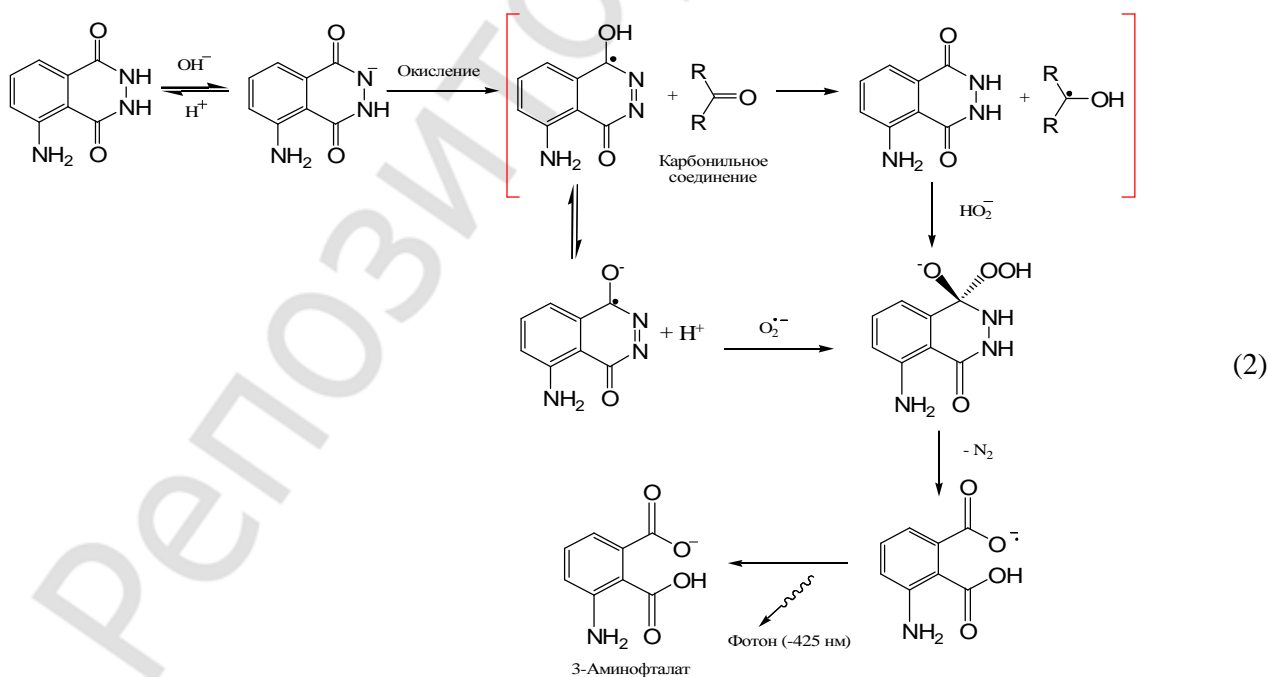
Ранее в тесте радиолита н-гексана показано, что антиокислительная эффективность таких соединений, как C7 и C8 в отношении как алкильных, так и пероксильных радикалов одинакова при 10^{-3} М и сопоставима с таковой α -токоферола, тогда как другие (C3, C13) менее эффективны в отношении алкильных радикалов или не проявляют антиоксидантных свойств (C17) в этом тесте [3, 6]. Последний эффект авторы исследования объясняют неспособностью соединений, не имеющих свободной гидроксильной группы, выступать в качестве восстановителей. Что касается несущих гидроксил агентов, то их антиоксидантный потенциал в отношении алкильных радикалов снижается по мере увеличения энтальпии гомолитической диссоциации связи O–H (BDE). Эти данные в целом коррелируют с нашими результатами – менее эффективными оказались соединения с большими значениями BDE.

В тесте радиолита раствора этанола, протекающего с образованием α -гидроксилсодержащих углерод-центрированных радикалов, метилированные карбонильные соединения (например, C3, C13, C17), напротив, более эффективны как ингибиторы выхода радикальных продуктов. [3, 6]. Для реализации в этом случае антирадикальной активности карбонильных соединений наличие гидрокси- группы не является обязательным (C17), они работают как окислители, отрывая протон у α -гидроксиэтильных радикалов (1):



Соединение С17 представляет собой метоксильное производное С13, которое обладает некоторой антиоксидантной активностью в клеточной системе. С17 в исследованном диапазоне концентраций его не проявляет, однако, выраженной антиоксидантной активностью обладает С16 – деметилированный аналог С17, который также не имеет гидроксила, а значит, его антиоксидантный эффект можно объяснить только реализацией реакций, подобных вышеприведенной (1). Аналогично работала пара С1—С2.

Отсутствие обнаружимого эффекта соединения С17, можно объяснить, если учесть, что в сложных биосистемах, к которым относится наша модель, генерируются углерод-центрированные радикалы сложных органических молекул, поэтому наличие дополнительных экранирующих групп, таких как метильные, у радикальных ловушек может вести к стерическому затруднению их взаимодействия с радикальными интермедиатами. Подавление люминесценции фактически отражает взаимодействие углерод-центрированного радикального продукта самого люминофора, который представляет собой гетероциклическое органическое соединение – 5-амино-2,3-дигидро-1,4-фталазиндион, с ловушками таких радикалов и регенерацией молекул люминофора без испускания световых квантов по схеме (2):

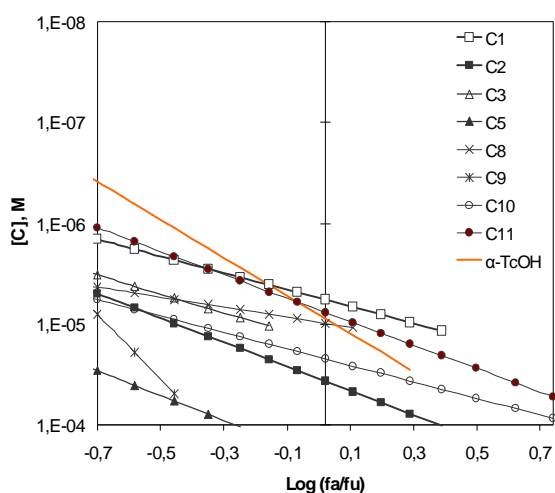


⁴ Цитируется по [3] в нашей модификации.

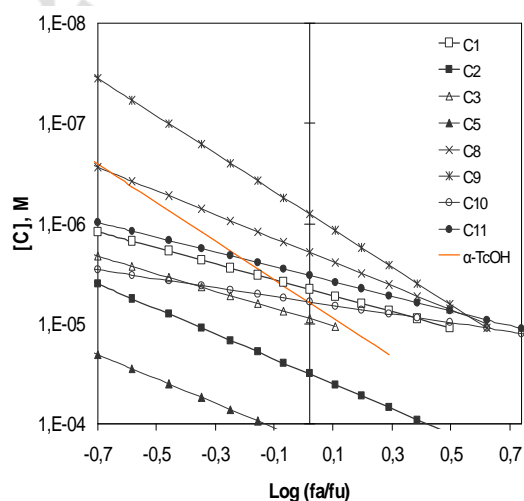
Учитывая, что концентрация люминола в тест-системе составляет порядка 50 мкМ, эффект соединений, вступающих в такое взаимодействие, будет проявляться только при достаточно высоких концентрациях, что и обнаружено в наших экспериментах.

Сравнительный анализ влияния исследованных соединений на совокупную (по AUC) и Nox2-зависимую (по DAUC) продукцию АФК показывает, что потенциальные ловушки O-центрированных радикалов более активны в последнем случае. Это вполне закономерно, учитывая изменение спектра, генерируемых АФК и вторичных радикальных продуктов при активации ферментов семейства Nox.

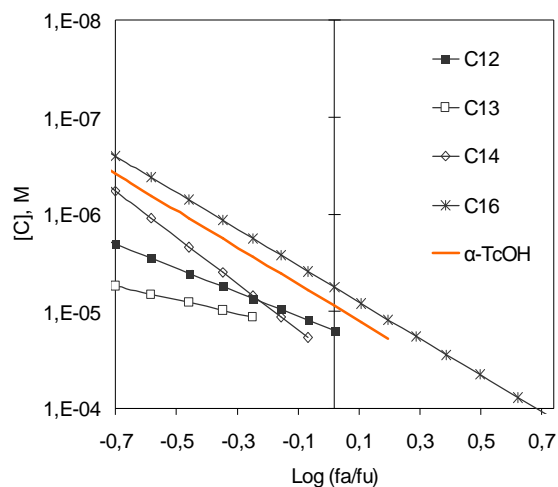
Большинство исследованных соединений уступают α -токоферолу в активности, но демонстрируют большую крутизну зависимости «концентрация-эффект» (Рис. 1), что может иметь двоякое значение. С одной стороны, увеличение угла наклона делает ответ более предсказуемым и облегчает управление эффектом, с другой, может увеличивать токсические риски.



A.



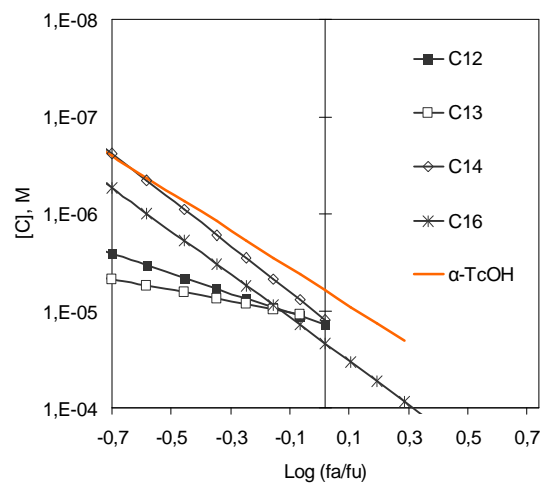
B. B.



C.

AUC%

(Совокупная генерация АФК)



D.

DAUC%

(Nox2-зависимая генерация АФК)

Рис. 1. Распределение медианного эффекта при действии соединений серии «C1-C17» на модели зимозан-индуцированного респираторного взрыва макрофагов (по Chou [5])

Log (fa/fu) – логарифм отношения эффективной к неэффективной фракции; [C], М – концентрация вещества в моль/л; AUC обозначает действие в отношении совокупного пула АФК, генерируемого активированными фагоцитами; DAUC – действие в отношении Nox2-ассоциированной части АФК. Структурные формулы соединений представлены в таблице 1.

Выводы

1. Активность структурных аналогов α -токоферола, для которых характерно наличие атома серы в хромановом фрагменте молекулы и отсутствие фитильной цепи, не превышает активность прототипа на модели респираторного взрыва фагоцитов.
2. Серосодержащие аналоги α -токоферола – потенциальные ловушки кислород-центрированных радикалов – более активны в отношении Nox2-зависимой генерации АФК в фагоцитах.
3. На модели фагоцитарной генерации АФК в условиях *in vitro* эффективны ингибиторы углерод-центрированных радикалов – соединения C2 и C17.

Литература

1. Бизунок, Н. А. Влияние экранированных фенолов на клеточную генерацию свободных радикалов кислорода / Н. А. Бизунок, Б. В. Дубовик, О. И. Шадыро // Рецепт. 2006. № 6. С. 34–38.

2.Ерин, А. Н. Витамин Е: молекулярные механизмы действия в биологических мембранах / А. Н. Ерин [и др.] // Кислородные радикалы в биологии и медицине. Рига: РМИ, 1988. С. 109–129.

3.Повалишев, В. Н. Влияние α -токоферола и его серосодержащих аналогов на радиационно-химические превращения гексана и этанола / В. Н. Повалишев, Г. И. Полозов, О. И. Шадыро // Химия высоких энергий. 2006. Т. 40. № 5. С. 349–354.

4.Burclay, L. R. C. 1992 Syntex Award Lecture. Model biomembranes: quantitative studies of peroxidation, antioxidant action, partitioning, and oxidative stress // Can. J. Chem. 1993. V. 71. P. 1–16.

5. Chou, T-Ch. Theoretical basis, experimental design, and computerized simulation of synergism and antagonism in drug combination studies / T-Ch. Chou // Pharmacological reviews. 2006. V. 58. P. 621–681.

6.Joe, V. Production of oxygen-centered radicals by neutrophils and macrophages as studied by electron spin resonance (ESR) / Joe V. Bannister, William H. Bannister // Environmental Health Perspectives. 1985. V. 64. P. 37–43.

7.Povalishev, V. N. Effects of α -tocopherol and related compounds on reactions involving various organic radicals / V. N. Povalishev, G. I. Polozov, O. I. Shadyro // Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters. 2006. V. 16. P. 1236–1239.