

нольной, дифенольной и полифенольной структуры на модели FcγR-индуцированной макрофагальной генерации активных форм кислорода (АФК) [1, 2, 3, 4, 5], свидетельствуют о том, что активность антиоксидантов в значительной степени зависит от того, в отношении какого пула АФК изучается их действие. Активность в отношении совокупного пула генерируемых клеткой АФК и активность в отношении Nox2-зависимой (ЕС 1.6.3.1) её части сильно различались для ряда соединений, другие соединения различий не обнаруживали. Эти различия стали основанием для анализа зависимости антиоксидантного действия от структуры испытанных соединений и условий среды, в которой находятся фагоциты и происходит генерация АФК, результаты которого представлены в настоящей работе.

Материалы и методы исследования

Среды и реагенты. Перечень изученных соединений представлен в таблице 1, из них соединения серий «O1-O13», «C1-C16», «S1-S10», «N1-N9» синтезированы на кафедре радиационной химии и химико-фармацевтических технологий УО «Белорусский государственный университет», соединения серий «K2-K6», «R1-R19», альфа-токоферол (α-ТсОН), транс-ресвератрол (t-Rs), салициловая кислота (СК), ацетилсалициловая кислота (АСК), мелатонин (Mt), аскорбиновая кислота (аскорбат), 2,6-ди-трет-бутил-4-метилфенол (ионол), резорцин (RC) произведены компанией «Sigma-Aldrich», Германия. Кроме того, в работе использовали люминесцентный зонд люминол (5-амино-2,3-дигидро-1,4-фталазиндион) – «Sigma-Aldrich», Германия; среду Хенкса без индикатора – ФГУП «ИПВЭ», Россия; диметилсульфоксид – ООО «Фармтехнология», Беларусь; гепарин – РУП «Белмедпрепараты», Беларусь; зимозан (сухие пекарские дрожжи); сыворотку крови крупного рогатого скота – ОАО «Диалек», Беларусь.

Выделение макрофагов. Исследования выполнены 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%.

Изучение респираторного взрыва. Макрофагальную продукцию оксидантов исследовали методом люминолзависимой хемилюминесценции (ХЛ) в условиях взрывной генерации АФК на люминометре LKB-Wallac 1251–002 (Финляндия). 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: 106 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 ХЛ) и площади под кривой ХЛ, исключая фоновое свечение клеток (DAUC ХЛ). При описанном дизайне эксперимента последний показатель отражает вклад НАДФН-оксидазы фагоцитов (Nox2, ЕС 1.6.3.1) в продукцию общего пула АФК. Показатели ХЛ проб, содержащих изучаемые агенты, выражали в % к контрольным. Количество повторных опытов варьировало от 3 до 8.

Статистический анализ. Статистическую обработку первичных результатов внутри серии проводили с использованием парного t-критерия, межсерийные сравнения выполняли по t-критерию Стьюдента, различия считали достоверными при вероятности ошибки < 5% ($p < 0,05$). Антиоксидантную активность соединений оценивали по степени подавления ХЛ, вычисляя эффективные ингибирующие концентрации ($IC_{16} - IC_{84}$) методом регрессионного анализа с использованием программного пакета «Statistica 6,1» и математических преобразований по Chou [6] при помощи специально разработанного интерактивного алгоритма.

Результаты и обсуждение

В ранее проведенных исследованиях убедительно показано, что при активации Nox2 генерируются, прежде всего, кислород-центрированные радикалы, при подходящих условиях инициирующие образование углерод-центрированных молекул [7]. Таким образом, окружающая фагоцит среда, содержит смесь кислород- и углерод-центрированных радикалов. При этом в условиях базовой генерации клетками АФК углерод-центрированные радикалы составляют довольно весомую, а, возможно, и преобладающую часть всего свободно-радикального пула. При активации Nox2 фагоцитов, помещенных в буферный раствор, происходит взрывная генерация АФК и равновесие смещается в сторону преобладания кислород-центрированных радикалов, поскольку фагоциты находятся в среде с низким содержанием органических молекул, где условия для быстрого формирования углерод-центрированных радикалов минимальны. В этих условиях люминол, способный трансформироваться в различные радикальные интермедиаты при взаимодействии и с кислород-, и с углерод-центрированными радикалами выполняет роль своеобразной «модельной» органической молекулы. Антиоксидантная активность соединений в такой системе будет обнаруживаться в том случае, если скорость взаимодействия антиокси-

Таблица 1. Перечень изученных соединений

Шифр	Название	Шифр	Название
Ионол	2,6-Ди-трет-бутил-4-метилфенол	C1	6-Гидрокси-1,4-бензоксантиин-2(3Н)-он
RC	1,3-Дигидроксибензол (резорцин)	C2	6-Метокси-1,4-бензоксантиин-2(3Н)-он
O1	1,4-Дигидроксибензол (гидрохинон)	C3	6-Гидрокси-5,7,8-триметил-1,4-бензоксантиин-2(3Н)-он
O2	1,4-Бензохинон	C4	6-Метокси-5,7,8-триметил-1,4-бензоксантиин-2(3Н)-он
O3	4-Метоксифенол	C5	6-Гидрокси-3,5,7,8-тетраметил-1,4-бензоксантиин-2(3Н)-он
O4	1,4-Дигидрокси-2,3,5-триметилбензол	C6	2-(6-Гидрокси-5,7,8-триметил-2-оксо-2,3-дигидро-1,4-бензоксантиин-3-ил) уксусная кислотабензоксантиин-3-ил) уксусная кислота
O5	2,3,5-Триметил-1,4-бензохинон	C7	5,7,8-Триметил-2,3-дигидро-1,4-бензоксантиин-6-ол
O6	2,5-Ди-трет-бутилгидрохинон	C8	2,5,7,8-Тетраметил-2,3-дигидро-1,4-бензоксантиин-6-ол
O7	2,5-Ди-трет-бутил-1,4-бензохинон	C9	2-(Гидроксиметил)-5,7,8-триметил-2,3-дигидро-1,4-бензоксантиин-6-ол
O8	4,6-Ди-трет-бутилрезорцин	C10	2-(2,5-Дигидрокси-3,4,6-триметилфенилтио) уксусная кислота
O9	4-Трет-бутилпирокатехин	C11	2-(2,5-Дигидроксифенилтио) уксусная кислота
O10	4-Трет-бутил-1,2-бензохинон	C12	5-Гидрокси-1,3-бензоксатиол-2-он
O11	3,5-Ди-трет-бутилпирокатехин	C13	5-Гидрокси-4,6,7-триметил-1,3-бензоксатиол-2-он
O12	3,5-Ди-трет-бутил-1,2-бензохинон	C14	5-Гидрокси-1,3-бензоксатиол-2-тион
O13	1,2,3-Тригидрокси-4,6-ди-трет-бутилбензол	C15	5-Гидрокси-4,6,7-триметил-1,3-бензоксатиол-2-тион
R1	Бензальдегид	C16	5-Метокси-1,3-бензоксатиол-2-он
R2	Бензиловый спирт	C17	5-Метокси-4,6,7-триметил-1,3-бензоксатиол-2-он
R3	Бензиловый спирт	α-ТсОН	Альфа-токоферол
R4	3,4-Дигидроксибензальдегид (протокатеховый альдегид)	СК	Салициловая кислота
R5	3,4-Дигидроксибензойная кислота (протокатехиновая кислота)	АСК	Ацетилсалициловая кислота
R6	4-Гидрокси-3,5-диметоксибензальдегид (сиреневый альдегид)	S1	3-Меркапто-4,6-ди-трет-бутилпирокатехин
R7	4-Гидроксибензиловый спирт	S2	3,3'-Дитиобис(4,6-ди-трет-бутилпирокатехин)
R8	4-Гидроксибензойная кислота	S3	3-Фенилсульфанил-4,6-ди-трет-бутилпирокатехин
R9	3,5-диметокси-4-гидроксициннамовая кислота (синапиновая кислота)	S4	3-Децилсульфанил-4,6-ди-трет-бутилпирокатехин
R10	3-Метокси-4-гидроксициннамовая кислота (феруловая кислота)	S6	3-(1,2-Дигидрокси-4,6-ди-трет-бутил-фенил) тиосульфат натрия
R11	3,4-Дигидроксициннамовая кислота (кофейная кислота)	S7	3-(2-гидроксиэтилтио)-4,6-ди-трет-бутилпирокатехин
R12	Коричная (циннамовая) кислота	S8	(2,3-Дигидрокси-4,6-ди-трет-бутилфенилтио) уксусная кислота
R13	Циннамальдегид (коричный альдегид)	S10	8-Гидрокси-5,7-ди-трет-бутил-1,4-бензоксатиин-2(3Н)-он
R14	Циннамовый спирт (коричный спирт)	S11	7-Гидрокси-4,6-ди-трет-бутил-1,3-бензоксатиол-2-он
R15	Бензойная кислота	S12	7-Гидрокси-4,6-ди-трет-бутил-1,3-бензоксатиол-2-тион
R16	2,3-Дигидроксибензальдегид	K2	6,7-Дигидроксикумарин
R17	3-Метокси-4-гидроксициннамовый альдегид (кониферилловый альдегид)	K3	7,8-Дигидрокси -6 - метоксикумарин

Шифр	Название	Шифр	Название
R18	3,5-Диметокси-4-гидроксициннамовый альдегид (синапиновый альдегид)	K4	Дикумарол
R19	1,7-Бис(4-гидрокси-3-метоксифенил)-1,6-гептадиен-3,5-дион (куркумин)	K5	Вербенон
t-Rs	Транс-ресвератрол	K6	Цис-Вербенол
Mt	Мелатонин	N6	2,4-Ди-трет-бутил-6-адамантиламинофенол
N1	2-Амино-4,6-ди-трет-бутилфенол	N7	2-Анилино-4,6-ди-трет-бутилфенол
N2	N-(3,5-ди-трет-бутил-2-гидроксифенил)ацетамид	N8	2-[(4-Метилфенил)амино]-4,6-ди-трет-бутилфенол
N3	N-(3,5-ди-трет-бутил-2-гидроксифенил)бензамид	N9	N-(2-метокси-3,5-ди-трет-бутилфенил)диметиламин
N4	N-(3,5-ди-трет-бутил-2-гидроксифенил)бутанамид	N10	3,5-Ди-трет-бутил-2-метокси-N-фениланилин

данта со свободным радикалом превышает скорость взаимодействия свободного радикала с люминолом. С позиции экстраполяции результатов, соединения не активные в такой системе, не будут проявлять антиоксидантной активности *in vivo*, поскольку скорость взаимодействия антиоксиданта с радикалами будет уступать таковой с биомолекулами. Учитывая низкую базовую генерацию радикалов и массивную продукцию АФК при респираторном взрыве фагоцитов, условия для изучения антирадикальной активности веществ в отношении кислород-центрированных радикальных форм более благоприятны, чем в отношении углерод-центрированных.

В связи с этим соединения, более активные по критерию DAUC ХЛ, чем по критерию AUC ХЛ вступают в свободно-радикальные реакции преимущественно с «малыми» кислород-центрированными молекулами со скоростями, большими, чем скорости взаимодействия с ними люминофора. В этом случае наряду с избирательностью в отношении DAUC ХЛ, их активность будет тем выше, чем ниже их эффективные концентрации (IC) в сравнении с концентрацией люминофора.

Показатель AUC ХЛ учитывает весь пул АФК, генерируемых макрофагами. Этот пул содержит большее количество углерод-центрированных молекул, которые образуются и в процессе респираторного взрыва, и в покое. Исходя из этого, соединения более активные в отношении AUC ХЛ, чем в отношении DAUC ХЛ, прежде всего, взаимодействуют с углерод-центрированными радикалами, при чем учитывая ограниченные возможности их генерации в предлагаемых условиях, различия в активности по отношению к совокупной и Nox2-зависимой генерации не слишком велики или не обнаружимы. Последнее относится и к соединениям сочетающим активность в отношении углерод- и кислород-центрированных радикалов.

Исходя из таких предположений, все испытанные соединения можно разделить на 3 группы: группа I – высоко активные в отношении совокупной генерации АФК (AUC ХЛ), группа II – высоко активные в отно-

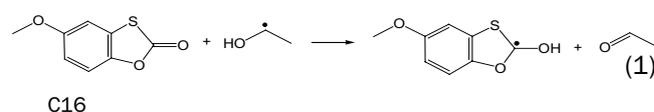
шении Nox2-зависимой генерации АФК (DAUC ХЛ) и группа III – не проявлявшие антиоксидантных свойств. К последней группе относились среди серосодержащих производных токоферола – C4, C6, C15, C17; среди производных бензойной кислоты соединения R2, среди экранированных фенолов – O6, O7, O8, O13; среди тиофенолов – S3, S11, S12; среди аминофенолов – N2, N3, N4, N8, N10.

Критерием для отнесения остальных соединений к I-й или II-й группе был коэффициент K₃₀₋₅₀, рассчитывавшийся по формуле:

$$K_{30-50} = (IC_{30\text{ AUC}} / IC_{30\text{ DAUC}} + IC_{50\text{ AUC}} / IC_{50\text{ DAUC}}) / 2$$

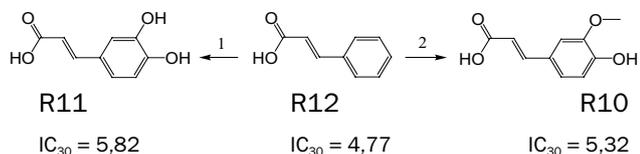
Соединения, для которых K₃₀₋₅₀ составил менее 2,0 относили в I группу (высоко активные в отношении совокупной генерации АФК), соединения, значения K₃₀₋₅₀ для которых превышали 2,0 – во II группу (высоко активные в отношении Nox2-зависимой генерации АФК) (таблица 2).

Сравнительный анализ структуры соединений двух групп показывает, что среди соединений первой группы доминируют те, что способны вступать в реакции только с углерод-центрированными радикалами, либо и с углерод-, и с кислород-центрированными радикалами. Среди них, наибольшей активностью в отношении AUC ХЛ (наименьшим коэффициентом K₃₀₋₅₀) обладали соединения C16, R12, R15, R1, R14, C12, C2, реакционная способность которых по данным химического анализа в отношении углерод-центрированных радикалов намного выше или они способны исключительно к таким взаимодействиям по схеме (цитируется по [8] в модификации автора.):

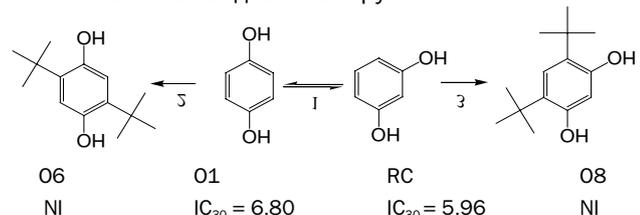


Многие из соединений первой группы содержат и карбонильную и гидроксильную группы, обеспечивающие их участие в реакциях и с кислород-, и с углерод-центрированными радикалами:

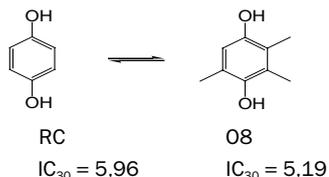
сокую активность в отношении Nox2-зависимого процесса, что можно объяснить легкой доступностью гидроксильных и карбонильных групп молекул соединений O1 и O2 для взаимодействия с радикалами практически любой пространственной конфигурации.



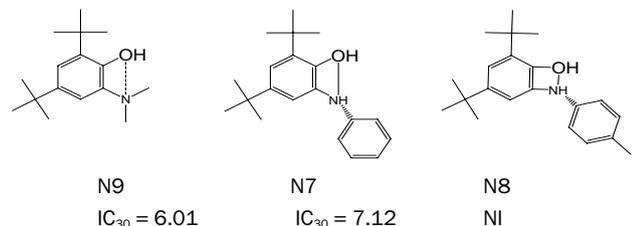
A – Антиоксидантная активность коррелирует с количеством свободных HO- групп



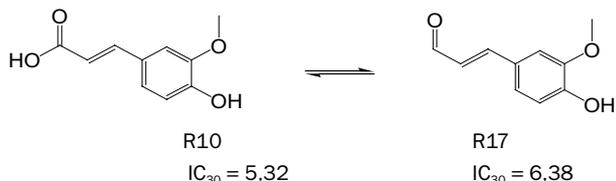
B – Объемные ди-третбутильные экраны вблизи HO- группы (2, 3) нивелируют антиоксидантные свойства; перемещение HO- групп из пара- в орто- положение снижает антиоксидантную активность (1)



C – Электронодонорные заместители снижают антиоксидантную активность



D – Сила водородной связи в молекуле N7 такова, что создает резонанс групп HO- и NH- и увеличивает антиоксидантную активность в сравнении с соединением N9 [9, 10], в котором резонанс отсутствует; нарастание силы связи (N8) полностью подавляет антиоксидантную активность



F – Кислоты обладают меньшей антиоксидантной активностью в сравнении с альдегидами

Рисунок 1. Структурные детерминанты активности производных фенола в отношении Nox2-зависимых радикальных продуктов (IC_{30} представлен в виде $-\text{Log } C, M$) (пояснения в тексте)

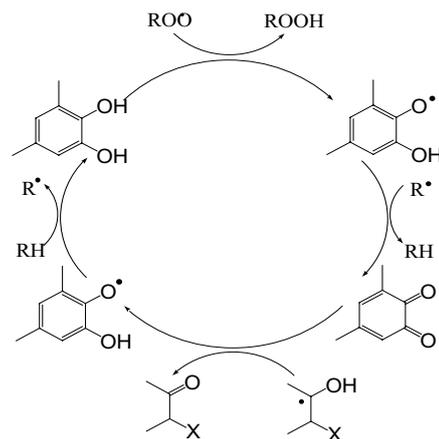
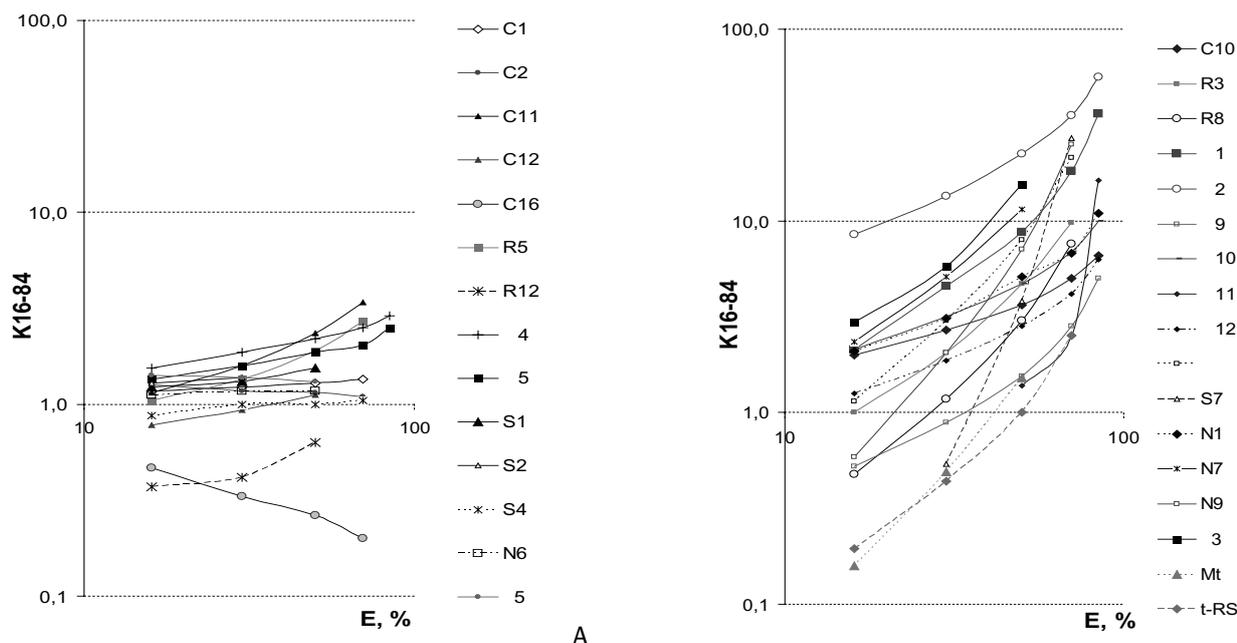


Рисунок 2. Схема возможного цикла реакций подавления свободнорадикального окисления и процессов фрагментации производными дифенола (по О.И.Шадыро и соавторам [11])

Что касается соединений, не проявлявших антиоксидантной активности (группа III), то среди них доминировали имеющие объемные экранирующие заместители вблизи функционального гидроксила (соединения O6, O8, S11, S12) или имеющие структурные предпосылки к ограничению активности функциональных групп, например, за счет образования водородных связей между ними (соединения N8, S3) или за счет изменения сопряжения функциональных групп с бензольным кольцом молекулы при появлении электронодонорных заместителей (соединения C4, C6, C14, C15), а также соединения не имевшие свободных гидроксильных групп (соединение N10) (рисунок 1).

Сравнительный анализ соединений первой и второй группы позволил установить следующую закономерность действия. Для большинства соединений второй группы селективность в отношении Nox2-зависимого процесса экспоненциально растет по мере увеличения антиоксидантного эффекта в диапазоне E16-E84 (рисунок 3 – B), тогда как селективность большинства соединений первой группы остается неизменной или изменяется линейно (рисунок 3 – A).

Структурные особенности соединений второй группы позволяют им активно нейтрализовать кислород-центрированные радикалы, что объясняет нарастание активности в отношении Nox2-зависимого процесса, однако, экспоненциальный характер свидетельствует о плейотропном действии этих соединений, их совокупный антиоксидантный эффект обеспечивается несколькими механизмами подавления генерации АФК в условиях активации Nox2. Это свойство присуще и гомолитическим парам фенол-хинон – их селективность в отношении DAUC ХЛ экспоненциально коррелировала с эффективностью, а различия в активности внутри пары нивелировались. Полученные результаты подтверждают гипотезу о том, что для соединений подобной структуры возможны быстрые гомолитические трансформации не только в химических модельных системах, но и в гидрофильной биосреде, позволяющие им проявлять высокую антиоксидантную активность и



Коэффициенты K16-K84 рассчитывались, как соотношение IC_{AUC} / IC_{DAUC} на уровне E16-E84. На диаграмме «А» представлена кинетика соединений, преимущественно сформировавших первую группу (таблица 2). На диаграмме «В» представлена кинетика соединений, преимущественно сформировавших вторую группу, а также «унитропных» соединений – мелатонина (Mt), трансресвератрола (t-Rs), фенол-хинольных пар O9-O10 и O11-O12

Рисунок 3. Кинетика изменения селективности производных фенола, дифенола и полифенолов в отношении совокупной и Nox2-зависимой генерации АФК в макрофагах по коэффициентам K16-84

широкий спектр антирадикального действия.

С другой стороны, впервые показаны принципиальные различия в действии этих соединений в химических тестах, где они работают как высокоэффективные перехватчики кислород- и/или углерод-центрированных радикалов, эффект которых линейно зависит от концентрации [12, 13, 14, 15], и в клеточной системе, где они реализуют не только прямое антиоксидантное действие, но инспирируют и другие механизмы, совокупность которых обеспечивает высокую антиоксидантную активность в отношении Nox2-зависимой генерации, намного превосходящую активность некоторых из них в упомянутых химических тестах.

Одним из наиболее вероятных механизмов антиоксидантного действия таких соединений в настоящей тест-системе является подавление активности Nox2 макрофагов, как непосредственно, так и через внутриклеточные механизмы управления активностью этого фермента, включая активацию сертуинов, широко обсуждающуюся в современной научной периодике, как один из важнейших механизмов антиоксидантного действия полифенолов [16]. Поскольку такие эффекты развиваются в течение нескольких минут, в отличие от геномных (отсроченных) эффектов полифенолов [17], они могут легко реализоваться в условиях использованной модели.

Несмотря на то, что природные антиоксиданты ресвератрол и мелатонин демонстрировали большую активность в отношении совокупной клеточной продукции АФК, кинетика изменения их селективности в отношении Nox2-зависимого процесса такова, что

предполагает реализацию нескольких механизмов антиоксидантного действия в клетках, что полностью согласуется с результатами изучения этих антиоксидантов другими авторами [12, 13, 14, 15]. Это, тем не менее, не препятствует и прямому антиоксидантному действию этих соединений *in vivo*, включая их способность блокировать реакции фрагментации биомолекул.

Что касается соединений, сформировавших первую группу, то селективность большинства из них не изменялась по мере нарастания эффективности или изменялась линейно, как в отношении совокупной, так и Nox2-зависимой генерации АФК. Такая кинетика свидетельствует о преимущественной реализации прямого антиоксидантного действия, а структурные особенности, обсуждавшиеся выше, определяют высокую активность большей части этих соединений в отношении углерод-центрированных радикалов.

Таким образом, впервые на биологически релевантной модели показано, что антиоксидантное действие соединений, эффективно подавляющих Nox2-зависимую генерацию АФК, носит плейотропный характер, а их активность должна оцениваться как интегральный показатель структурных детерминант и условий действия. Подтверждение этого положения было получено при изучении активности соединений в условиях измененного состава биосреды.

Влияние спектра АФК, генерируемых в биологической среде, на антиоксидантную активность производных дифенола и природных антиоксидантов. Изучение антиоксидантного действия наиболее актив-

ных производных фенола и пирокатехина в сложной, многокомпонентной системе, приближенной к составу биосреды, было выполнено на 2-х моделях – макрофагах, помещенных в гомологичную сыворотку крови и пероксид-индуцированной хемилюминесценции сыворотки крови. В первом случае создаются благоприятные условия для генерации не только АФК, но и вторичных углерод-центрированных радикалов, во втором – генерируется избыток пероксидов. Эти изменения свободно-радикального спектра среды могут существенным образом модифицировать антиоксидантную активность соединения, ранее установленную на модели макрофагов, помещенных в среду Хенкса, и позволяют в условиях, приближенных к *in vivo* оценить влияние антирадикальной специфичности соединений на их совокупный антиоксидантный потенциал.

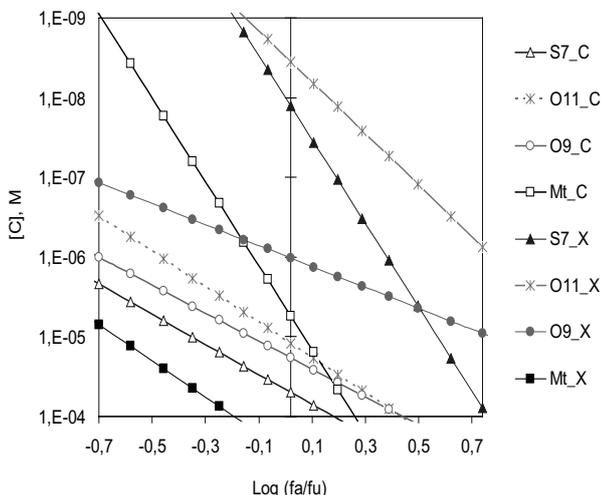
Для выполнения экспериментов сыворотку крови получали от 4-6 животных и объединяли в общую пробу, сыворотка служила межклеточной средой и растворителем для всех компонентов системы. Стоит отметить, что интенсивность хемилюминесценции клеток в сыворотке крови снижается в 2-3 раза. Этот феномен, впервые описанный в середине 80-х годов, сегодня получил объяснение – его главной причиной считается неспецифический «перехват» свободных радикалов альбумином сыворотки, который при этом подвергается окислению и фрагментации, являясь, таким образом, своеобразным «буфером», защищающим биосреду от агрессивного действия радикалов [18].

Активность производных дифенола и мелатонина в условиях Nox2-зависимой генерации АФК в сыворотке

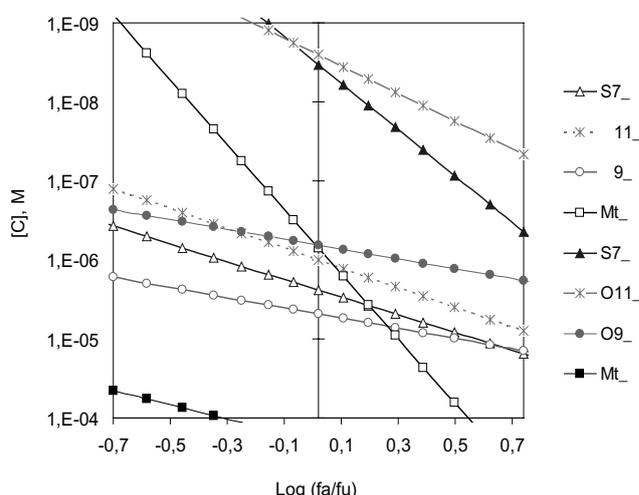
крови. Изменение состава межклеточного вещества существенным образом влияло на действие производных фенола (S7, O9, O11) – их антиоксидантная активность снижалась на 2-3 порядка величин в отношении совокупной генерации АФК (AUC ХЛ) по сравнению с действием в буферном растворе во всем диапазоне E16-E84. Вместе с тем, сужался коридор их эффективных концентраций за счет увеличения углового коэффициента зависимости «концентрация-эффект», демонстрируя быструю истощаемость эффекта в отношении AUC ХЛ. Индивидуальные отличия в активности, исчислявшиеся порядками в среде Хенкса сглаживались (рисунок 4 – А).

В отношении Nox2-зависимой генерации АФК все фенолы достигали максимальной эффективности и демонстрировали менее выраженное снижение антиоксидантной активности, угловой коэффициент зависимости «концентрация-эффект» не изменялся или изменялся не столь значительно, различия в активности соединений O9 и O11, имевшие место в среде Хенкса и достигавшие 2-3 порядков величин, в сыворотке крови нивелировались и в отношении DAUC ХЛ (рисунок 4 – В).

В отличие от производных фенола, антиоксидантный потенциал мелатонина возрастал на 2-3 порядка в отношении и совокупной, и Nox2-зависимой генерации АФК. В отношении AUC ХЛ мелатонин превосходил в активности производные фенола во всем диапазоне эффективных концентраций, в отношении DAUC ХЛ его активность быстро истощалась и на уровне эффектов E50-E84 фенолы имели преимущество.



А – AUC ХЛ (Совокупная генерация АФК)



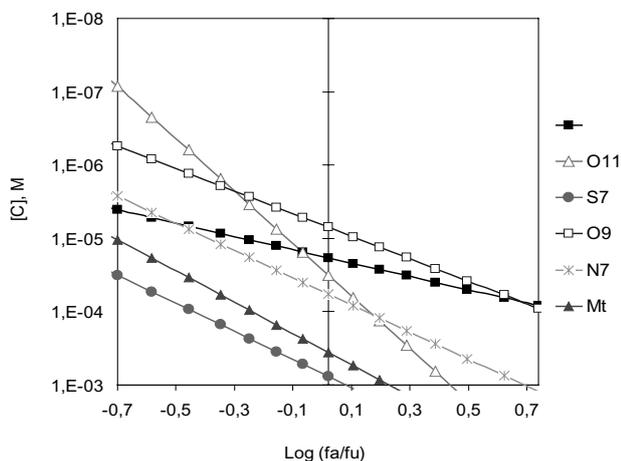
В – DAUC ХЛ (Nox2-зависимая генерация АФК)

Log (fa/fu) – логарифм отношения эффективной к неэффективной фракции; [C], М – концентрация вещества в моль/л; AUC ХЛ обозначает действие в отношении совокупного пула АФК, генерируемого активированными фагоцитами; DAUC ХЛ – действие в отношении Nox2-ассоциированной части АФК. Индекс «С» обозначает действие в сыворотке крови, индекс «Х» – в среде Хенкса. Mt – мелатонин, S7 – 3-(2-оксиэтилтио)-4,6-ди-трет-бутилпирокатехин, O9 – 4-трет-бутилпирокатехин, O11 – 3,5-ди-трет-бутилпирокатехин.

Рисунок 4. Распределение медианного эффекта при действии экранированных производных фенола на модели GcyR-зависимого респираторного взрыва макрофагов в гомологичной сыворотке крови и среде Хенкса

Эти результаты свидетельствуют о том, что антиоксидантная активность соединений, обладающих разной радикальной селективностью зависит от условий их действия. Так, мелатонин, в среде бедной углерод-центрированными радикалами (среде Хенкса) значительно уступал в активности производным фенола. При появлении условий для генерации избытка углерод-центрированных радикалов картина меняется на противоположную, подтверждая то, что мелатонин в отличие от производных фенола высоко эффективен в отношении углерод-центрированных радикалов. Снижение активности производных фенола, а также индивидуальных различий в активности частично может быть обусловлено уменьшением их свободной фракции в сыворотке крови из-за адсорбции на альбумине. При этом сохранение эффективности производных фенола в отношении Nox2-зависимой генерации АФК свидетельствует о преимуществе таких соединений *in vivo* в элиминации избытка кислород-центрированных радикалов, ассоциированных с активацией ферментов класса Nox.

Активность производных дифенола, мелатонина и аскорбата в условиях пероксид-индуцированной генерации свободных радикалов в сыворотке крови. При спонтанном разложении пероксида водорода в сыворотке крови образуются радикалы $\text{HO}_2\bullet$ и в меньшей степени $\text{OH}\bullet$ [19, 20], появление которых сопровождается быстрой вспышкой хемилюминесценции. Исследование производных фенола и водорасстворимых антиоксидантов на этой модели показало, что наиболее активным ингибитором АФК является аскорбат, который значительно уступал другим антиоксидантам на модели Nox2-зависимой генерации АФК в среде Хенкса (рисунок 5).



Log (fa/fu) – логарифм отношения эффективной к неэффективной фракции; [C], М – концентрация вещества в моль/л; Mt – мелатонин, S7 – 3-(2-оксизетилтио)-4,6-дигидро-2-метил-4-пирокатехин, O9 – 4-трет-бутилпирокатехин, O11 – 3,5-ди-трет-бутилпирокатехин, N7 – 2,4-ди-трет-бутил-2-(фениламино)фенол

Рисунок 5. Распределение медианного эффекта при действии экранированных производных фенола и некоторых природных антиоксидантов на модели пероксид-индуцированной хемилюминесценции сыворотки крови

Соединения O11 и O9 превосходят аскорбат в активности на уровне E16-E30, в дальнейшем их активность выравнивается с аскорбатом (соединение O9) или уступает аскорбату (соединение O11). Соединения N7, S7 и мелатонин уступали аскорбату в активности во всем эффективном диапазоне (рисунок 5). Эффективные ингибирующие концентрации соединений O9 и O11 на модели ПХЛ сыворотки крови перекрываются с показателями, полученными при индукции респираторного взрыва фагоцитов в той же среде (DAUC ХЛ) (рисунок 4 – В), активность соединения S7 умеренно снижается, активность мелатонина резко падает.

Таким образом, ожидаемым эффектом – снижению активности мелатонина в отношении пероксидов и повышению активности аскорбата, сопутствовало непредсказуемое различие селективности производных фенола в отношении пероксидов, заметное по гораздо более выраженному падению активности соединения S7 в сравнении с активностью соединений O9 и O11. С одной стороны, это свидетельствует об избирательности действия этих соединений в отношении кислород-центрированных радикалов, с другой подтверждает плеiotропность действия соединений этой группы (группы II) на Nox2-зависимую генерацию АФК, показанную выше.

В отношении аскорбата следует отметить, что его концентрации в отдельных зонах ЦНС достигают 10^{-4} М, а внутри клеток 10^{-2} М [21]. Полученные результаты свидетельствуют о высокой антиоксидантной эффективности физиологических концентраций аскорбата в условиях генерации избытка пероксидов.

Заключение. Результаты исследования, представленные в настоящей работе исключительно важны для понимания гетерогенной природы антиоксидантов и сущности их действия в сложно организованных биосистемах, таких как живой организм. Выбор антиоксиданта для коррекции свободно-радикальных процессов должен основываться не на абстрактных представлениях о «высокой» антиоксидантной активности, установленной в химических тестах, а на основе глубокого понимания роли углерод- и кислород-центрированных радикалов в развитии определенного патологического процесса и доминирующем паттерне антиоксидантного действия конкретного вещества. Каждый антиоксидант обладает уникальным спектром фармакологической активности, который определяется антирадикальной селективностью с одной стороны, и набором фармакодинамических эффектов, с другой. Несмотря на усилия, прилагаемые к изучению природы антиоксидантного действия, установить конкретные фармакодинамические механизмы для большинства антиоксидантов пока не удаётся, и даже, когда эта задача решается, решение не позволяет объяснить весь спектр активности этих веществ *in vivo*.

Результаты настоящего исследования показывают, что причиной неудач, связанных с изучением и практическим использованием антиоксидантов может быть склонность исследователей объяснять действие этих веществ одним преобладающим механизмом, тогда как на самом деле действие большинства антиокси-

дантов носит плейотропный характер, то есть складывается из многих взаимодополняющих механизмов.

В этих условиях первоочередной задачей является изыскание биологически релевантных моделей, позволяющих с высокой степенью вероятности экстраполировать эффекты, полученные в эксперименте на процессы, протекающие *in vivo*. Одним из результатов настоящего исследования является разработка такой модели, предназначенной для изучения и отбора антиоксидантов, высоко эффективных в отношении свободных радикалов, генерируемых при избыточной, неконтролируемой активации ферментов класса Nox. Эта модель основана на изучении избирательности действия антиоксидантов в отношении радикалов, генерируемых при активации Nox2 по сравнению с совокупным пулом АФК, продуцируемым живыми клетками в различных условиях микроокружения, определяющих преимущественное формирование кислород- или углерод-центрированных вторичных радикалов. Испытание антиоксидантов на этой модели позволяет дифференцировать соединения по их антирадикальной селективности и характеру антиоксидантного действия, определяющих, в конечном счете, совокупный антиоксидантный потенциал соединения и позволяющих прогнозировать его эффективность при отдельных патологических процессах *in vivo*. В этом отношении исключительно важным представляется дальнейшее приращение знаний о механизмах свободно-радикального повреждения, свойственных конкретному патологическому процессу. В конечном счете, именно такие знания будут определять выбор эффективного антиоксиданта среди широкого спектра соединений этой группы. В отсутствие этих знаний эмпирический выбор антиоксидантов, практикуемый современной медициной, представляется настолько же нелепым, как и эмпирический выбор витаминов в отсутствие знаний о природе нарушений, ассоциированных с их недостаточностью. В этом состоит главная причина неудач и низкой эффективности антиоксидантной терапии на современном этапе.

На основе сопоставления структурных особенностей, антирадикального спектра и кинетических характеристик действия результаты настоящего исследования позволили предложить классификацию антиоксидантов по двум принципам:

1. По характеру действия в отношении Nox2-зависимой генерации свободных радикалов на 2 группы:

1.1 монотропные (антиоксиданты, реализующие преимущественно прямое антирадикальное действие) – токоферол, соединения C1, C11, C16, R5, R12, O4, S2, S4, N6, K6;

1.2 плейотропные (антиоксиданты, механизм действия которых складывается из антирадикального и фармакодинамического действия) в отношении Nox2-зависимой генерации свободных радикалов – транс-ресвератрол, мелатонин, C10, R8, S7, N1, N7, N9, K3, пары O1-O2, O9 – O10, O11 – O12.

По антирадикальной селективности *in vivo* монотропные антиоксиданты можно в свою очередь разделить на 3 группы:

1.3 соединения, селективные в отношении углерод-центрированных свободных радикалов или не селективные (C16, C2, R1, R12, R13, K5, α-токоферол, транс-ресвератрол, мелатонин, C11, C3, C5, R18, R17, R11, K2, K3);

1.4 соединения, селективные в отношении кислород-центрированных свободных радикалов (C7, C8, ионол, R10, R9, R19, S7, S8, N7, N9, K6);

1.5 соединения с переходной селективностью в отношении углерод- и кислород-центрированных свободных радикалов (пары O1-O2, O9 – O10, O11 – O12).

Кроме того, для производных фенола, дифенола и полифенолов, активных в отношении Nox2-зависимой генерации свободных радикалов установлены важные структурные детерминанты антиоксидантного действия, состоящие в следующем.

- Антиоксидантная активность зависит от количества и положения гидроксильных групп в бензольном кольце молекулы. Наиболее активны соединения, содержащие гидроксил в пара-положении по отношению к функциональной группе. Антиоксидантный потенциал производных фенола и дифенола повышает введение дополнительных гидроксильных групп в состав заместителя и в бензольное кольцо молекулы

- К снижению антиоксидантной активности ведут следующие структурные преобразования: появление в молекуле экранирующих заместителей в орто-положении по отношению к гидроксилу, введение электронодонорных заместителей (метильных групп) в ароматический фрагмент молекулы, появление серо- и азот-содержащих заместителей в бензольном кольце, а также снижение pH среды, вызванное самим антиоксидантом.

- Антиоксидантная активность производных фенола и дифенола зависит от вероятности формирования водородных связей гидроксила с другими функциональными группами молекулы. В зависимости от силы водородной связи антиоксидантная активность как повышается, так и снижается вплоть до полной утраты.

- Появление сопряжения между гидроксильными, карбонильными и другими функциональными группами и ароматическим кольцом молекулы антиоксиданта может в зависимости от характера заместителей в бензольном кольце как повышать, так и снижать антиоксидантную активность соединения.

Учитывая, что в биосредах свободнорадикальные реакции, протекающие с участием углерод- и кислород-центрированных радикалов тесно связаны между собой, определенное биологическое преимущество имеют неселективные плейотропные антиоксиданты, такие как природные соединения – транс-ресвератрол и мелатонин и соединения с переходной селективностью, такие как аналоги ди-третбутильных производных фенола (пары O9-O10 и O11-O12). При этом открытым остается вопрос об истощаемости антиоксидантного эффекта и прооксидантном потенциале индивидуальных антирадикальных средств. Поэтому, разработка комбинированных антиоксидантов на

основе соединений, обладающих различным антирадикальным профилем и способных обеспечить не только синергичное антиоксидантное действие, но и взаимную регенерации является одной из перспективных стратегией развития антирадикальной фармакологии.

Литература

1. Бизунок, Н.А. Действие ресвератрола, производных бензойной и коричной кислот на генерацию активных форм кислорода в макрофагах / Н.А. Бизунок, Б.В. Дубовик, О.И. Шадыро, С.Н. Гапанькова, Т.А. Бизунок // Известия Национальной академии наук Беларуси. Серия медицинских наук. 2012. № 1. С. 48-53.
2. Бизунок, Н.А. Антиоксидантный потенциал серосодержащих производных фенола на модели фагоцитарной генерации активных форм кислорода / Н.А. Бизунок, Б.В. Дубовик, Г.И. Полозов, В.Л. Сорокин, О.И. Шадыро // Вести НАН Беларуси (серия медицинских наук) 2011. №3. С.83-88.
3. Бизунок, Н.А. Антиоксидантный потенциал аминосодержащих производных фенола на модели фагоцитарной генерации активных форм кислорода фагоцитами / Н.А. Бизунок, Б.В. Дубовик, Г.А. Ксендзова, В.Л. Сорокин, О.И. Шадыро // Вести НАН Беларуси (серия медицинских наук) 2011. №4. С.63-68.
4. Бизунок, Н.А. Антиоксидантный потенциал серосодержащих структурных аналогов α -токоферола на модели респираторного взрыва фагоцитов / Н.А. Бизунок, Б.В. Дубовик, Г.И. Полозов, О.И. Шадыро // Медицинский журнал. 2011. №2. С. 6-12.
5. Бизунок, Н.А. Управление респираторным взрывом фагоцитов стерически затрудненными производными фенола / Н.А. Бизунок, Б.В. Дубовик, Г.И. Полозов, О.И. Шадыро // Медицинский журнал. 2011. №2. С. 12-16.
6. 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.
7. Joe, V. Bannister Production of oxygen-centered radicals by neutrophils and macrophages as studied by electron spin resonance (ESR) / Joe V. Bannister and William H. Bannister // Environmental Health Perspectives. 1985. V. 64. P. 37-43.
8. 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.
9. Бельков, М.В. Внутримолекулярные взаимодействия в противовирусно активных производных 4,6-ди-трет-бутил-2-аминофенола / М.В. Бельков, Г.А. Ксендзова, Г.И. Полозов, И.В. Скорняков, В.Л. Сорокин, Г.Б. Толсторожев, О.И. Шадыро // Журнал прикладной

спектроскопии. 2009. Т. 76. №3. С. 435-439.

10. Бельков, М.В. Внутримолекулярные взаимодействия в противовирусно активных производных 4,6-ди-трет-бутил-2-аминофенола / М.В. Бельков, Г.А. Ксендзова, П.И. Кузовков, Г.И. Полозов, И.В. Скорняков, В.Л. Сорокин, Г.Б. Толсторожев, О.И. Шадыро // Журнал прикладной спектроскопии. 2007. Т. 74. №5. С. 577-582.

11. Shadyro, O.I. Quinones as free-radical fragmentation inhibitors in biologically important molecules / O.I. Shadyro, G.K. Glushonok, T.G. Glushonok, I.P. Edimecheva, A.G. Moroz, A.A. Sosnovskaya, I.L. Yurkova, G.I. Polozov // Free radical research. 2002. V. 36, №8, P. 859-867.

12. Едимечева, И.П. Взаимодействие пространственно экранированных фенолов и хинонов с органическими радикалами / И.П. Едимечева, Н.И. Островская, Г.И. Полозов, О.И. Шадыро // Журнал общей химии. 2005. Т. 75. Вып. 4. С. 632-635.

13. Шадыро, О.И. Влияние фенольных соединений и хинонов на радиационно-индуцированные процессы окисления гексана и этанола / О.И. Шадыро, А.А. Сосновская, И.П. Едимечева, Н.И. Островская, К.М. Казем // Химия высоких энергий. 2008. Т. 42. №2. С. 112-117.

14. Масловская, Л.А. Синтез и антиокислительная активность серосодержащих производных 3,5-ди-трет-бутилпирокатехина / Л.А. Масловская, Д.К. Петрикевич, В.А. Тимошук, О.И. Шадыро // Журнал общей химии. 1996. Т. 66. Вып. 11. С. 1899-1902.

15. Масловская, Л.А. Синтез и антиокислительные свойства некоторых производных алкилированного пирокатехина / Л.А. Масловская, Д.К. Петрикевич, В.А. Тимошук, О.И. Шадыро // Журнал общей химии. 1996. Т. 66. Вып. 11. С. 1893-1898.

16. Sangwoon, Chung Regulation of SIRT1 in cellular functions: role of polyphenols / Sangwoon Chung, Hongwei Yao, Samuel Caito [et al.] // Arch. Biochem. Biophys. 2010. V. 501. N.1. P.79-90.

17. Moskaug, Jan Ø Polyphenols and glutathione synthesis regulation / Jan Ø Moskaug, Harald Carlsen, Mari CW Myhrstad, Rune Blomhoff // American Journal of Clinical Nutrition / 2005. V. 81 N. 1. P. 277S-283S.

18. Бекман, Э.М. Оценка устойчивости к оксидативному стрессу плазмы крови по уровню окисляемости белков и липидов при металлкатализируемом окислении / Э.М. Бекман, О.А. Баранова, Е.В. Губарева и др. // Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. 2006. Т.142. №9. С. 268-272.

19. Журавлев, А.К. Метод регистрации перекисной хемилюминисценции плазмы крови / А.К. Журавлев, М.П. Шерстнев // Лаб. дело. 1985. № 10. С. 586-587.

20. Шестаков, В.А. Хемилюминесценция плазмы крови в присутствии перекиси водорода / В.А. Шестаков, Н.О. Бойчевская, М.П. Шерстнев // Биофизика. 1978. № 4. С. 132-137.

21. Зозуля, Ю.А., Барабой В.А., Сутковой Д.А. Свободно-радикальное окисление и антиоксидантная защита при патологии головного мозга. М.: Знание – М., 2000. – 344 с.