

Н.А. Бизунок

СТРУКТУРНЫЕ ДЕТЕРМИНАНТЫ АНТИОКСИДАНТНОЙ АКТИВНОСТИ ПРОИЗВОДНЫХ ФЕНОЛА, ДИФЕНОЛА И ПОЛИФЕНОЛОВ В ОТНОШЕНИИ АКТИВНЫХ ФОРМ КИСЛОРОДА, ГЕНЕРИРУЕМЫХ МАКРОФАГАМИ В РАЗЛИЧНЫХ УСЛОВИЯХ МИКРООКРУЖЕНИЯ

УО «Белорусский государственный медицинский университет»

Результаты исследования, представленные в настоящей работе раскрывают некоторые аспекты действия антиоксидантов фенольной, дифенольной и полифенольной структуры в отношении свободно-радикальных процессов, ассоциированных с фагоцитарной генерацией АФК. Впервые на биологически релевантной модели доказана плейотропность действия ряда высокоактивных природных и синтетических антиоксидантов, предложен новый вариант их классификации, установлены важнейшие структурные детерминанты антирадикального действия.

Ключевые слова: антиоксидант, макрофаги, Nox2, кислород-центрированные радикалы, углерод-центрированные радикалы, производные фенола, дифенола, полифенолы, плейотропность, структурные детерминанты.

N. A. Bizunok

THE ANTIOXIDANT ACTIVITY STRUCTURE DETERMINANTS OF THE PHENOL, DIPHENOL AND POLYPHENOLS DERIVATIVES IN REGARD TO ROS, GENERATED BY MACROPHAGES IN VARIOUS MICROENVIRONS

The results shown in this article find out some aspects of antioxidant activity of the phenol, diphenol and polyphenols derivatives in regards to free radicals reactions, associated with ROS generated by phagocytes. It has been in first time proved the pleiotropy of action for some high activity nature and synthetic antioxidants, proposed novel version of their classification and find out important structure determinants of their antiradical activity on the biological relevance model.

Key words: antioxidant, macrophages, Nox2, oxygen-centered radicals, carbon-centered radicals, phenol and diphenol derivatives, polyphenols, pleiotropy, structure determinants.

Активация фагоцитов индуцирует генерацию не только первичных АФК, но и вторичных кислород- и углерод-центрированных радикальных интермедиатов. Последствия образования радикальных продуктов многообразны. С одной стороны, они выполняют регуляторные функции, инициируя процессы клеточного деления, роста и физиологического обновления, с другой – необратимо повреждают биологические молекулы и нарушают оксидантный гомеостаз интерстиция, что ведет к разобщению регуляции жизнедеятельности и преждевременному запуску программы клеточной смерти.

В настоящее время известно два основных типа взаимодействия свободных радикалов с биосубстратами – окисление и фрагментация. Первый тип чаще реализуется при действии кислород-центрированных радикальных форм, второй – углерод-центрированных. Первичными инициаторами обоих типов могут быть биогенные АФК, которые в зависимости от собственной активности, композиции биомолекул в пределах их радиуса действия, и ионного баланса среды могут давать разные радикальные продукты. В дальнейшем радикалы могут взаимодействовать друг с другом или нейтрализоваться антиоксидантными системами защиты, однако, эффективность этих систем в ряде случаев оказывается недостаточной. Введение в организм антирадикальных средств преследует целью – установить такой баланс различных радикальных форм, при котором будет превалировать

их дисмутация и обрыв цепных радикальных реакций. В этом качестве чаще всего используют соединения, способные легко окисляться или восстанавливаться за счет отдачи или захвата электронов с образованием нейтральных для клеток метаболитов. Радикальные формы самих антиоксидантов также являются проблемой, поскольку, несмотря на меньшую активность, они сохраняют деструктивный потенциал. В ряде случаев их взаимодействие приводит к регенерации молекул антиоксиданта, но чаще они являются вторичными инициаторами цепных свободно-радикальных реакций. По-существу это – неизбежный «побочный эффект» таких соединений. Вот почему поиск комбинаций антиоксидантов, в которых отдельные компоненты могли бы восстанавливать друг друга и пополнять «антиоксидантную буферную емкость» является важной задачей свободнорадикальной фармакологии. В этом отношении достигнуты отдельные успехи, однако, до сих пор отсутствуют надежные модели, позволяющие уверенно экстраполировать эффекты и механизмы действия антиоксидантов на живые организмы, а также обоснованно комбинировать антиоксиданты между собой. Более того, в современной медицине доминирует упрощенное понимание сущности действия антиоксидантов и в связи с этим отсутствуют надежные критерии выбора и назначения антиоксидантов при патологических состояниях, ассоциированных с активацией свободно-радикального повреждения.

Испытание более восьмидесяти соединений фе-

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 предпосылок, 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-

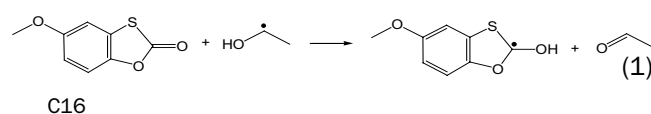
шении Nox2-зависимой генерации АФК (DAUC ХЛ) и группа III – не проявлявшие антиоксидантных свойств. К последней группе относились среди серосодержащих производных токоферола – C4, C6, C15, C17; среди производных бензойной кислоты соединения R2, среди экранированных фенолов – O6, O7, O8, O13; среди тиофенолов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

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

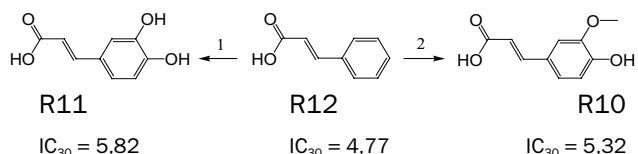
Соединения, для которых K₃₀₋₅₀ составил менее 2,0 относили в I группу (высоко активные в отношении совокупной генерации АФК), соединения, значения K₃₀₋₅₀ для которых превышали 2,0 – во II группу (высоко активные в отношении Nox2-зависимой генерации АФК) (таблица 2).

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.):

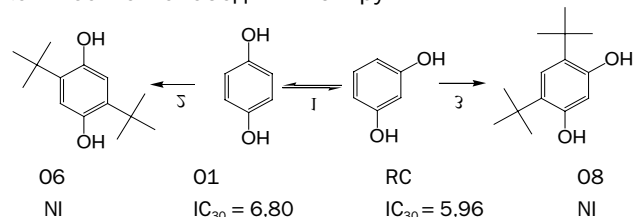


Многие из соединений первой группы содержат и карбонильную и гидроксильную группы, обеспечивающие их участие в реакциях и с кислород-, и с углерод-центрированными радикалами:

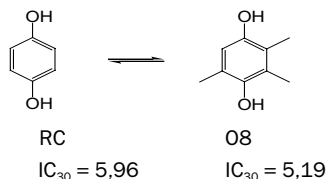
сокую активность в отношении Nox2-зависимого процесса, что можно объяснить легкой доступностью гидроксильных и карбонильных групп молекул соединений O1 и O2 для взаимодействия с радикалами практически любой пространственной конфигурации.



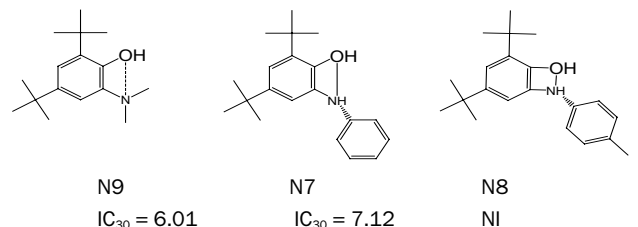
A – Антиоксидантная активность коррелирует с количеством свободных HO- групп



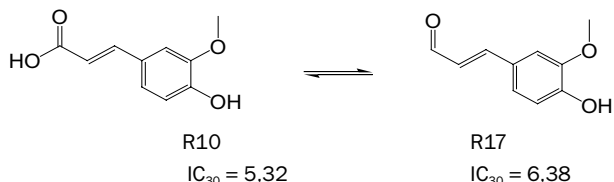
B – Объемные ди-третбутильные экраны вблизи HO- группы (2, 3) нивелируют антиоксидантные свойства; перемещение HO- групп из пара- в орто- положение снижает антиоксидантную активность (1)



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)

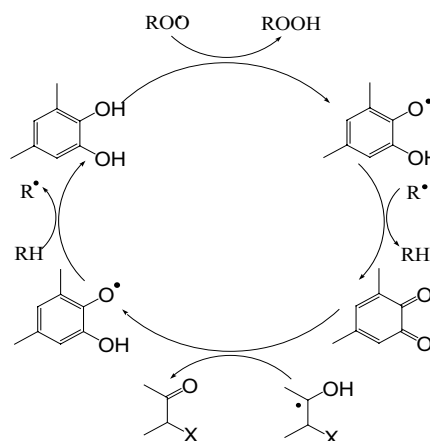
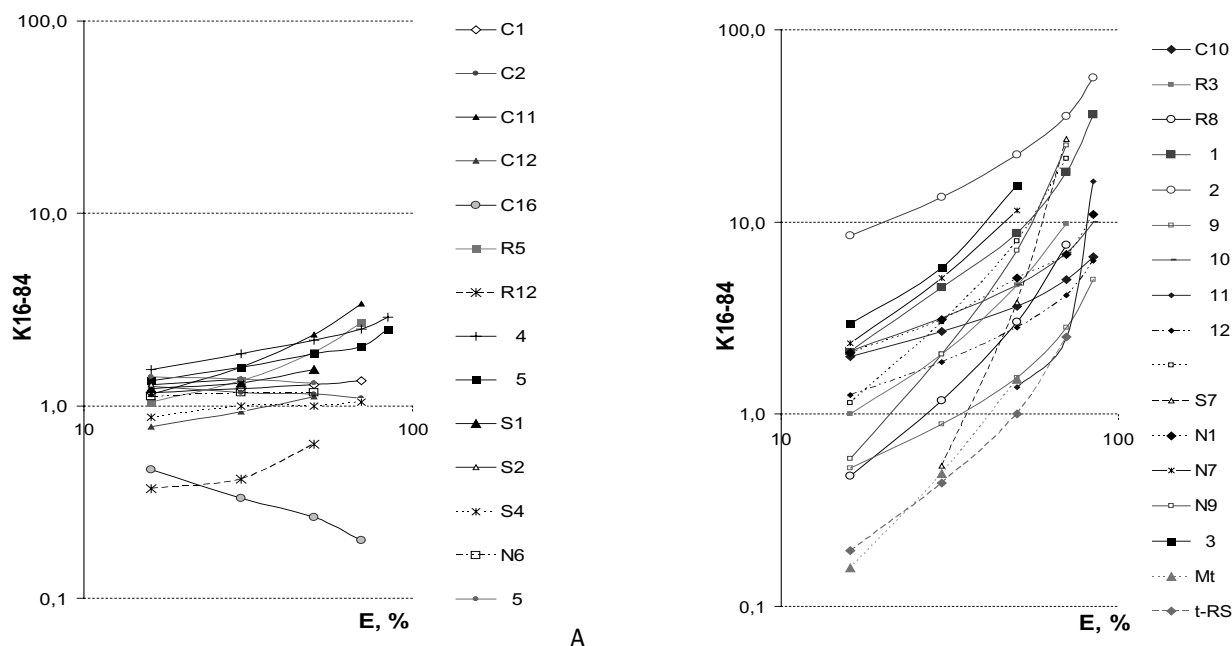


Рисунок 2. Схема возможного цикла реакций подавления свободнорадикального окисления и процессов фрагментации производными дифенола (по О.И.Шадыро и соавторам [11])

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.

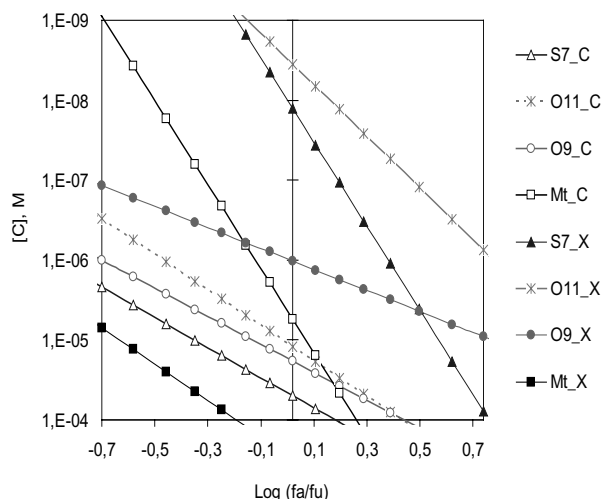
Для выполнения экспериментов сыворотку крови получали от 4-6 животных и объединяли в общую пробу, сыворотка служила межклеточной средой и растворителем для всех компонентов системы. Стоит отметить, что интенсивность хемилюминесценции клеток в сыворотке крови снижается в 2-3 раза. Этот феномен, впервые 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

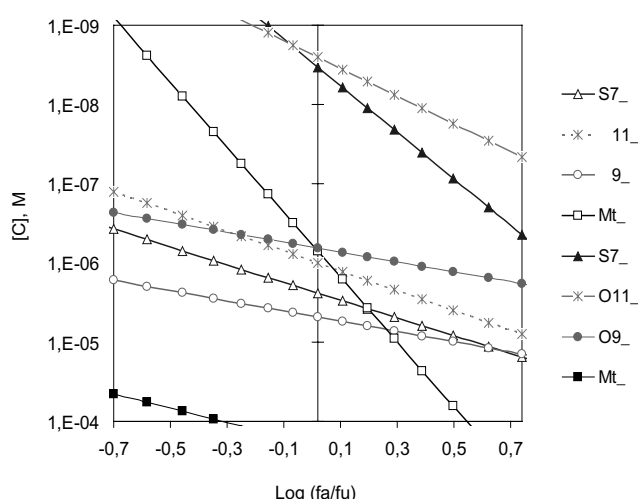
крови. Изменение состава межклеточного вещества существенным образом влияло на действие производных фенола (S7, O9, O11) – их антиоксидантная активность снижалась на 2-3 порядка величин в отношении совокупной генерации АФК (AUC ХЛ) по сравнению с действием в буферном растворе во всем диапазоне E16-E84. 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)



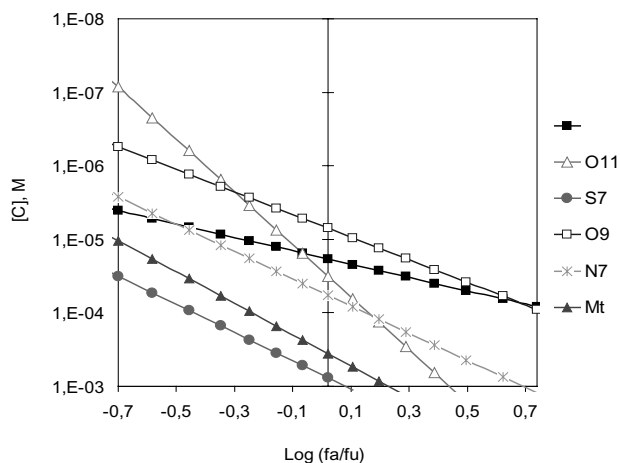
В – DAUC ХЛ (Nox2-зависимая генерация АФК)

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 водорастворимых 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).



$\text{Log} (fa/fu)$ – логарифм отношения эффективной к неэффективной фракции; [C], М – концентрация вещества в моль/л; Mt – мелатонин, S7 – 3-(2-оксизетилтио)-4,6-дигидротрет-бутилпирокатехин, 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 плейотропность 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.