

**АНТИОКСИДАНТНАЯ АКТИВНОСТЬ ЦИКЛОПРОИЗВОДНЫХ
АЛКИЛЗАМЕЩЕННЫХ ФЕНОЛОВ – АНАЛОГОВ α -ТОКОФЕРОЛА
В ПСЕВДОПЕРОКСИДАЗНЫХ СИСТЕМАХ**

М.В. Потапович, Ю.А. Григоренко*, Д.И. Метелица, Г.И. Полозов**, О.И. Шадыро****

*НИИ физико-химических проблем Белорусского государственного университета, Минск,
Республика Беларусь;*

**Биологический факультет Белорусского государственного университета, Минск,
Республика Беларусь;*

***Химический факультет Белорусского государственного университета, Минск, Республика
Беларусь*

Введение

В настоящее время известно, что в патофизиологию многих заболеваний человека вовлекается окислительный стресс, инициированный активными кислородсодержащими радикалами (АКР) и другими агентами, образующимися в клетке в ферментативных и неферментативных процессах [1–3]. Приведены многочисленные убедительные доказательства важной роли АКР в этиологии церебральной ишемии, атеросклероза, инфаркта миокарда, ревматоидного артрита, воспалительных кишечных инфекций, болезни Альцгеймера, онкологических, вирусных и многих других заболеваний человека и животных [1, 3]. Для подавления токсических свободнорадикальных процессов в клетке широко используется антиоксидантная терапия с применением природных и синтетических антиоксидантных агентов, к числу которых относится α -токоферол и его гидрофильные аналоги [2, 4].

Довольно часто отмечается, что многие соединения с антиоксидантным действием являются носителями высокой антивирусной активности, хотя получение прямой корреляции между противовирусными и антиоксидантными свойствами одних и тех же химических агентов до сих пор является сложной и нерешенной задачей [5–7]. Синтез новых антиоксидантных и противовирусных препаратов непрерывно продолжается во многих лабораториях и поэтому актуальной проблемой остается скрининг потенциальных антиоксидантов с высокой активностью и противовирусным действием.

Для количественной оценки общей антиоксидантной активности (ОАА) новых соединений нами предложена тест-система, содержащая биокатализатор метгемальбумин (комплекс гемина с БСА, MetHa), пероксид водорода, ароматический амин (ArNH_2 , орто-фенилендиамин (ФДА) или 3,3',5,5'-тетраметилбензидин (ТМБ)) и ингибитор (InH). При каталитическом разложении H_2O_2 инициируются АКР HO^\bullet и HO_2^\bullet , окисляющие хромогенный субстрат (ФДА или ТМБ), а тестируемое соединение InH выступает в роли ингибитора, конкурирующего с акцепторами радикалов (ФДА или ТМБ) в процессе сопряженного окисления [8–10]. В роли InH могут выступать биологические жидкости (сыворотка крови, слюна, моча, спинно-мозговая жидкость), а также соки, вина, экстракты растений, продукты питания и др., интегральная ОАА которых оценивается путем сравнения с ингибирующей активностью калибратора InH, удовлетворяющего целому ряду требований, рассмотренных в наших работах [8–11].

На основании обширного экспериментального материала по сопряженному окислению ароматических аминов и замещенных фенолов (InH) и их производных в пероксидазных и псевдопероксидазных системах (см. обзоры [9] и [12]) доказано, что адекватными количественными характеристиками ингибирующего действия фенолов в этих условиях могут быть эффективная константа ингибирования K_i , продолжительность периода индукции Δt в накоплении продуктов окисления аминов и стехиометрический коэффициент ингибирования f , означающий число радикальных частиц, гибнущих на одной молекуле ингибитора InH.

Цель данной работы – сравнительная количественная характеристика антиоксидантной активности 19-ти серосодержащих циклопроизводных алкилзамещенных фенолов аналогов α -токоферола (TS), Тролокса (6-гидрокси-2,5,7,8-тетраметилхроман-2-карбокси-кислота) и РМС (2,2,5,7,8-пентаметилхроман-6-ол) с использованием псевдопероксидазной системы «MetHa-H₂O₂-ФДА(ТМБ)». Структурные формулы 19-ти новых соединений TS-1-19, Тролокса и РМС представлены в таблицах 1 и 2. Практический аспект работы состоял в сопоставлении количественных характеристик ингибирующей активности новых соединений, Тролокса и РМС, а также в выборе оптимальных ингибиторов-калибраторов для использования их в тест-системах ОАА биологических жидкостей, в первую очередь – сыворотки крови человека.

Методы исследования

Реагенты

В работе использовали гемин фирмы «Serva» (Германия), раствор которого готовили в ДМСО или ДМФ, а концентрацию определяли спектрофотометрически по значению коэффициента молярного поглощения ϵ (405 нм)=174000 М⁻¹см⁻¹ [13]. Применяли БСА фирмы «Sigma» (США) без дополнительной очистки, используя для его спектрофотометрического определения ϵ (280 нм)=35000 М⁻¹см⁻¹ [14]. Биокатализатор MetHa готовили по описанной нами ранее методике [8]: в работе использовали метгемальбумин с соотношением 10 мкМ гемина/30 мкМ БСА и 10 мкМ гемина/5 мкМ БСА, что обеспечивало достаточные начальные скорости иницирования радикалов V_i и совместимость MetHa с реакционной средой. В качестве окисляющего субстрата в использовали разбавленный пергидроль, определяя концентрацию H₂O₂ по значению ϵ (230 нм) = 72,4 М⁻¹см⁻¹ [15]. В качестве восстанавливающих субстратов использовали ТМБ («Serva», Германия) и ФДА («Fluka», Швейцария). Известные аналоги α -токоферола Тролокс и РМС были производства «Sigma-Aldrich» (Великобритания). Новые синтетические аналоги α -токоферола TS-1-19 были получены и охарактеризованы на Кафедре радиационной химии и химико-фармацевтических технологий БГУ, как описано в работах [16, 17].

Окисление ФДА и ТМБ без ингибиторов и в их присутствии проводили при 20°C в термостатируемых кюветах фотометра КФК.3 (Россия) или спектрофотометра «Specol-211» (Carl Zeiss, Германия), снабженных цифровой индикацией оптической плотности.

Окисление ФДА в присутствии ингибиторов и без них проводили в среде ЗФР (0,01 М фосфатный буфер, рН 7,4 с 0,15 М NaCl; забуференный физиологический раствор) в двух вариантах: в первом случае конечные концентрации реагентов составляли 10 мкМ гемина/30 мкМ БСА, 6 мМ H₂O₂, 0,8 мМ ФДА и 5,25% ДМФ; во втором случае – 10 мкМ гемина/5 мкМ БСА, 6 мМ H₂O₂, 0,25 мМ ФДА, 6% ДМФ и 0,25% ДМСО. Присутствие органических соразтворителей обеспечивало гомогенность реакционной смеси и связано с ограниченной растворимостью большинства использованных ингибиторов в буферном растворе. Реакцию начинали добавлением к смесям H₂O₂ и следили за окислением ФДА по образованию продукта окисления 2,3-диаминофеназина с максимумом светопоглощения на 455 нм, используя при расчетах коэффициент поглощения продукта, определенный ранее в нашей лаборатории при рН 7,4: ϵ (455 нм)=16200 М⁻¹см⁻¹.

Окисление ТМБ в присутствии ингибиторов и без них проводили в среде ЗФР, рН 7,4 в следующих вариантах: в первом случае конечные концентрации реагентов составляли 10 мкМ гемина/5 мкМ БСА, 3 мМ H₂O₂, 0,5 мМ ТМБ, 5% ДМФ и 0,25% ДМСО; во втором – 10 мкМ гемина/5 мкМ БСА, 0,5 мМ H₂O₂, 0,25 мМ ТМБ, 5% ДМФ и 0,25% ДМСО. Реакцию начинали добавлением H₂O₂ и проводили 1–2 мин или более при наличии Δt в образовании продукта окисления ТМБ. Светопоглощение продукта окисления регистрировали в его максимуме A₆₅₅ и рассчитывали скорости процесса с использованием ϵ (655 нм)=39000 М⁻¹см⁻¹ [15]. Во всех случаях при расчете начальной скорости окисления ФДА или ТМБ использовали только начальные, строго линейные участки кинетических кривых роста оптической плотности продуктов реакции. При наличии периодов индукции при окислении ТМБ вычисляли скорость реакции после окончания лаг-фазы.

Характеристика ингибирования окисления ФДА и ТМБ в псевдопероксидазной системе

Для определения типа ингибирования строили зависимости V_0 от концентрации субстратов (ФДА или ТМБ) в двойных обратных координатах (метод Лайнуивера-Берка [18]). Для определения эффективных констант ингибирования K_i использовали метод Диксона, строя зависимости V_0 от $[InH]_0$ [18]. В случае неприменимости метода Диксона использовали метод Корниш-Боудена [19], строя зависимость $[S]_0/V_0$ от растущей концентрации $[InH]_0$, где $[S]_0$ – начальная концентрация субстрата (ФДА или ТМБ). В тех случаях, когда использование обоих методов затруднено или невозможно из-за незначительного ингибирования, процесс характеризовали глубиной ингибирования в процентах при определенной концентрации ингибитора.

Для определения значений f использовали теорию метода ингибиторов свободно-радикальных реакций академика Н.М. Эмануэля и сотрудников [20] и соотношения (1) и (2): $\Delta\tau = f \times [InH]_0/V_i$ (1), $V_0 \approx V_i = f \times (V_i/f)$ (2),

где $\Delta\tau$ – продолжительность периода индукции в накоплении продуктов окисления ТМБ, V_i – скорость инициирования радикалов, приближенно равная скорости окисления ТМБ в отсутствие ингибитора. Детали метода подробно описаны в наших работах [9, 11].

Результаты и обсуждение

Ингибированное окисление ФДА в псевдопероксидазной системе

На рисунке 1а в терминах оптической плотности продукта окисления ФДА (A_{455} нм) представлены кинетические зависимости его роста в отсутствие ингибитора (1) и в присутствии РМС в концентрациях 0,03–0,50 мМ (2–9). Как видно, кинетические кривые характеризуются отсутствием лаг-периодов при всех концентрациях РМС, который сильно снижал скорость окисления ФДА. Зависимость начальной скорости окисления ФДА от его начальной концентрации в координатах Лайнуивера-Берка при возрастающих концентрациях РМС подтверждает **смешанный тип ингибирования**. На рисунке 1б показаны зависимости в координатах Корниш-Боудена при разных концентрациях ФДА, которые во всех случаях линейны и пересекаются в одной точке в левом квадранте, что характерно для смешанного типа ингибирования. По данным рисунка 1б определена константа ингибирования K_i , равная 88 мкМ, что свидетельствует о высокой ингибирующей эффективности РМС в окислении ФДА в псевдопероксидазной системе.

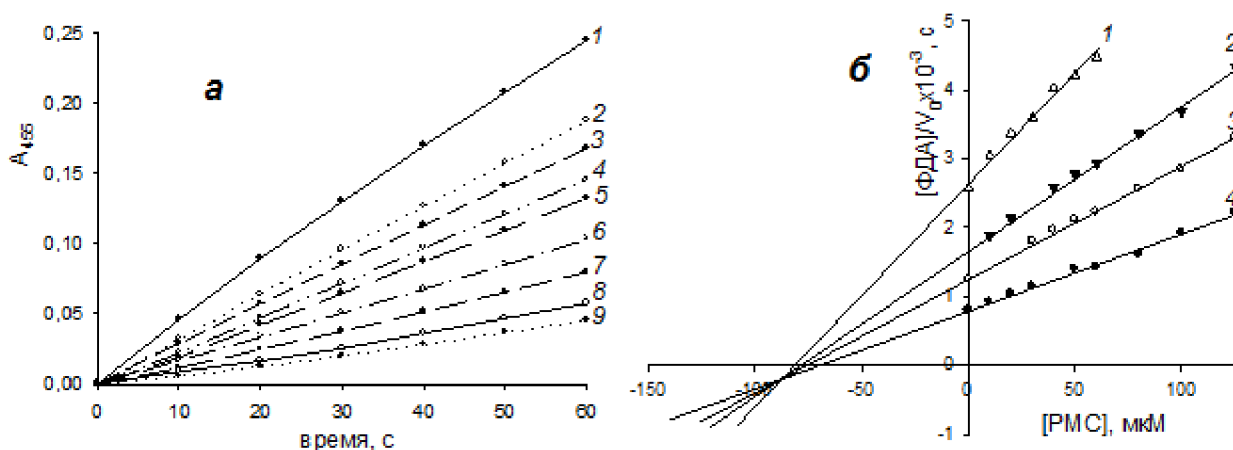


Рисунок 1 – а – Кинетика роста оптической плотности продукта окисления ФДА (0,8 мМ) в псевдопероксидазной системе в отсутствие РМС (1) и в присутствии 30 (2), 50 (3), 80 (4), 100 (5), 200 (6), 300 (7), 400 (8) и 500 (9) мкМ РМС; б – Зависимость величины $[FAD]_0/V_0$ от концентрации РМС при различных начальных концентрациях ФДА: 1 – 0,2, 2 – 0,35, 3 – 0,5 и 4 – 0,75 мМ. Условия: 20°C, 3ФР, рН 7,4, 5,25% ДМФ, 10 мкМ гемина, 30 мкМ БСА и 6,0 мМ H_2O_2

На рисунке 2а представлены кинетические кривые роста A_{455} при окислении ФДА в отсутствие ингибитора (1) и в присутствии возрастающих концентраций соединения TS-2

(2-9). Зависимости обратной начальной скорости окисления ФДА от концентрации TS-2 (координаты Диксона) подтверждают **бесконкурентный тип ингибирования**, которое характеризуется величиной $K_i=143$ мкМ, определенной по данным рисунка 2в из зависимостей в координатах Корниш-Боудена.

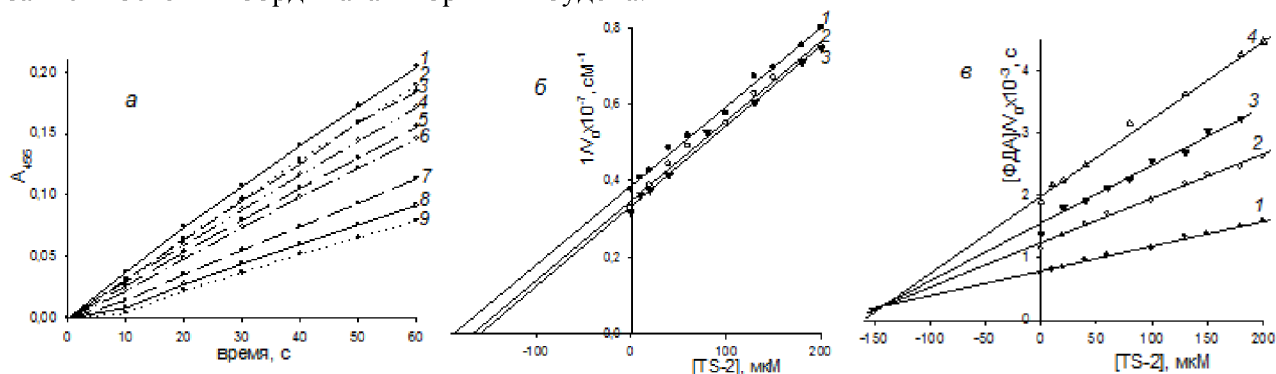
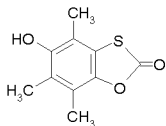
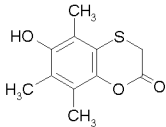
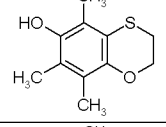
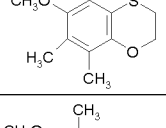
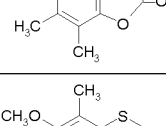
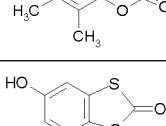
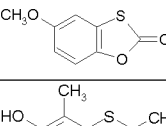
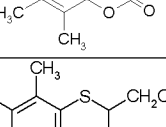
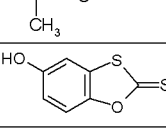
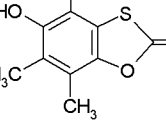
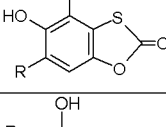
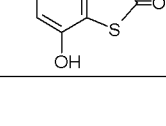




Рисунок 2 – а – Кинетика роста оптической плотности продукта окисления ФДА (0,8 мМ) в псевдопероксидазной системе в отсутствие TS-2 (1) и в присутствии 10 (2), 30 (3), 50 (4), 80 (5), 100 (6), 200 (7), 300 (8) и 400 (9) мкМ TS-2; б – Зависимость обратной величины начальной скорости окисления ФДА от концентрации TS-2 при различных начальных концентрациях ФДА: 1 – 0,2, 2 – 0,35, 3 – 0,6 мМ; в – Зависимость величины $[FAD]/V_0$ от концентрации TS-2 при различных начальных концентрациях ФДА: 1 – 0,2, 2 – 0,35, 3 – 0,45 и 4 – 0,6 мМ. Условия: 20°C, 3ФР, pH 7,4, 5,25% ДМФ, 10 мкМ гемина, 30 мкМ БСА и 6,0 мМ H_2O_2

По аналогичной схеме охарактеризовано сопряженное окисление ФДА с Тролоксом, циклопроизводными метилзамещенных фенолов TS-1, TS-3-12 и трет.бутилзамещенных фенолов TS-13-17. Из зависимостей в двойных обратных координатах V_0 от $[FAD]_0$ при разных концентрациях Тролокса определен **смешанный тип ингибирования**, а из зависимостей в координатах Диксона – величина K_i , равная 143 мкМ, т.е. Тролокс характеризуется умеренной ингибирующей активностью и значительно уступает по эффективности другому аналогу α -токоферола – РМС ($K_i=88$ мкМ). В тех случаях, когда глубина ингибирования окисления ФДА была невелика, в качестве характеристики процесса использован уровень ингибирования в процентах при определенной концентрации InH в реакционной смеси. В таблице 1 сведены количественные характеристики ингибирования окисления ФДА синтетическими аналогами α -токоферола Тролоксом, РМС, ТО-15 и серосодержащими циклопроизводными фенолов TS-1-14, TS-6 и TS-17 и сопоставлены с их структурными формулами.

Таблица 1 – Кинетические характеристики ингибирования окисления ФДА в системе «MetHa- H_2O_2 -ФДА» синтетическими аналогами α -токоферола при 20°C в 3ФР, pH 7,4, содержащем компоненты: MetHa (10 мкМ гемин, 30 мкМ БСА), 6 мМ H_2O_2 и 5,25% ДМФ; *MetHa (10 мкМ гемин, 5 мкМ БСА), 6 мМ H_2O_2 , 6% ДМФ и 0,25% ДМСО; **MetHa (10 мкМ гемин, 30 мкМ БСА), 6 мМ H_2O_2 и 11,1% ДМФ; R – трет.бутил; типы ингибирования: **бк** – бесконкурентный и **см** – смешанный

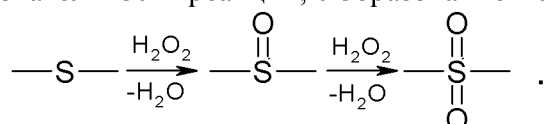
Шифр InH	Структурная формула InH	$[InH]_{\max}$, мкМ	K_i , мкМ и % ингибирования	Тип ингибирования
Тролокс *		300	143 34%	см
РМС		600	88 80,4%	см

TS-1		200	131 67%	см
TS-2		400	143 56%	бк
TS-3		600	144 75%	см
TS-4		250	21%	—
TS-5		150	5%	—
TS-6*		300	~ 0%	—
TS-7*		120	265 36%	бк
TS-8*		300	25%	бк
TS-9*		100	130 39%	—
TS-10*		80	60 43%	бк / см
TS-11*		120	180 45 %	—
TS-12*		12	10 36%	бк
TS-13		150	25 84,5%	см
TS-14		80	21%	—

TO-15		80	18%	—
TS-16		80	17%	—
TS-17		80 130**	7,8% 12,2%	—

Характер ингибирования бесконкурентный или смешанный. При бесконкурентном типе ингибирования ингибитор взаимодействует только с комплексом MetHa-ФДА и не взаимодействует с активным центром самого биокатализатора. При смешанном типе ингибирования происходит частичная конкуренция InH и ФДА за связывание в активном центре биокатализатора и конкуренция за активные радикалы HO[•], которые являются главными окисляющими агентами в системе MetHa-H₂O₂-ФДА-InH [9, 11]. Ясно, что разные типы ингибирования объясняются особенностями структуры использованных ингибиторов.

По эффективности ингибирующего действия на окисление ФДА наиболее активные ингибиторы могут быть расположены в ряд в порядке возрастания величины K_i: TS-12>TS-13>TS-10>PMC>TS-9>TS-1>TS-2=Тролокс>TS-3>TS-7, которая меняется от 10 мкМ для TS-12 до 265 мкМ для TS-7. Главным условием высокого ингибирующего действия является наличие фенольной HO-группы, которая представляет собой основной радикал-акцептирующий центр. Метилирование этой группы у соединений TS-4-6, TS-8 приводит к резкому снижению ингибирующих потенциалов, а в случае TS-6 к полной потере ингибирующей способности. Следует отметить, что в трех случаях (TS-4,5,8) полной потери ингибирующей активности не происходит, что может быть связано с участием атомов серы в гетеролитическом разложении окисляющего субстрата H₂O₂ по известной последовательности реакций, с образованием сульфоксида и сульфона [21]:

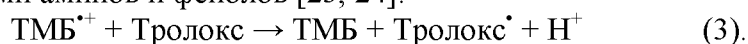


Вторым по важности фактором, влияющим на ингибирующую активность InH, является наличие и число алкильных заместителей в бензольном кольце: сравнение TS-1 и TS-7 показывает, что в первом случае три метильных группы обеспечивают K_i=131 мкМ, а во втором – при полном отсутствии этих групп K_i=265 мкМ. Наличие трех метильных заместителей у большинства InH или двух трет-бутильных групп у соединений TS-13,14 обеспечивает высокий уровень ингибирования окисления ФДА, так как электронодонорный характер этих групп способствует снижению энергии HO-связи и повышению реакционной способности аналогов α-токоферола по отношению к радикалам HO[•] [4]. Как известно, алкильные группы влияют на спиновую плотность в образующихся радикалах, что вносит вклад в увеличение их стабильности [22]. Влияние электронодонорных групп на антирадикальную активность InH зависит от положения HO-группы в ароматическом кольце: при ее перемещении из положения 5 в положение 7 (соединения TS-13 и TS-14) отмечается резкое снижение ингибирующей активности. Трет-бутильные группы оказывают более сильное влияние на радикал-акцептирующий центр аналогов α-токоферола: замена метильных групп у TS-1 на трет-бутильные у TS-13 приводит к сильному увеличению ингибирующей активности и снижению K_i от 131 до 25 мкМ. Однако следует учитывать, что введение трет-бутильных групп в молекулу InH приводит к возрастанию роли стерических препятствий при взаимодействии InH с активным центром биокатализатора.

Рекордную ингибирующую активность в окислении ФДА показало соединение TS-12, имеющее три метильных заместителя в ароматическом кольце и два атома серы в пятичленном гетероцикле, причем неспаренные электроны серы сопряжены с двойной связью $>C=S$. Замена трех метильных групп на две трет-бутильные и связи $>C=S$ на $>C=O$ в соединении TS-13 приводит к снижению ингибирующей активности и увеличению K_i до 25 мкМ в сравнении с 10 мкМ у TS-12. РМС и особенно Тролокс, имеющие шестичленный гетероциклический фрагмент и не содержащие атома серы, сильно уступают TS-12 и TS-13 по ингибирующей эффективности. Тролокс сопоставим по ингибиторным свойствам с TS-1-3,9, имеющим серосодержащий шестичленный гетероциклический фрагмент. Таким образом, для достижения высокой ингибирующей эффективности в окислении ФДА в псевдопероксидазной системе ингибитор должен содержать НО-группу и алкильные заместители в ароматическом кольце, а также атомы кислорода и серы в пяти- или шестичленном гетероциклическом фрагменте.

Ингибирование окисления ТМБ в псевдопероксидазной системе

На рисунке 3а показаны кинетические кривые роста A_{655} при окислении ТМБ в псевдопероксидазной системе в отсутствие ингибитора (1) и в присутствии возрастающих концентраций Тролокса от 5 до 50 мкМ (2–7). Как видим, кинетика окисления ТМБ характеризуется лаг-периодом, продолжительность которого в полном соответствии с теорией метода ингибиторов радикальных реакций [20] прямо пропорциональна начальной концентрации Тролокса (рисунок 3б). На основании данных рисунка 3б с использованием уравнений (1) и (2) из методической части статьи, вычислена величина $f=0,84$, т.е. в условиях эксперимента с одним катион-радикалом TMB^{*+} взаимодействует одна молекула Тролокса по известной обменной реакции (3), открытой Н.М. Эмануэлем и сотрудниками при ингибировании свободно-радикального жидкофазного окисления углеводородов смесями аминов и фенолов [23, 24]:



Реакция (3) объясняет наличие периодов индукции в окислении ТМБ в присутствии Тролокса (рисунок 3а), так как обеспечивает регенерацию окисленного амина до исходного состояния этого субстрата.

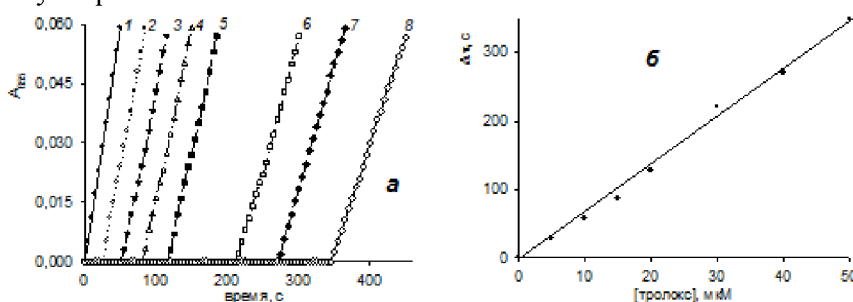
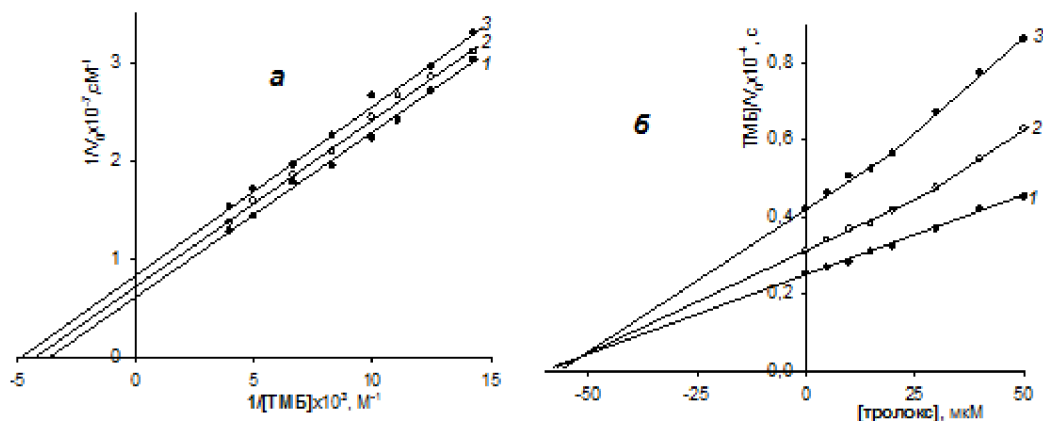


Рисунок 3 – а – Кинетика роста оптической плотности (A_{655}) продукта окисления ТМБ (0,25 мМ) в псевдопероксидазной системе в отсутствие Тролокса (1) и в присутствии 5 (2), 10 (3), 15 (4), 20 (5), 30 (6), 40 (7) и 50 (8) мкМ ингибитора при 20°C, ЗФР, рН 7,4, 10 мкМ гемина, 5 мкМ БСА, 0,5 мМ H_2O_2 , 6% ДМФ и 0,25% ДМСО; б – Зависимость продолжительности периода индукции в накоплении продукта окисления ТМБ от начальной концентрации Тролокса

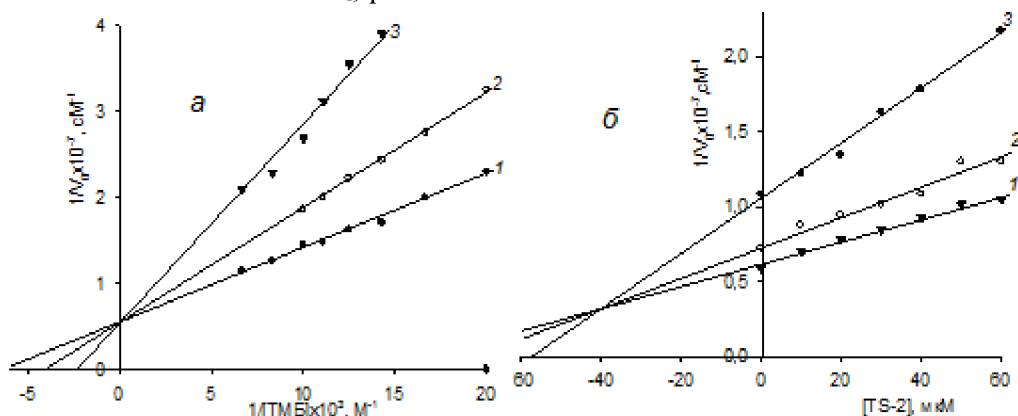
На рисунке 4а в двойных обратных координатах представлены зависимости начальной скорости окисления ТМБ от его начальной концентрации без Тролокса (1) и в его присутствии (2, 3). Характер зависимостей соответствует **бесконкурентному типу ингибирования**. На рисунке 4б показаны зависимости обратной скорости ингибированного окисления ТМБ после окончания периода индукции от концентрации Тролокса: по данным рисунка вычислена величина K_i , равная 51 мкМ, что свидетельствует о высокой ингибирующей активности Тролокса при окислении ТМБ в псевдопероксидазной системе, которая в 2,8 раза больше, чем при окислении ФДА (см. таблицу 1).



a – 1 – 0, 2 – 10 и 3 – 20 μM Тролокса; *б* – 1 – 0,25, 2 – 0,15 и 3 – 0,1 mM ТМБ

Рисунок 4 – Зависимости обратной скорости окисления ТМБ от его обратной концентрации (*a*) и величины $[TMB]/V_0$ от начальной концентрации Тролокса (*б*) в системе MetHa (10 μM гемина/5 μM БСА) при 20°C, в ЗФР, pH 7,4, 0,5 mM H_2O_2 , 6% ДМФ и 0,25% ДМСО

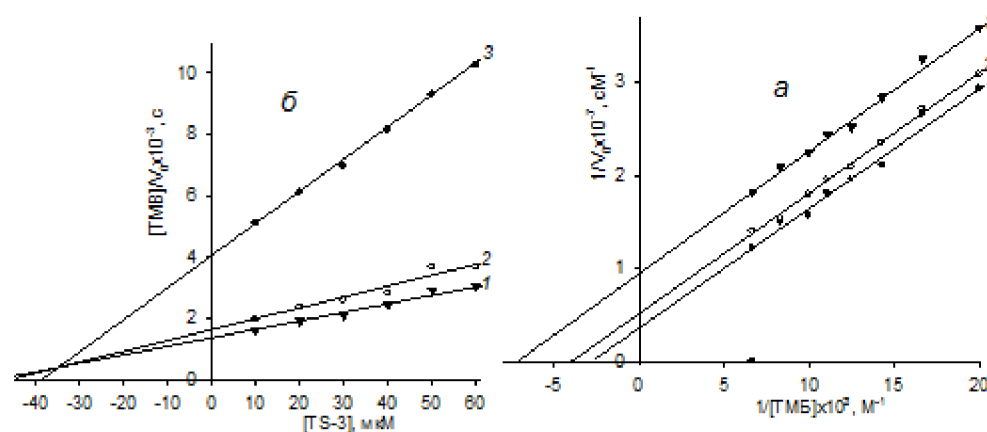
На рисунке 5а представлены зависимости в координатах Лайнуивера-Берка при окислении ТМБ, ингибированном соединением TS-2. Характер зависимостей соответствует **конкурентному типу ингибирования**, т.е. TS-2 конкурирует с ТМБ за связывание в активном центре MetHa и за активные радикалы HO^\bullet . Отметим, что при окислении ФДА TS-2 ингибировал процесс бесконкурентно (рисунок 2б). По данным рисунка 5б в координатах Диксона вычислена величина K_i , равная 40 μM .



a – 1 – 0, 2 – 15 и 3 – 40 μM TS-2; *б* – 1 – 0,25, 2 – 0,15 и 3 – 0,075 mM ТМБ

Рисунок 5 – Зависимости обратной скорости окисления ТМБ от его обратной концентрации (*a*) и от начальной концентрации соединения TS-2 (*б*) в системе MetHa (10 μM гемина/5 μM БСА) при 20°C, в ЗФР, pH 7,4, 0,5 mM H_2O_2 , 6% ДМФ и 0,25% ДМСО

На рисунке 6а, б представлены зависимости в координатах Лайнуивера-Берка (*a*) и Корниш-Боудена (*б*), полученные при сопряженном окислении ТМБ-TS-3, из которых следует, что ингибирование соответствует **бесконкурентному типу**, а величина K_i для TS-3 равна 35 μM .

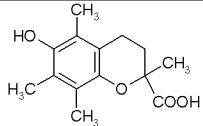
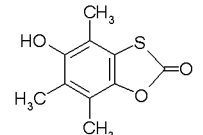
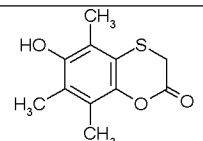


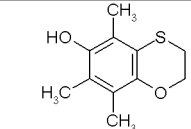
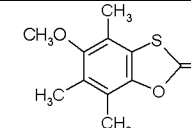
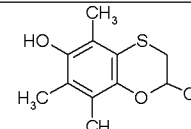
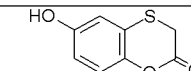
a – 1 – 0, 2 – 20 и 3 – 40 мкМ TS-3; b – 1 – 0,075, 2 – 0,15 и 3 – 0,5 мМ ТМБ

Рисунок 6 – Зависимости скорости окисления ТМБ от его начальной концентрации в обратных координатах (a) и величины $[TMB]/V_0$ от начальной концентрации соединения TS-3 (b) в системе MetHa (10 мкМ гемина/5 мкМ БСА) при 20°C, в ЗФР, pH 7,4, 0,5 мМ H₂O₂, 6% ДМФ и 0,25% ДМСО

По аналогичной схеме изучено сопряженное окисление ТМБ с соединениями TS-1,5,18 и 19. Кинетические характеристики ингибированного окисления ТМБ с Тролоксом и другими синтетическими аналогами α -токоферола представлены в таблице 2 и сопоставлены со структурой фенольных ингибиторов. Наиболее эффективные ингибиторы в соответствии с величинами K_i могут быть расположены в ряд по убывающей активности: TS-1>TS-19>TS-3>Тролокс>TS-2>TS-18>TS-5. Метилирование HO-группы у соединения TS-1 приводит к резкому снижению ингибирующей активности: K_i для соединения TS-5 равняется только 260 мкМ в сравнении с 9 мкМ для TS-1 (см. таблицу 2). Соединение TS-18, у которого в шестичленном гетероциклическом фрагменте карбонильная группа заменена метильной, не обнаружило высокой ингибирующей активности в окислении ТМБ.

Таблица 2 – Кинетические характеристики ингибирования окисления ТМБ в системе «MetHa-H₂O₂-ТМБ» синтетическими аналогами α -токоферола при 20°C в ЗФР, pH 7,4, содержащем компоненты: MetHa (10 мкМ гемин, 5 мкМ БСА), 3 мМ H₂O₂, 5% ДМФ и 0,25% ДМСО; *MetHa (10 мкМ гемин, 5 мкМ БСА), 0,5 мМ H₂O₂, 6% ДМФ и 0,25% ДМСО; типы ингибирования: **бк** – бесконкурентный, **см** – смешанный, **к** – конкурентный и **нк** – неконкурентный

Шифр InH	Структурная формула InH	$[InH]_{\max}$, мкМ	K_i , мкМ и % ингибирования	Тип ингибирования	f
Тролокс*		50	51 51%	бк	0,84
TS-1		10	9 53%	см	4,7
TS-2*		60	40 44%	к	0,4– 2

TS-3*		60	35 50%	бк	1– 2,5
TS-5		300	260 19%	–	–
TS-18		300	61%	–	–
TS-19*		40	25 54%	нк	–

Сравнение количественных характеристик ингибирования окисления ФДА и ТМБ (таблицы 1 и 2) показывает, что величины K_i для одних и тех же ингибиторов существенно ниже при окислении ТМБ: 9 и 131 мкМ для TS-1; 40 и 143 мкМ для TS-2, 35 и 144 мкМ для TS-3; 51 и 143 мкМ для Тролокса. Таким образом, ряд активности ингибиторов при окислении ТМБ и ФДА одинаков, но сама активность намного выше при окислении ТМБ в сравнении с окислением ФДА, что объясняется более высокой реакционной способностью первичного продукта окисления ТМБ – катион-радикала ТМБ^{•+} в сравнении с аминильным радикалом ФДА[•] в обменной реакции (3) с фенольными радикалами – аналогами α -токоферола и доказывается наличием периодов индукции при окислении пар ТМБ-фенол и их отсутствием во всех случаях при окислении пар ФДА-фенол: в ингибированном окислении регенерация ТМБ наблюдается, а регенерации ФДА нет совсем.

На характер ингибирования влияет как природа субстрата, так и структура ингибитора: при окислении пар ТМБ-фенолы и ФДА-фенолы ингибирование может быть смешанным, бесконкурентным, конкурентным и неконкурентным и зависит даже от незначительных изменений структуры ингибитора.

Приведенные в этой работе и ранее экспериментальные данные [8–12] подтверждают адекватность константы ингибирования K_i как количественного критерия эффективности ингибирования в процессах псевдопероксидазного и пероксидазного окисления ароматических аминов в присутствии и при участии многочисленных фенолов. Однако следует помнить, что величины K_i являются эффективными и отражают реакционную способность замещенных фенолов по отношению к радикальным агентам, силу и характер взаимодействия ингибиторов с белковой глобулой биокатализатора, участие в процессе ингибирования не только фенольных HO-групп, но и других компонентов структуры (атомов серы, сопряженных с карбонильной >C=O или >C=S – группами), присутствие радикал-акцептирующих органических соразтворителей (ДМФ, ДМСО), а также влияние pH, состава реакционной смеси и температуры.

Мы считаем, что приведенные в этой работе данные указывают пути дальнейшего повышения эффективности ингибиторов – аналогов α -токоферола, так как синтезированы и охарактеризованы соединения TS-1, 2, 3, 12, 13, ингибирующая активность которых существенно выше, чем у известных Тролокса и РМС. При определении ОАА биологических жидкостей с использованием тест-системы «MetHa-H₂O₂-ФДА-InH» в качестве ингибиторов-калибраторов нами рекомендуется для дальнейшего использования кроме уже применяемых Тролокса и РМС [9, 10, 12] соединения TS-12 и TS-13 в паре с субстратом акцептором ФДА и TS-1, TS-2 и TS-3 в паре с ТМБ (см. таблицы 1 и 2).

Следует указать на еще один аспект использования синтетических аналогов α -токоферола. В результате фармакологического тестирования соединений TS-1, 2, 14, 16 и 17 (таблица 1) показано, что все они обладают выраженной противовирусной активностью в отношении вируса простого герпеса I типа [17]. Из таблицы 1 следует, что все пять

перечисленных соединений являются также носителями антирадикальных свойств. При изучении влияния этих же соединений на размножение вируса гриппа А получены данные, свидетельствующие об отсутствии антивирусных свойств у этих соединений в пределах нетоксичных концентраций в отношении указанного типа вируса [17]. Удовлетворительное соответствие противовирусной активности в отношении вируса простого герпеса с антирадикальной активностью получены только для соединений TS-1, 2, 14 и 16, а антирадикальные свойства TS-17 выражены очень слабо, т.е. между антиоксидантными и антивирусными свойствами не обязательно полное соответствие. Соотношение антиоксидантной и антивирусной активности одних и тех же химических агентов требует дальнейшего углубленного изучения.

Представленная работа выполнена при финансовой поддержке Международного научно-технического центра (МНТЦ) по проектам В-1206 и В-1746.

Список литературы

1. Oxygen Radicals and the Disease Process (Thomas, C.E., Kalyanaraman, B., Eds.) / Harwood Academic Publishers, 1998. – 296 p.
2. Halliwell, B. Free Radicals in Biology and Medicine, 3rd Edition / B. Halliwell, J.M.C. Gutteridge. – Clarendon Press, Oxford, 1999.
3. Окислительный стресс: патологические состояния и заболевания / Е.Б. Меньщикова, [и др.]. – АРТА, Новосибирск, 2008. – 284 с.
4. Бурлакова, Е.Б. Кинетические особенности токоферолов как антиоксидантов / Е.Б. Бурлакова, С.А. Крашаков, Н.Г. Храпова // Биологические мембраны. – 1998. – Т. 15, № 2. – С. 137–162.
5. De Clercq, E. In search of a selective antiviral chemotherapy / E. De Clercq // Clinical Microbiol. Reviews. – 1997. – Vol. 10, № 4. – P. 674–693.
6. De Clercq, E. New developments toward anti-HIV chemotherapy / E. De Clercq // Current Medicinal Chem. – 2001. – Vol. 8. – P. 1543–1572.
7. De Clercq, E. New approaches toward anti-HIV chemotherapy / E. De Clercq // J. Medicinal Chem. – 2005. – Vol. 48, № 5. – P. 1297–1313.
8. Русь, О.Б. Высокоэффективная тест-система для определения общей антиоксидантной активности сыворотки крови человека / О.Б. Русь, Д.И. Метелица // Весці НАН Беларусі. Сер. хім. Навук. – 2001. – № 4. – С. 75–82.
9. Метелица, Д.И. Иницирование и ингибирование свободнорадикальных процессов в биохимических пероксидных системах / Д.И. Метелица, Е.И. Карасева // Прикл. биохимия и микробиология. – 2007. – Т. 43, № 5. – С. 537–564.
10. Высокоэффективная тест-система для определения общей антиоксидантной активности сыворотки крови человека / Ю.А. Григоренко [и др.] // Биомедицинская химия. – 2009. – Т. 55, № 3. – С. 350–360.
11. Ингибирование окисления ароматических аминов в гемсодержащих гидроперекисных системах замещенными 4,6-ди-трет-бутилпирокатехинами / Д.И. Метелица [и др.] // Биохимия. – 1997. – Т. 62, № 3. – С. 323–333.
12. Высокоэффективные тест-системы оценки общей антиоксидантной активности биологических жидкостей / Д.И. Метелица [и др.] // Труды Белорус. гос. университета. Физиологические, биохимические и молекулярные основы функционирования биосистем. – 2008. – Т. 3, ч. 1. – С. 7–21.
13. Studies on haemin in dimethylsulphoxide-water mixtures / S.G. Collier [et al.] // Biochem. J. – 1979. – Vol. 179, № 2. – P. 281–289.
14. Chmelik, I. / I. Chmelik, I. Kadlec, N. Kalons // J. Electroanal. Chem. – 1979. – Vol. 99, № 2. – P. 245–250.
15. Метелица, Д.И. Оптимизация использования пероксидазы хрена и её антител в иммуноферментном анализе / Д.И. Метелица, М.И. Савенкова, В.П. Курченко // Прикл. биохимия и микробиология. – 1987. – Т. 23, № 1. – С. 116–124.

16. 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 // *Bioorg. and Medicinal Chem. Letters*. – 2006. – Vol. 16, № 5. – P. 1236–1239.

17. Повалишев, Н.В. Антиоксидантные и антирадикальные свойства карбонил- и серосодержащих структурных аналогов α -токоферола. / Н.В. Повалишев. – Дисс...доктора хим. наук. – Минск: БГУ, 2008. – 105 с.

18. Келети, Т. Основы ферментативной кинетики / Т. Келети. – Москва, Мир, 1990. – С. 183–203.

19. Диксон, М. Ферменты / М. Диксон, Э. Уэбб. – Москва, Мир, 1982. – Т. 2. – С. 507.

20. Эмануэль, Н.М. Химическая физика старения и стабилизации полимеров / Н.М. Эмануэль, А.Л. Бучаченко. – Москва, Наука, 1982. – С. 239–308.

21. Harris, R.Z. Horse-radish Peroxidase-catalyzed two-electron oxidations / R.Z. Harris, S.L. Newmyer, P.R. Ortiz de Montellano // *J. Biol. Chem.* – 1993. – Vol. 263, № 3. – P. 1637–1645.

22. Бурлакова, Е.Б. / Е.Б. Бурлакова, С.И. Бушелев, И.Л. Шамовский // *Хим. физика*. – 1989. – Vol. 8, № 11. – С. 1471–1474.

23. Карпухина, Т.В. Взаимодействие двух ингибиторов в реакции окисления углеводов / Т.В. Карпухина, З.К. Майзус, Н.М. Эмануэль // *Докл. АН СССР*. – 1963. – Т. 152, № 1. – С. 110–114.

24. Карпухина, Т.В. О механизме синергистического эффекта смесей ингибиторов в реакциях жидкофазного окисления / Т.В. Карпухина, З.К. Майзус, Н.М. Эмануэль // *Докл. АН СССР*. – 1965. – Т. 160, № 1. – С. 158–162.

ANTIOXIDANT ACTIVITY OF CYCLODERIVATES OF ALKYL-SUBSTITUTED PHENOLS – ANALOGS OF α -TOCOPHEROL IN PSEUDOPEROXIDASE SYSTEMS

M.V. Potapovich, Yu.A. Grigorenko*, D.I. Metelitsa, G.I. Polozov**, O.I. Shadyro****

Research Institute of Physico-Chemical Problems of Belarusian State University, Minsk, Belarus

**Biological Faculty of Belarusian State University, Minsk, Belarus*

***Chemical Faculty of Belarusian State University, Minsk, Belarus*

The comparative kinetic study of inhibited oxidation of *o*-phenylenediamine (*o*-PDA) and tetramethylbenzidine (TMB) with participation of Trolox, 2,2,5,7,8-pentamethylchroman-6-ol (PMC) and 19 cycloderivatives of alkylsubstituted phenols was carried out in pseudoperoxidase system «methemalbumin-H₂O₂» at 20°C in buffered physiological solution, pH 7,4. Antioxidant activity of synthetic analogs of α -tocopherol was quantitatively characterized by effective inhibition constants K_i , μ M and /or degree of inhibition in percentages. The values K_i are varied out in the range 9–265 μ M and depended on the substrate nature and phenolic inhibitor's structure, most active of those must contain HO-group and alkylic substituents in aromatic ring and the oxygen and sulphur atoms in penta- or six-member heterocyclic fragment. Most effective inhibitors were more active than the known antioxidants Trolox and PMC and may be used in the test-systems of total antioxidant activity of biological fluids together with the free radical's acceptors PDA or TMB.