ИЗУЧЕНИЕ АНТИРАДИКАЛЬНОЙ АКТИВНОСТИ БИОЛОГИЧЕСКИ АКТИВНЫХ ВЕЩЕСТВ С ПОМОЩЬЮ ФЛУОРЕСЦЕНТНОГО ЗОНДА – 2-ГИДРОКСИТЕРЕФТАЛЕВОЙ КИСЛОТЫ

А. С. Веренич, И. Л. Юркова

ВВЕДЕНИЕ

В организме в результате биохимических процессов или действия различных внешних физико-химических факторов происходит образование активных форм кислорода (АФК) ($O_2^{\cdot -}$, H_2O_2, HClO, $HO^{\cdot}$). Среди АФК гидроксильный радикал ($HO^{\cdot}$) является самой реакционноспособной и токсичной частицей, известной в настоящее время [1]. Радикалы $HO^{\cdot}$ инициируют процессы деструкции важнейших биомолекул и играют решающую роль в развитии патологических процессов в биосистемах [1].

Для защиты организма от окислительного стресса применяют широкий спектр антиоксидантов (АО), которые могут предотвращать образование или акцептировать образовавшиеся свободные радикалы [1]. Для выбора подходящего антиоксиданта необходимы различные методы оценки антирадикальной активности веществ.

Метод флуоресцентных зондов базируется на том, что взаимодействие АФК с определенными веществами приводит либо к снижению их собственной флуоресценции, либо к образованию флуоресцирующих продуктов [2]. Терефталевая кислота (ТФ) является специфичным и высокочувствительным детектором радикалов $HO^{\cdot}$(< 0,5 пикоМ), она взаимодействует с $HO^{\cdot}$ ($k_v = 4{,}4 \cdot 10^9$ $M^{-1} \cdot c^{-1}$) с образованием только одного моно-гидроксилированного изомера, 2-гидрокси-терефталата (2-ГТФ), который является стабильным и в отличие от ТФ обладает флуоресценцией ($\lambda_{воз} = 315$ нм, $\lambda_{эм} = 428$ нм) [3].

Целью данной работы было определение антирадикальной активности маннита, азида натрия, цистеина и таурина в условиях Fe^{2+}-опосредованного генерирования радикалов $HO^{\cdot}$.

ЭКСПЕРЕМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Один из путей образования радикалов $HO^{\bullet}$ в организме – это разложение H_2O_2, катализируемое ионами переходных металлов (Fe^{2+}, Cu^{+}) [1]. В данной работе в качестве генератора радикалов $HO^{\cdot}$ была выбрана редокс-система Fe^{2+}/EDTA/H_2O_2. Этилендиаминтетрауксусная кислота (EDTA) образует комплекс с Fe (II) (lgK 14.3), но при этом усиливает его

каталитическую способность разлагать H_2O_2 с образованием радикалов $HO^{\bullet}$. Водные растворы тестируемых соединений и компонентов редокс-системы, а также буферный раствор готовили на деионизированной воде.

Процедура детектирования 2-ГТФ в тест-системе была следующая. Готовили контрольную систему общим объемом 2000 мкл: к раствору 9 мМ ТФ (12 мкл) добавляли компоненты редокс-системы (2 мкл 50 мМ раствора $FeSO_4$, 2 мкл 50 мМ раствора EDTA, 4 мкл 50 мМ раствора H_2O_2,) и доводили до общего объема фосфатным буфером (pH 7,4). Тестируемые вещества вводили перед добавлением компонентов редокс-системы. Полученные системы инкубировали при комнатной температуре в течение 5 мин и измеряли флуоресценцию при 428 нм на спектрофлуориметре «Solar CM2203».

АРА тестируемых веществ оценивали по их способности конкурировать с ТФ за взаимодействие с частицами $HO^{\cdot}$, что препятствует образованию флуоресцирующего продукта – 2-ГТФ:

$Fe(II)\text{-}EDTA + H_2O_2 \rightarrow Fe(III)\text{-}EDTA + HO^{\cdot} + OH^-$

$ТФ + HO^{\cdot} \xrightarrow{k1} ТФ\text{-}OH \longrightarrow$

$S(акцептор) + HO^{\cdot} \xrightarrow{k2} продукт \longrightarrow$

Для расчета констант скоростей реакций соединений с радикалом $HO^{\cdot}$ использовали адаптированное уравнение Штерна-Фольмера:

$$\frac{F_0}{F} = 1 + \frac{[S] * k_2}{[ТФК] * k_1}$$

где F_0 и F – интенсивность флуоресценции 2-ГТФ в контрольном образце и в присутствии тестируемого вещества, соответственно; [S] - концентрация тестируемого вещества; k_2-константа реакции тестируемого вещества с $HO^{\cdot}$; k_1- константа реакции ТФ с $HO^{\cdot}$ ($4{,}4 \times 10^9$ $M^{-1}c^{-1}$ [3]).

Получали прямолинейные зависимости в координатах $(F_0/F\text{-}1)$-[S]/[ТФ], и по тангенсу угла наклона прямых находили константы скорости.

Для расчета индекса IC_{50}(концентрация полумаксимального ингибирования) использовали логарифмическую форму выше приведенного уравнения: $\log(F_0/F\text{-}1) = \log[S] + \log(k_2/k_1[ТФ])$. Строили прямые в координатах $\log(F_0/F\text{-}1)$ - log[S] и получали значение индекса IC_{50} (если $F=1/2F_0$, то $\log(F_0/F\text{-}1) =0$).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Введение азида натрия в раствор ТФ, инкубированный с системой $Fe^{2+}/EDTA/H_2O_2$, сопровождается снижением интенсивности флуоресценции системы в сравнении с контролем (рис. 1). Это указывает на то, что NaN_3 конкурирует с ТФ за взаимодействие с радикалами $HO^{\cdot}$, и свидетельствует о его радикал-акцепторных свойствах. На основании полу-

ченных данных были рассчитаны величины $k_{vHO^{\cdot}}$ и индекса IC_{50}, приведенные в таблице. При тестировании маннита наблюдается аналогичная с NaN_3 зависимость, что свидетельствует о его АРА. Однако для маннита величина IC_{50} значительно выше, чем таковая для NaN_3, что указывает на его более слабую способность акцептировать радикалы $HO^{\cdot}$. Более низкое значение $k_{vHO^{\cdot}}$, рассчитанное для маннита, также указывает на это.

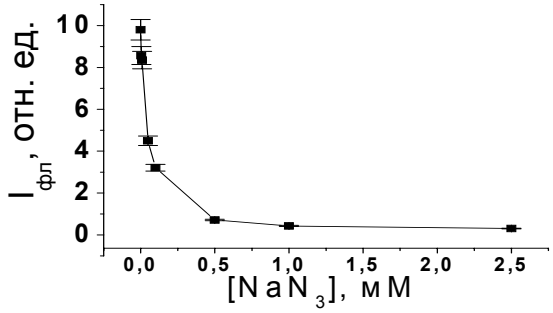

Рис. 1. Зависимость интенсивности флуоресценции 2-ГТФ от концентрации азида натрия при генерировании $HO^{\cdot}$ редокс-системой Fe^{2+}/EDTA/H_2O_2 (1:1:2)

Таблица

Величины индексов IC_{50} и $k_{vHO^{\cdot}}$, полученные в работе, для тестируемых соединений

Соединение	Индекс IC_{50}, мМ	$k_{vHO^{\cdot}}$, $M^{-1}c^{-1}$
NaN_3	0,04	$5{,}02 \times 10^9$
маннит	0,13	$1{,}2 \times 10^9$
цистеин	1,4	$2{,}75 \times 10^8$
таурин	22,4	$1{,}05 \times 10^7$

При исследовании сульфокислоты таурина, наблюдается немного другая ситуация. Таурин лишь в высоких концентрациях вызывает снижение интенсивности флуоресценции системы, что указывает на его низкую способность акцептировать радикалы $HO^{\cdot}$. Это подтверждают рассчитанные величины $k_{vHO^{\cdot}}$ и IC_{50} (таблица).

Исследование АРА цистеина (RSH), содержащего активную SH-группу, показало, что его эффект значительно отличается от такового, полученного для таурина. При добавлении цистеина в систему флуоресцентный сигнал в сравнении с контролем изменяется неоднозначным образом. А именно, в диапазоне концентраций цистеина 0.005-0.5 мМ повышается, а в области 1-10 мМ – снижается (рис. 2).

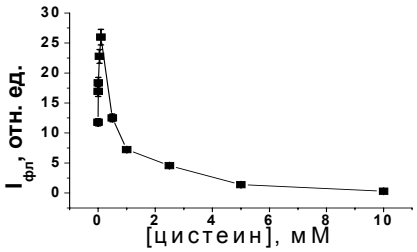

Рис. 2. Зависимость интенсивности флуоресценции 2-ГТФ от концентрации цистеина при генерировании $HO^{\cdot}$ редокс-системой $Fe^{2+}/EDTA/H_2O_2$(1:1:2)

Для биотиола получена достаточно высокая величина индекса IC_{50}, составляющая 1.4 мМ. Согласно литературным данным цистеин реагирует с радикалами $HO^{\bullet}$ с высокой константой скорости $3.4x10^{10}$ $M^{-1}c^{-1}$ и является хорошим акцептором данных частиц [1]. Рассчитанная в работе константа скорости значительно ниже, что указывает на более сложные химические процессы, протекающие в используемой тест-системе в присутствии цистеина. Прооксидантное действие биотиола можно объяснить прямым взаимодействием цистеина с Fe(III)EDTA, что приводит к восстанавлению ионов Fe^{3+} и, тем самым, возвращает их в каталитический цикл разложения H_2O_2. С увеличением концентрации цистеина в системе его способность акцептировать радикалы $HO^{\cdot}$ становится превалирующей. В целом, механизм действия цистеина, по-видимому, обусловлен балансом его радикал-акцепторных и восстановительных свойств, а также соотношением компонентов в системе.

Таким образом, при тестировании соединений в системе ТФ-Fe^{2+}-EDTA-H_2O_2 установлено, что АРА снижается в ряду азид натрия, маннит, таурин в соответствии с их величинами индекса IC_{50}. Полученные значения констант скорости $k_{vHO\cdot}$ для азида, маннита и таурина хорошо согласуются с литературными данными ($1.1x10^{10}$, $1.7x10^{9}$ и $2.42x10^{6}$ - 1.4 10^{7} $M^{-1}c^{-1}$ соответственно [1]). В случае цистеина, его роль в регулировании уровня $HO^{\bullet}$ более сложная, чем просто акцептирование этих частиц. Полученные данные указывают на то, что флуоресцентный зонд, терефталевая кислота, может быть использован не только для оценки АРА веществ, но и для получения информации об их возможном прооксидантном действии в присутствии ионов Fe^{2+}.

Литература

1. *B. Halliwell, J.M.C. Gutteridge.* Free radicals in biology and medicine, fourth edition / Oxford : University press, 2012. 851 p.
2. *A. Gomes, Ed. Fernandes, L.F.C. Lima.* Fluorescence probes used for detection of reactive oxygen species/ J. Biochem. Biophys. Methods, 2005. №65. с. 45–80.
3. *R. W. Matthews.* The Radiation Chemistry of the Terephthalate Dosimeter/ Rad. Research, 1980. V. 83, P. 27–41.