

К.В. Александрова, І.Ф. Беленічев, Н.В. Бухтіярова, О.С. Шкода, С.В. Левіч

(3-БЕНЗИЛКСАНТИНІЛ-8)МЕТИЛТІОАЦЕТАТИ: АНТИОКСИДАНТНА ДІЯ В УМОВАХ МОДЕЛЬОВАНОГО НІТРОЗУЮЧОГО СТРЕСУ *IN VITRO*

Запорізький державний медичний університет

Ключові слова: антиоксидантна активність, водорозчинні похідні ксантину.

Ключевые слова: антиоксидантная активность, водорастворимые производные ксантина.

Key words: antioxidative activity, water-soluble derivatives of xanthine.

Дослідження показали, що антиоксидантний ефект водорозчинних солей (3-бензилксантиніл-8)метилтіооцтової кислоти реалізується за допомогою протективної дії відносно супероксиддисмутази.

Исследования показали, что антиоксидантный эффект водорастворимых солей (3-бензилксантинил-8)метилтиоацетатной кислоты реализуется за счет протективного действия относительно супероксиддисмутазы.

Conducted researches show, that antioxidative effect of water-soluble salts of (3-benzylxanthinyl-8)methylthioacetic acid is realized by protective action relatively to superoxide dismutase.

Згідно з даними сучасної біомедицини та фармакології, процеси вільнорадикального окислення біомолекул, що призводять до ушкодження мембранних структур і ядерного хроматинового апарату клітин, відіграють значну роль у патогенезі багатьох хвороб і патологічних станів, що визначають структуру смертності та інвалідизації населення, зокрема серцево-судинних (атеросклероз, артеріальна гіпертензія, ішемічні ураження мозку) [1].

Лікарські засоби, що за механізмом основної фармакологічної дії є антиоксидантами, тобто інгібіторами процесів вільнорадикального окислення біомолекул, нині посіли важливе місце в експериментальній і клінічній медицині. Разом з тим, слід визнати, що для клінічного застосування до сьогодні запропоновано вкрай недостатню кількість лікарських засобів з антиоксидантним механізмом дії. Крім того, добре відомо, що класичні антиоксиданти фенольного типу, зокрема природна сполука токоферол (вітамін Е) і синтетичний іюнол (дибунол) мають цілий ряд негативних властивостей – це жиророзчинні речовини, що обмежує шляхи їх терапевтичного використання та створення певних фармацевтичних форм, до того ж, вони характеризуються відстроченим розвитком основного фармакологічного ефекту та є достатньо токсичними для вищих організмів (дибунол), особливо за умови тривалого застосування [2].

Фармакологічне застосування також знайшли речовини антиоксидантної дії, що за хімічною природою є похідними N- та S-вмісних природних і синтетичних гетероциклів. У цьому плані особливої уваги заслуговують похідні пурину і ксантину – конденсованих гетероциклів, які лежать в основі багатьох природних сполук (алкалоїди, нуклеотиди, антибіотики), що відіграють важливу роль у різних регуляторних та обмінних процесах [3].

Тому пошук нових біологічно активних речовин антиоксидантної дії серед водорозчинних солей (3-бензилксантиніл-8)метилтіоацетатної кислоти є безсумнівно актуальним і перспективним.

МЕТА РОБОТИ

Виявити ступінь антиоксидантної активності водорозчинних солей (3-бензилксантиніл-8)метилтіоацетатної кислоти.

МАТЕРІАЛИ І МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ

Методи *in vitro* відрізняються високою специфічністю, не вимагають високих витрат на реактиви та прилади, дозволяють виключити з модельної системи сторонні чинники, що можуть впливати на вільнорадикальний процес, а також дають можливість кількісної оцінки антиоксидантної активності (АОА) досліджуваних речовин і, одночасно, скринінгу великої кількості сполук [4].

У дослідженнях використовували такі методи оцінки АОА сполук *in vitro* (у 5-кратній повторності), що відрізняються за механізмом ініціації вільнорадикальних процесів, субстратів окислення та маркерних продуктів, що визначаються:

1. Метод оцінки АОА при неферментативній ініціації вільнорадикального окислення (ВРО) солями заліза (II) [5].

Неферментативну ініціацію моделювали шляхом додавання солей двовалентного заліза до суспензії яєчних ліпопротеїдів.

Принцип методу. Для кількісної оцінки МДА, що накопичується в умовах ініціації ВРО *in vitro*, застосовували взаємодію цієї сполуки з 2-тіобарбітуровою кислотою (ТБК) й утворення забарвленого триметинового комплексу з максимумом поглинання при 532 нм.

2. Метод оцінки гальмування аутоокислення адреналіну в адренохром [5].

Принцип методу. Неферментативна реакція окислення адреналіну в адренохром у лужному середовищі супроводжується накопиченням супероксидрадикалу. У біологічних системах швидкість процесу залежить від активності ферменту супероксиддисмутази, але в хімічній системі *in vitro* ця реакція може бути застосовна для кількісної оцінки АОА досліджуваних сполук.

3. Метод оцінки АОА сполук за інгібуванням NO•-радикала [6].

Принцип методу. Фотоіндукція натрій нітропрусиду супроводжується накопиченням NO•-радикала, про що судять за швидкістю окислення аскорбату, вимірюючи оптичну густину проби при 265 нм.

4. Метод оцінки АОА за інгібуванням окислювальної модифікації білка (ОМБ), що викликана реактивом Фентона [6].

Принцип методу. Метод заснований на кількісному визначенні окислених амінокислотних залишків білків за реакцією з 2,4-динітрофенілгідразином (2,4-ДНФГ), що утворюються при ініціації ВРО реактивом Фентона *in vitro*.

5. Метод оцінки АОА за гальмуванням «нітрозуючого» стресу, що викликаний надлишком феррум (II) динітрозольного комплексу з цистеїном (DNIC) [7].

Принцип методу. Для моделювання «нітрозуючого» стресу використовують надлишок феррум (II) динітрозольного комплексу з цистеїном (DNIC) – стабільний комплекс NO*, який можна розглядати як транспортну форму цього радикала та таку, що забезпечує тривалішу дію NO на різні групи білків.

РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

Для досліджень отримано аммоній, 2-гідроксиетиламмоній і морфоліній (3-бензилксантиніл-8)метилтіоацетати (рис. 1).

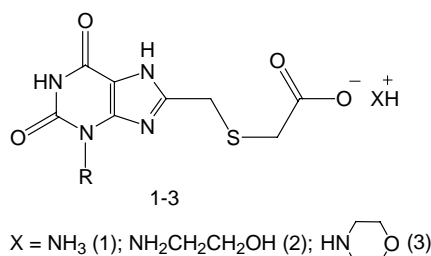


Рис. 1. Структура солей (3-бензилксантиніл-8)метилтіоацетатної кислоти.

Гіперпродукція активних форм кисню (АФК), особливо, супероксидрадикала, біоенергетичними та нейрохімічними системами нейрону в умовах ішемії призводить до експресії проапоптичних білків, прозапальних цитокінів, активації індубельної NO-синтази. Супероксидрадикал є основним компонентом реакції утворення найбільш агресивних цитотоксинів – гідроксильного радикала та пероксинітриду. Дослідження АОА за інгібуванням супероксидрадикала в системі аутоокислення адреналіну в адренохром показало, що сполуки 1–3 виявляють досліджувану активність і за силою антиоксидантного ефекту перевершують активність тіотріазоліну та емоксипіну (табл. 1, 2).

При нейродеструкційних захворюваннях NO* бере участь у механізмах загибелі нейронів, ініціюючи «нітрозуючий стрес», внаслідок якого відбувається нітрозування іонів металів і тільних груп у білкових молекулах, виникає фрагментація нуклеїнових кислот і пригнічуються функції мітохондріальних ферментів. Сучасна нейропротекція припускає зменшення ушкоджуючої дії нітрозуючого стресу включенням у комплексну терапію гострих порушень мозкового кровообігу (ГПМК) не тільки інгібіторів синтази-нітроген монооксиду, але й «пасток» NO*, його цитотоксичних форм. Дослідження АОА з інгібування Нітроген монооксиду в системі фотоіндукованого аутоокислення натрій нітроприсуїду показало, що сполуки 1–3 виявляють досліджувану активність і за силою дії перевершують еталонні антиоксиданти – тіотріазолін і N-АЦЦ (табл. 3).

Окислювальна модифікація білкових структур мембрани нейрону в умовах ішемії призводить до порушення генерації

Таблиця 1
Антиоксидантна активність досліджуваних сполук (10⁻⁶ М) *in vitro* (n=5) при неферментативній ініціації ВРО (M±m)

Шифр сполуки	МДА, ммоль/г суспензії	АОА, %
1	0,039 ± 0,002**	81,4
2	0,032 ± 0,001**	84,7
3	0,04 ± 0,037*	82,3
Інтакт	0,03 ± 0,001	-
Контроль	0,254 ± 0,001 ^Δ	-
Тіотріазолін	0,069 ± 0,002*	67,1
Емоксипін	0,091 ± 0,002*	56,6

Примітки: ^Δ – p≤0,05 відносно інтакту; * – p≤0,05 відносно контролю; # – p≤0,05 відносно тіотріазоліну; + – p≤0,05 відносно емоксипіну.

Таблиця 2
Антиоксидантна активність досліджуваних сполук (10⁻⁶ М) *in vitro* (n=5) за інгібуванням супероксидрадикала (M±m)

Шифр сполуки	Оптична щільність	АРА, %
1	0,06 ± 0,001**	70
2	0,06 ± 0,001**	70
3	0,068 ± 0,002**	66
Інтакт	0,066 ± 0,0008	-
Контроль	0,2 ± 0,001 ^Δ	-
Тіотріазолін	0,072 ± 0,001*	35,8
Емоксипін	0,163 ± 0,006*	18,5

Примітки: ^Δ – p≤0,05 відносно інтакту; * – p≤0,05 відносно контролю; # – p≤0,05 відносно тіотріазоліну; + – p≤0,05 відносно емоксипіну.

і провідності нервового імпульсу, десенситатії рецепторів, утворенню пор, і, як наслідок, ініціації апоптозу та формуванню когнітивного дефіциту. Одним із ключових механізмів дії багатьох відомих антиоксидантів-нейропротекторів є їх здатність гальмувати процеси окислювальної модифікації білків і накопичення маркерних карбонільних і карбоксильних продуктів – альдегідфенілгідразонів (АФГ) і кетофенілгідразонів (КФГ).

У зв'язку з цим, перспективним напрямком є пошук сполук, що гальмують процеси окислювальної модифікації білка. Дослідження АОА з гальмування ОМБ, викликаної реактивом Фентона, показали, що всі сполуки виявляють досліджувану активність і за ступенем зниження АФГ і КФГ перевершують активність емоксипіну й тіотріазоліну (табл. 4).

Враховуючи роль нітрозуючого стресу в пригніченні активності супероксиддисмутази (СОД), а також з метою уточнення механізму дії КО-17, проведено дослідження при моделюванні нітрозуючого стресу *in vitro*. Відтворений нітрозуючий стрес *in vitro* характеризувався пригніченням активності СОД, а також збільшенням утворення продуктів ОМБ, що реагують з 2,4-динітрофенілгідразином у супернатанті мозку щурів. Так, активність СОД знижується на 53,7%, і підвищується вміст продуктів ОМБ – АФГ на 87,4%, КФГ на 64,1%. Отримані результати не суперечать даним інших дослідників [8], які показали, що в умовах розвитку нітрозуючого стресу посилюється нітрування тільних груп білкових молекул, низькомолекулярних антиоксидантів, утворення білкових карбонілів по кінцевих NH₂-групах.



Таблиця 3

Антиоксидантна активність досліджуваних сполук (10^{-6} М) *in vitro* (n=5) за інгібуванням Нітроген монооксиду NO^{\bullet} $\pm m$

Шифр сполуки	Оптична щільність при 265 нм	АРА, %
1	$0,202 \pm 0,003^{**\#}$	65,7
2	$0,202 \pm 0,003^{**\#}$	65,7
3	$0,202 \pm 0,003^{**\#}$	65,7
Контроль	$0,59 \pm 0,03$	-
N-АЦЦ	$0,48 \pm 0,002^*$	18,6
Тіотриазолін	$0,392 \pm 0,006^{**}$	33,5

Примітки: * – $p \leq 0,05$ відносно контролю; # – $p \leq 0,05$ відносно тіотриазоліну; + – $p \leq 0,05$ відносно N-АЦЦ.

Таблиця 4

Антиоксидантна активність досліджуваних сполук (10^{-6} М) *in vitro* (n=5) за інгібуванням ОМБ ($M \pm m$)

Шифр	АФГ, у.о./г	Аоа, %	КФГ, у.е./г	Аоа, %
1	$5,30 \pm 0,02^{**}$	46,9	$3,73 \pm 0,02^{**}$	45,7
2	$5,8 \pm 0,03^{**}$	42,0	$3,34 \pm 0,02^{**\#}$	52,0
3	$5,61 \pm 0,01^{**}$	43,7	$3,52 \pm 0,02^{**}$	48,8
Інтакт	$1,07 \pm 0,002$	-	$1,37 \pm 0,02$	-
Контроль	$9,95 \pm 0,07$	-	$6,87 \pm 0,002$	-
Емоксипін	$7,0 \pm 0,002^*$	30	$4,87 \pm 0,01^*$	30,0
Тіотриазолін	$6,00 \pm 0,01^*$	40	$3,75 \pm 0,01^*$	45,5

Примітки: Δ – $p \leq 0,05$ відносно інтакту; * – $p \leq 0,05$ відносно контролю; # – $p \leq 0,05$ відносно тіотриазоліну; + – $p \leq 0,05$ відносно до емоксипіну.

Іншим об'єктом деструктивної дії нітрозуючого стресу є антиоксидантні ферменти, активність яких пригнічується в результаті утворення нітрозольних комплексів з металами, що входять до складу активних центрів ферментів. Внесення до інкубаційної суміші (перед моделюванням нітрозуючого стресу) досліджуваних сполук у концентрації 10^{-6} М призводить до обмеження ушкоджуючої дії агресивних форм Нітроген монооксиду відносно активності СОД.

Так, сполуки 1–3 знижували утворення 2,4-динітрофенілгідразонів – АФГ і КФГ. Внесення в інкубаційне середовище селективної «пастки» пероксинітриту – N-ацетилцистеїну (N-АЦЦ) в концентрації 10^{-6} М знижувало дані показники на 13,7% і 17,7% відповідно. Найбільш важливим моментом у дії сполук цієї серії є протекторна активність відносно СОД (табл. 5).

Отже, можна стверджувати, що антиоксидантний ефект сполук 1–3 реалізується за допомогою протективної дії відносно СОД і забезпечення її високої активності в умовах нітрозуючого стресу *in vitro*.

ВИСНОВКИ

1. У результаті дослідження вперше показано цілий ряд модулюючих ефектів водорозчинних солей (3-бензилксантиніл-8)метилтіооцтової кислоти, а також

Відомості про авторів:

Александрова К.В., д. хім. н., професор, зав. каф. біологічної хімії та лабораторної діагностики ЗДМУ.
Беленічев І.Ф., д. біол. н., професор, зав. каф. фармакології та медичної рецептури ЗДМУ.
Бухтіярова Н.В., к. мед. н., доцент каф. фармакології та медичної рецептури ЗДМУ.
Шкода О.С., к. фарм. н., ст. викладач каф. органічної та біоорганічної хімії ЗДМУ.
Левіч С.В., провізор-інтерн, лаборант каф. біологічної хімії та лабораторної діагностики ЗДМУ.

Адреса для листування:

Александрова Катерина В'ячеславівна. 69035, м. Запоріжжя, пр-т Маяковського, 26, ЗДМУ.
Тел.: (0612) 34 24 42. E-mail: shkodalex@gmail.com

Таблиця 5

Вплив досліджуваних сполук на активність СОД і вміст продуктів ОМБ у супернатанті мозку щурів при моделюванні нітрозуючого стресу *in vitro* ($M \pm m$)

Досліджувані проби	СОД у.о./мг білка/хв	Продукти ОМБ, у.о./мгбілка	
		АФГ, 270 нм	КФГ, 363 нм
Інтактна (n = 10)	$260,7 \pm 7,6$	$14,0 \pm 0,11$	$22,3 \pm 0,17$
Контрольна DNIC, 100 мкМ (n = 10)	$120,2 \pm 5,0^{\Delta}$	$26,2 \pm 0,21^{\Delta}$	$36,7 \pm 0,10^{\Delta}$
Досліджувана DNIC + 1, 10^{-6} М (n = 10)	$200,7 \pm 4,3^{**}$	$18,8 \pm 0,10^{**}$	$26,8 \pm 0,08^{**}$
Досліджувана DNIC + 2, 10^{-6} М (n = 10)	$214,1 \pm 5,0^{**}$	$18,0 \pm 0,11^{**}$	$26,1 \pm 0,09^{**}$
Досліджувана DNIC + 3, 10^{-6} М (n = 10)	$209,1 \pm 4,7^{**}$	$18,7 \pm 0,10^{**}$	$27,1 \pm 0,11^{**}$
Еталонна DNIC + N-АЦЦ, 10^{-6} М (n = 10)	$147,8 \pm 3,7^*$	$22,6 \pm 0,12^*$	$30,2 \pm 0,12^*$

Примітки: Δ – $p \leq 0,05$ відносно інтакту; * – $p \leq 0,05$ відносно контролю; # – $p \leq 0,05$ відносно N-АЦЦ.

встановлено, що їх антиоксидантний ефект реалізується за допомогою протективної дії відносно СОД і забезпечення її високої активності в умовах нітрозуючого стресу *in vitro*.

2. Отримані дані є патогенетичним обґрунтуванням для глибшого вивчення синтезованих солей у якості потенційних нейропротекторів.

ЛІТЕРАТУРА

1. Беленічев І.Ф. Рациональная нейропротекция / Беленічев І.Ф., Черний В.И., Колесник Ю.М. – Донецьк, 2009. – 268 с.
2. Машковский М.Д. Лекарственные средства / Машковский М.Д. – М.: Новая волна, 2005. – 1200 с.
3. Luo Y. Preparation, Properties, Reactions, and Adenine Receptor Affinities of Sulfophenylxanthine Nitrophenyl Esters: Toward the Development of Sulfonic Acids Prodrugs with Peroral Bioavailability / Luo Y., Müller C.E. // J. Med. Chem. – 2004. – Vol. 47 (10). – P. 1031–1043.
4. Oliver C.N., Starke-Reed P.E. Oxidative damage to brain proteins, loss of glutamine synthetase activity and production of free radicals during ischemia/reperfusion induced injury to gerbil brain / Proc. Nat. Acad. Sci.
5. Губський Ю.І. Методи оцінки антиоксидантних властивостей фізіологічно активних сполук при ініціюванні вільнорадикальних процесів у дослідях *in vitro*: Метод. реком. / Губський Ю.І., Дунаєв В.В., Беленічев І.Ф. та ін. – Київ: ДФЦ МОЗ України, 2002. – 26 с.
6. Ванін А.Ф. Динитрозольні комплекси заліза і S-нітротіоли – две можливі форми стабілізації і транспорту оксиду азота в біосистемах / Ванін А.Ф. // Біохімія. – 1998. – Т. 63, Вып. 7. – С. 924–938.
7. Halliwell B. Molecular Biology of Free Radicals in Human Diseases / Halliwell B., Aurore O. // St. Lucia London: OICA Int, 1999. – 352 p.
8. Реутов В.П. Біохімічне предопределение NO-синтазної і нітритредуктазної компонент циклу оксиду азота / Реутов В.П. // Біохімія. – 1999. – Т. 64, Вып. 5. – С. 634–651.