

РАЗНЫЕ АСПЕКТЫ

ОСОБЕННОСТИ АНТИРАДИКАЛЬНЫХ СВОЙСТВ НЕКОТОРЫХ СЕРОСОДЕРЖАЩИХ ВЕЩЕСТВ

М. А. Юдин, Т. В. Ардабьева, С. В. Чепур, В. Н. Быков, А. С. Никифоров¹

В опытах *in vitro* изучены антиоксидантные свойства серосодержащих веществ. Широким спектром действия в отношении различных радикалов обладает унитиол, что, наравне с аскорбиновой кислотой, позволяет рассматривать его как универсальный препарат для коррекции избытка свободнорадикальных реакций.

Ключевые слова: свободнорадикальные реакции, антиоксиданты

ВВЕДЕНИЕ

Свободнорадикальные реакции (СРО) в тканях сопровождают множество метаболических процессов, в первую очередь каскад превращений в дыхательной цепи митохондрий, окислительные реакции в печени, детоксикацию лекарственных веществ и ксенобиотиков, образование комплексов с металлами переменной валентности [6]. Чрезмерная активация этих реакций является неотъемлемой частью любого патологического процесса, лежащего в основе целого ряда заболеваний [1].

Реализация оксидативного стресса происходит при дисбалансе образования и нейтрализации прооксидантов, в том числе в результате дисфункции эндогенной системы антиоксидантной защиты [7]. Это обстоятельство указывает на необходимость использования экзогенных антиоксидантов [8]. Актуальность исследования и выбора антиоксидантов определяется также высокой реакционной способностью активных форм кислорода (АФК). В этом случае повреждение цитолеммы может оказаться фатальным для клетки [13].

С учетом данных литературы об истощении эндогенных антиоксидантов, в том числе, содержащих SH-группы, и выраженном эффекте унитиола и тиосульфата натрия при различных токсических состояниях [3, 10, 11], целью настоящего исследования явилось сравнение антиоксидантных свойств серосодержащих препаратов *in vitro*.

МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Антиоксидантные свойства изучали на примере 5 серосодержащих веществ (тиоктовая кислота, унитиол, тиосульфат, дитионит и метабисульфит натрия). В качестве препарата сравнения использовали аскорбиновую кислоту.

Общую антиокислительную активность (ОАА) веществ оценивали по степени связывания стабильного

радикала — 2,2-дифенил-1-пикрил-гидразила (ДФПГ) на спектрофотометре Hitachi 2900-U при $\lambda = 517$ нм [4]. Железо-восстанавливающую активность (FRAP) веществ определяли при $\lambda = 700$ нм по степени восстановления гексаферрицианида калия, при реакции которого с FeCl_3 образуется окрашенное соединение $\text{Fe}_4[\text{Fe}(\text{CN})_6]_3$ [6]. Способность соединений нейтрализовать H_2O_2 оценивали по количеству образовавшегося свободного йода или трийодида при взаимодействии KI с ионом пероксимолбдата методом прямого титрования [14]. Окислительно-восстановительную активность веществ оценивали по степени восстановления аммония молибдата (VI) до (V) в кислой среде при $\lambda = 695$ нм [5]. Определение антирадикальной активности в системе, генерирующей супероксидный радикал (O_2^-), осуществляли с использованием реакции аутоокисления кверцетина при pH 10 в присутствии $\text{N,N,N}_1, \text{N}_1$ -тетраметилэтилендиамина [12] в нашей модификации при $\lambda = 406$ нм.

Расчет среднеэффективной дозы веществ (ED_{50}) производили графическим методом по показателю оптической плотности и степени ингибирования. Статистическую обработку результатов проводили с использованием t-критерия Стьюдента и теста Манна-Уитни.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

В экспериментах со стабильным радикалом ДФПГ все исследуемые препараты, за исключением липоевой кислоты, начинали проявлять антиоксидантные свойства в микродозах (от 1 до 2 мкМ/л), однако наибольшей АОА обладал унитиол (рис. 1). ED_{50} препарата составила 22,09 мкМ/л.

Аскорбиновая кислота и тиосульфат натрия оказывали сопоставимое действие, ED_{50} по угнетению активности ДФПГ составили 46,48 и 38,22 мкМ/л, соответственно. Действие дитионита и метабисульфита натрия определялось слабым антиокислительным эффектом, тогда как тиоктовая кислота, даже в концентрации 10^{-2} М, почти не влияла на деградацию стабильного радикала.

¹ Научно-исследовательский испытательный центр (медико-биологической защиты) ФГУ "ГосНИИИВМ Минобороны России", 195043, Санкт-Петербург, ул. Лесопарковая, 4.

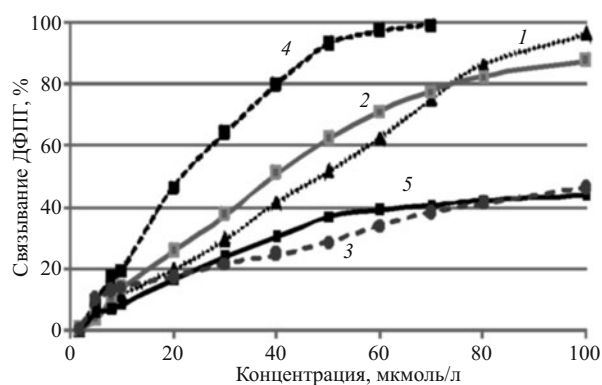


Рис. 1. Антиоксидантные свойства серосодержащих соединений по отношению к стабильному радикалу ДФП.

1 — аскорбиновая кислота; 2 — тиосульфат натрия; 3 — дитионит натрия; 4 — унитиол; 5 — метабисульфит натрия

Использование аскорбиновой кислоты сопровождалось наиболее выраженным восстановлением Fe^{3+} в Fe^{2+} ($ED_{50} = 0,281$ мМ/л, рис. 2).

Дитионит натрия и унитиол оказывали менее значимое действие. Слабые железо-восстановительные свойства отмечали у тиоктовой кислоты и метабисульфита натрия, при этом их ED_{50} составили 3,122 и 3,311 мМ/л соответственно. Трансформационная активность Na_2SO_3 была самой низкой, что, очевидно, обуславливает слабый потенциал антирадикальной активности вещества.

Учитывая важную роль H_2O_2 при повреждении биологических мембран и возможности ее превращения в гидроксил-радикал в результате реакции Фентона, оценивали способность серосодержащих соединений ингибировать окисление аммония молибдата, вызванного пиридоксалем (рис. 3). Интерес изучения H_2O_2 -связывающей способности соединений определяется также высоким некрогенным потенциалом избытка перекиси, образовавшейся в результате ксантин-оксидазной реакции [13].

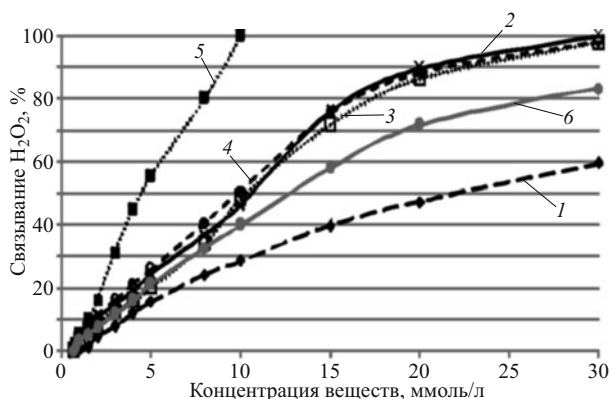


Рис. 3. H_2O_2 -связывающая способность серосодержащих соединений.

1 — Аскорбиновая кислота, 2 — метабисульфит натрия, 3 — унитиол, 4 — дитионит натрия, 5 — тиосульфат натрия, 6 — тиоктовая кислота.

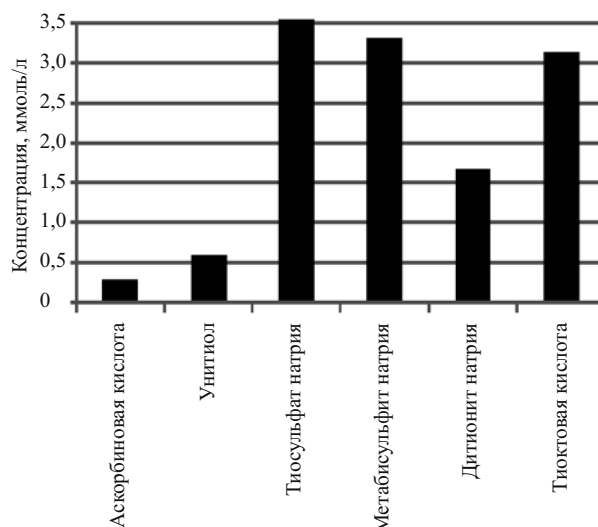


Рис. 2. Железо-восстановительная активность серосодержащих соединений.

По степени связывания H_2O_2 вещества распределялись в следующем порядке: тиосульфат натрия, дитионит натрия, унитиол, метабисульфит натрия, тиоктовая и аскорбиновая кислоты. При этом ED_{50} составили 4,7; 9,8; 10,3; 10,4; 12,4; 21,6 мМ/л соответственно.

Известно, что инактивация H_2O_2 происходит в основном за счет SH-групп [2], однако, наиболее выраженный эффект отмечали у тиосульфата натрия. Эффекты метабисульфита и дитионита натрия были сопоставимы с действием унитиола, тогда как аскорбиновой и тиоктовой кислоты — наименее выражены.

Аскорбиновая кислота, в отличие от других соединений, в концентрации 0,57 мМ/л способствовала восстановлению молибдена (рис. 4).

ED_{50} унитиола, тиоктовой кислоты и тиосульфата натрия составили 2,08; 2,15 и 2,71 мМ/л, соответственно. Не оказывали влияния на восстановление молибдена метабисульфит и дитионит натрия.

При исследовании активности соединений в системе, генерирующей супероксидный радикал, наиболее

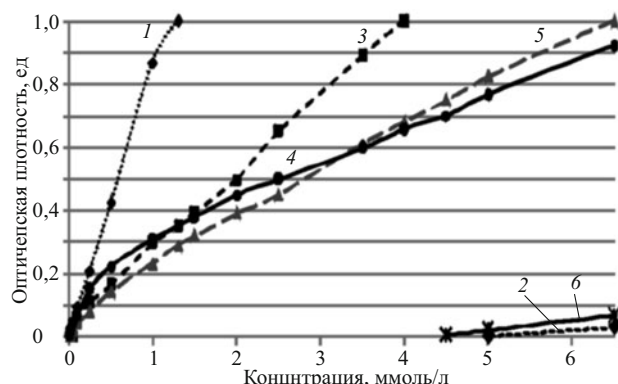


Рис. 4. Степень восстановления аммония молибдата серосодержащими соединениями.

1 — Аскорбиновая кислота, 2 — метабисульфит натрия, 3 — унитиол, 4 — дитионит натрия, 5 — тиосульфат натрия, 6 — тиоктовая кислота.

Зависимость степени ингибирования реакции аутоокисления кверцетина от концентрации соединений ($M \pm m$, %)

Соединение	Концентрация веществ в пробе, М			
	$8,57 \cdot 10^{-6}$	$8,57 \cdot 10^{-5}$	$4,29 \cdot 10^{-4}$	$8,57 \cdot 10^{-4}$
Аскорбиновая кислота	$63,8 \pm 4,43$	$85,1 \pm 0,55$	100	—
Унитиол	$17,3 \pm 2,31$	$47,0 \pm 0,73$	$48,0 \pm 0,76$	$47,2 \pm 0,49$
Тиосульфат натрия	—	$-13,2 \pm 0,77$	$-31,0 \pm 0,90$	$-33,6 \pm 1,14$
Метабисульфит натрия	—	$15,2 \pm 3,17$	$54,9 \pm 2,60$	$73,9 \pm 1,51$
Дитионит натрия	—	$20,2 \pm 3,42$	$60,6 \pm 2,87$	$89,0 \pm 0,70$
Тиоктовая кислота	—	$6,1 \pm 0,52$	$3,7 \pm 0,33$	$-4,4 \pm 0,65$

значимые результаты получены в растворах с аскорбиновой кислотой (таблица). Показано, что в концентрации $8,57 \cdot 10^{-6}$ М аскорбиновая кислота ингибировала образование $O_2^{\bullet-}$ на $63,8 \pm 4,43$ %, тогда как в концентрации $4,29 \cdot 10^{-4}$ М — на 100 %.

Антиоксидантное действие унитиола также проявлялось в концентрации $8,57 \cdot 10^{-6}$ М и возрастало к $8,57 \cdot 10^{-5}$ М (ингибирование — $47,0 \pm 0,73$ %). Отсутствие эффекта полного ингибирования аутоокисления кверцетина унитиолом, по-видимому, отражает его неспецифичность к супероксидному радикалу.

Зависимость степени инактивации $O_2^{\bullet-}$ метабисульфитом и дитионитом натрия была схожей, однако связывающая способность последнего была несколько выше (в среднем на 25 %).

Противоположные данные получены при изучении антиоксидантных свойств тиоктовой кислоты и тиосульфата натрия. Введение в раствор тиосульфата натрия ускоряло процессы радикалообразования, что обуславливало отрицательные показатели по отношению к контролю (раствор без исследуемых соединений). Данное наблюдение, очевидно, связано с проблемой инверсии антиоксидантной активности в прооксидантную в зависимости от концентрации соединения [14].

Недостаточная эффективность тиоктовой кислоты отчасти может быть обусловлена невосстановленной (S-S) формой препарата, которая преобразуется при попадании в организм.

ВЫВОДЫ

1. Наибольшей антиоксидантной активностью из исследованных серосодержащих соединений обладает унитиол.

2. H_2O_2 -связывающая способность серосодержащих соединений существенно превышает значения аскорбиновой кислоты.

3. Тиоктовая кислота обладает наименее выраженным антирадикальным действием *in vitro*, что может быть обусловлено ее невосстановленной формой.

ЛИТЕРАТУРА

1. В. Е. Высокогорский, О. Ю. Жукова, *Наркология*, № 12, 41 – 44 (2007).
2. С. М. Зенович, А. Г. Калинина и др., *Эксп. наркология*, № 4, 30 – 33 (2004).
3. В. А. Костюк, А. И. Потапович, Ж. В. Ковалева, *Вопр. мед. химии*, **36**, 88 – 91 (1990).
4. Л. В. Курашвили, В. Г. Васильков, *Липидный метаболизм при неотложных состояниях*, Пенза (2003).
5. В. З. Ланкин, А. К. Тихазе и др., *Бюл. exper. биол.*, **128**(9), 314 – 316 (1999).
6. I. Gulcin, H. A. Alici, M. Cesur, *Chem. pharm. bull.*, № 3, 281 – 285 (2005).
7. H. Bibhabasu, B. Santanu, M. Nripendranath, *BMC complementary and alternative medicine*, **8**(63), 87 – 94 (2008).
8. M. R. Hayden, S. C. Tyagi, M. M. Kerklo, *JOP. J. pancreas.*, № 6, 287 – 302 (2005).
9. P. Molyneux, *Songklanakar J. sci. technol.*, **26**(2), 211 – 219 (2004).
10. P. Prieto, M. Pineda, M. Aguilar, *Anal. Biochem.*, **269**, 337 – 341 (1999).
11. M. R. Saha, M. A. Alarm, *Bangladesh J. pharmacol.*, № 3, 90 – 96 (2008).
12. M. Tsuchiya, A. Asada, *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* № 163, 26 – 31 (2001).
13. F. Violi, L. Loffredo, L. Musella, *Heart*, **90**(6), 598 – 602 (2004).
14. X. Y. Zhang, *Beijing*, (2000), pp. 275 – 276.

Поступила 13.09.10

ANTIOXIDANT PROPERTIES OF SOME SULFUR-CONTAINING SUBSTANCES

M. A. Yudin, T. V. Ardab'eva, S. V. Chepur, V. N. Bykov, and A. S. Nikiforov

Scientific Research Institute of Military Medicine, Ministry of Defense of Russian Federation, ul. Lesoparkovaya 4, St. Petersburg, 194045, Russia

The antioxidant properties of sulfur-containing substances have been experimentally studied *in vitro*. Unithiol exhibits a wide spectrum of action against various radicals. For this reason, unithiol can be considered, along with ascorbic acid, as a universal drug for the reduction of free radical reactions.

Key words: Free-radical reactions, antioxidants, sulfur-containing substances, unithiol