

РАЗНЫЕ АСПЕКТЫ

АНТИОКСИДАНТНЫЕ И МЕМБРАНОПРОТЕКТОРНЫЕ СВОЙСТВА ТРОЛОКСА

Е. В. Тибирькова, В. А. Косолапов, А. А. Спасов¹

Изучены антиоксидантные и мембранопротекторные свойства тролокса. Установлено, что тролокс обладает антиоксидантными свойствами, ингибируя аскорбат-зависимое перекисное окисление липидов гомогенатов печени и Fe^{2+} -индуцированную хемиллюминесценцию липидов куриного желтка, широким спектром антирадикальной активности, взаимодействуя со стабильным свободным радикалом 2,2-дифенил-1-пикрилгидразила, подавляя образование радикалов люминола и активных форм кислорода, связывая пероксильный радикал, и мембранопротекторными свойствами, уменьшая перекисный гемолиз эритроцитов.

Ключевые слова: тролокс, антиоксидантная активность, антирадикальная активность, хемиллюминесценция, мембранопротекторные свойства, перекисный гемолиз эритроцитов

ВВЕДЕНИЕ

Участие свободнорадикальных процессов в развитии различных патологических состояний ставит вопрос о возможности профилактики и коррекции таких нарушений фармакологическими средствами. В клинике одним из наиболее часто применяемых антиоксидантных средств является α -токоферол. Однако применение жирорастворимого витамина существенно ограничено в практике интенсивной терапии из-за невозможности внутривенного введения [5]. В связи с этим представляет интерес водорастворимый аналог α -токоферола тролокс (6-гидрокси-2,5,7,8-тетраметилхроман-2-карбоновая кислота), который в настоящее время принят за стандарт для оценки антиоксидантной активности веществ [4]. Целью данной работы было детальное изучение антиоксидантных и мембранопротекторных свойств тролокса.

МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

В работе использовали 2-тиобарбитуровую кислоту (ТБК) (“Fluka”, Швейцария), 2,2-дифенил-1-пикрилгидразил (ДФПГ) (“Sigma”, США), люминол (“Serva”, Германия), железосерноокисное (чда, Украина), натрия цитрат (чда, Россия), этилендиаминтетраацетат — ЭДТА (“Sigma”, США), 2,2'-азобис(2-метилпропионамидин)дигидрохлорид — АБАП (“Fluka”, Швейцария), тролокс (“Sigma”, Германия).

Антиоксидантные свойства изучали на модели аскорбат-зависимого перекисного окисления липидов

(ПОЛ) гомогенатов печени [2], а также с помощью хемиллюминесцентной (ХЛ) модельной системы, содержащей липиды куриного желтка [3]. Влияние тролокса на различные формы радикалов исследовали на модели взаимодействия со стабильным свободным радикалом ДФПГ [6] с использованием ХЛ модельной системы аутоокисления люминола [3] и системы с генерацией пероксильного радикала ($ROO\bullet$) в ходе термического разложения АБАП [1]. Мембранопротекторные свойства тролокса изучали на модели перекисного гемолиза эритроцитов [7] в собственной модификации.

Аскорбат-зависимое ПОЛ оценивали по накоплению малонового диальдегида в реакции с ТБК. Оптическую плотность окрашенного продукта измеряли при длине волны 532 нм на спектрофотометре PD-303 UV (APEL, Япония) в кювете с длиной оптического пути 10 мм. Антиоксидантную активность определяли как отношение показателя оптической плотности исследуемого вещества к контролю, выраженное в процентах.

При измерении Fe^{2+} -индуцированной ХЛ липидов реакционная смесь содержала липиды куриного желтка. Желток гомогенизировали в фосфатном буфере pH 7,45 (20 мМ калий фосфорнокислый, 105 мМ калий хлористый) в соотношении 1:1. Содержание белка доводили до 1 мг/мл. ХЛ инициировали 2,5 мМ раствора железа серноокислого при интенсивном перемешивании и температуре 37 °С. Кинетику ХЛ измеряли на хемиллюминетре ХЛ-003 (Уфа, Россия) в течение 10 мин. Оценивали значение площади под кривой свечения S (светосумма).

При изучении антирадикальных свойств использовали спиртовой раствор ДФПГ, интенсивность окраски которого при добавлении тролокса уменьшалась, что измеряли фотометрически при длине волны

¹ Лаборатория фармакологии антиоксидантных средств (зав. — проф. В. А. Косолапов) НИИ фармакологии, кафедра фармакологии (зав. — член-корр. РАМН А. А. Спасов) ГОУ ВПО Волгоградский государственный медицинский университет Росздрава, Волгоград, 400131, пл. Павших борцов, 1.

517 нм в кварцевой кювете с длиной оптического пути 10 мм через 5 мин после начала реакции. Антирадикальную активность тролокса сравнивали с контрольными показателями пирогаллола.

Для измерения ХЛ, сопровождающей аутоокисление люминола, в кювету хемиллюминометра вносили фосфатный буфер pH 7,45 (20 мМ калий фосфорнокислый, 105 мМ калий хлористый), содержащий натрия цитрат (5 мМ) и люминол (1 мкМ). ХЛ инициировали 2,5 мМ раствором железа сернокислого при интенсивном перемешивании. Кинетику ХЛ измеряли в течение 5 мин. Для анализа полученных результатов использовали показатель светосуммы.

Для определения АБАП-индуцированной ХЛ с генерацией $ROO\cdot$ 50 мМ АБАП вносили в пробу, содержащую фосфатный буфер pH 7,4 (50 мМ калий фосфорнокислый, 10 мкМ ЭДТА) и люминол (10 мкМ). Кинетику ХЛ измеряли в течение 30 мин при интенсивном перемешивании и температуре 37 °С. В расчетах использовали показатель светосуммы.

Для изучения мембранопротекторных свойств тролокса кровь забирали из подъязычной вены крысы в пробирки с 3,8 % раствором натрия цитрата в соотношении 1:9. Эритроциты троекратно отмывали трис-натрия хлорид-буфером pH 7,4. Тролокс вводили в эритроцитарную суспензию перед термостатированием. Гемолиз индуцировали 50 мМ АБАП, который при температуре 37 °С претерпевает деградацию с образованием $ROO\cdot$. После инкубирования с получасовыми интервалами времени образцы центрифугировали при

1000 об./мин на центрифуге ОПН-3 (Россия) в течение 10 мин и в супернатанте измеряли поглощение при 540 нм на спектрофотометре PD-303 UV (APEL, Япония) в кювете с длиной оптического пути 10 мм. Уровень гемолиза оценивали в процентах по отношению к абсолютному гемолизу эритроцитов в дистиллированной воде.

Вещество изучали в диапазоне концентраций 0,1 – 100 мкМ. Статистическую обработку результатов проводили с использованием параметрического *t*-критерия Стьюдента в программе Statistica 6,0 (StatSoft, США). ИК₅₀ (концентрация, ингибирующая реакцию на 50 %) рассчитывали методом регрессионных уравнений в программе Microsoft Excel 1998.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Проведенные нами исследования выявили наличие у тролокса выраженных антиоксидантных свойств с широким спектром влияния на образование различных активных кислородных метаболитов, а также значительную мембранопротекторную активность.

Так, на модели аскорбат-зависимого ПОЛ тролокс проявил высокую активность, статистически значимо ингибируя реакцию в концентрациях 100 и 10 мкМ на 87,93 и 61,92 % соответственно. В дозах 1 и 0,1 мкМ тролокс подавлял ПОЛ на 51,39 и 5,24 % соответственно. ИК₅₀ для него составила 2,76 мкМ (парный коэффициент корреляции $R^2 = 0,94$).

При исследовании антиоксидантных свойств тролокса выявлено его статистически значимое ингибирующее действие на Fe^{2+} -индуцированную ХЛ липидов куриного желтка (таблица). Вещество оказывало максимальный эффект в концентрации 100 мкМ, уменьшая светосумму на 97,11 %. При снижении концентрации до 0,1 мкМ тролокс подавлял окисление липидов на 6,44 %. ИК₅₀ для него составила 1,13 мкМ ($R^2 = 0,99$).

При исследовании антирадикальных свойств на модели обесцвечивания ДФПГ тролокс статистически значимо подавлял реакцию через 5 мин после ее начала в концентрациях 100, 10, 1 и 0,1 мкМ на 100; 59,35; 12,8 и 6,62 % соответственно. ИК₅₀ для него составила 4,48 мкМ ($R^2 = 0,93$).

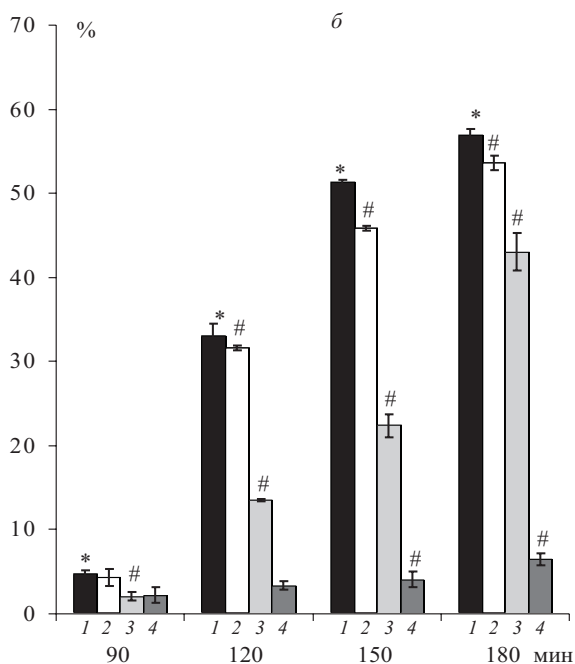
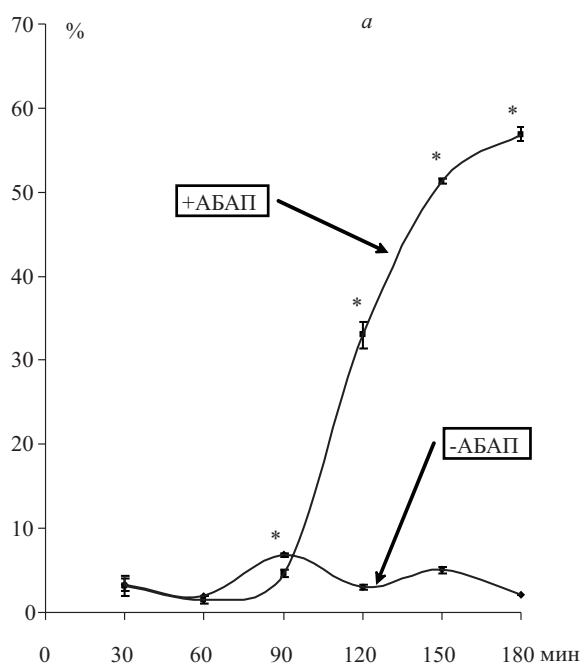
При изучении антирадикальных свойств тролокса на модели аутоокисления люминола обнаружено его статистически значимое ингибирующее действие на образование радикалов люминола и активных форм кислорода, преимущественно супероксида (таблица). Вещество оказывало максимальный эффект в концентрации 100 мкМ, уменьшая светосумму на 90,53 %, тогда как в дозе 0,1 мкМ оно снижало этот показатель на 15,77 %. ИК₅₀ для тролокса составила 1,2 мкМ ($R^2 = 0,94$).

При исследовании антирадикальной активности тролокса на модели АБАП-индуцированной ХЛ с генерацией $ROO\cdot$ наблюдалось статистически значимое дозозависимое снижение показателя светосуммы, свя-

Влияние тролокса на показатель светосуммы в реакциях хемиллюминесценции ($M \pm m$)

Вещество	C, мкМ	S, усл. ед.	% ингибирования
<i>Люминол-зависимая хемиллюминесценция</i>			
Контроль	–	89,03	–
Тролокс	100	8,43	90,53 ± 1,662*
	10	15,55	82,53 ± 1,120*
	1	52,01	41,58 ± 2,177*
	0,1	75	15,77 ± 2,536*
<i>Fe^{2+}-индуцированная хемиллюминесценция липидов</i>			
Контроль	–	387,17	–
Тролокс	100	11,2	97,11 ± 0,274*
	10	21,04	94,60 ± 0,541*
	1	224,5	42,02 ± 2,292*
	0,1	362,25	6,44 ± 0,472*
<i>АБАП-индуцированная хемиллюминесценция</i>			
Контроль	–	628,41	–
Тролокс	100	33,71	94,64 ± 0,321*
	10	51,31	91,84 ± 0,301*
	1	191,74	69,49 ± 1,213*
	0,1	412,78	34,31 ± 1,047*

Примечание. Количество повторов на каждое исследование не менее 3. C — концентрация вещества, S — светосумма; * — данные статистически значимы (*t*) по отношению к контролю, $p \leq 0,05$.



АБАП-индуцированный окислительный гемолиз эритроцитов (а) и влияние тролокса (б). По оси ординат — гемолиз эритроцитов, %; по оси абсцисс — время, мин. * — данные статистически значимы (t) по отношению к контролю без АБАП ($p < 0,05$).

Препарат	30 мин	60 мин	90 мин	120 мин	150 мин	180 мин
-АБАП	3,319	1,885	6,814	2,929	5,013	2,100
+АБАП	3,105	1,436	4,685*	32,989*	51,253*	56,868*

* — данные статистически значимы (t) по отношению к контролю с АБАП ($p < 0,05$).

Препарат	90мин	120мин	150мин	180мин
+АБАП	4,685**	32,989**	51,253**	56,868**
Тролокс, 1	4,344	31,611	45,895*	53,631
Тролокс, 10	2,044*	13,523*	22,385*	43,045*
Тролокс, 100	2,215	3,359*	4,062*	6,474*

1 — АБАП; 2 — тролокс, 1 мкМ; 3 — тролокс, 10 мкМ; 4 — тролокс, 100 мкМ.

занное со способностью взаимодействовать с образующимися при окислении люминола радикалами (таблица). Наиболее выраженный эффект тролокс проявил в концентрации 100 мкМ, уменьшая светосумму на 94,64 %. ИК₅₀ составила для него 0,29 мкМ ($R^2 = 0,99$). Наряду со снижением показателя светосуммы введение в систему тролокса приводило к увеличению длительности латентного периода, что обусловлено связыванием антиоксидантом $ROO\cdot$ и их элиминацией из системы. При внесении тролокса в концентрациях 1 и 0,1 мкМ наблюдалось статистически значимое увеличение длительности латентного периода в 13,5 и 2,5 раз соответственно, а в дозах 100 и 10 мкМ происходило полное подавление свечения.

При изучении мембранопротекторных свойств тролокса на модели перекисного гемолиза эритроцитов в присутствии инициатора наблюдали гемолиз через 120 мин инкубации, а к 3-му часу он составил 56,87 % по сравнению с 2,1 % в контроле с буфером. Тролокс при введении в суспензию эритроцитов в концентрациях 100, 10 и 1 мкМ статистически значимо ингиби-

ровал гемолиз через 120 мин — на 31,61; 13,52 и 3,36 %, через 150 мин — на 45,9; 22,39 и 4,06 %, через 180 мин — на 53,63; 43,05 и 6,47 % от контроля соответственно (рисунок). Полученные данные позволяют считать, что в основе способности тролокса уменьшать гемолиз эритроцитов лежат его антиоксидантные свойства.

ВЫВОДЫ

1. Тролокс обладает выраженными антиоксидантными свойствами, ингибируя аскорбат-зависимое перекисное окисление липидов гомогенатов печени и Fe^{2+} -индуцированную хемилюминесценцию липидов куриного желтка.

2. В основе антиоксидантной активности тролокса лежит его способность взаимодействовать со стабильным свободным радикалом 2,2-дифенил-1-пикрилгидразила, подавлять образование радикалов люминола и активных форм кислорода, связывать пероксильный радикал.

3. Для тролокса характерно наличие мембранопротекторных свойств, проявляющихся в его способности уменьшать перекисный гемолиз эритроцитов.

ЛИТЕРАТУРА

1. Г. И. Клебанов, О. Б. Любичкий, О. В. Васильева и др., *Вопр. мед. химии*, **47**(3), 288 – 300 (2001).
2. В. З. Ланкин, С. М. Гуревич, Е. Б. Бурлакова, *Тр. Московско-го об-ва испытателей природы*, **52**, 73 – 78 (1975).
3. Р. Р. Фархутдинов, В. А. Лиховских, *Хемилюминесцентные методы исследования свободнорадикального окисления в биологии и медицине*, Уфа (1995).
4. В. В. Хасанов, Г. Л. Рыжова, Е. В. Мальцева, *Химия растит. сырья*, № 3, 63 – 75 (2004).
5. Ю. Н. Шанин, В. Ю. Шанин, Е. В. Зиновьев, *Антиоксидантная терапия в клинической практике (теоретическое обоснование и стратегия проведения)*, ЭЛБИ-СПб, Санкт-Петербург (2003).
6. G. Glavind, *Acta Chem. Scand.*, **17**(6), 1635 – 1640 (1963).
7. M. Tsuchiya, A. Asada, E. Kasahara, et al., *Am. J. Respir. Crit. Care Med.*, **165**(1), 54 – 60 (2002).

Поступила 12.05.08

ANTIOXIDANT AND MEMBRANOPROTECTIVE PROPERTIES OF TROLOX

E. V. Tibir'kova, V. A. Kosolapov, and A. A. Spasov

Institute of Pharmacology, Volgograd State Medical Academy, pl. Pavshikh Bortsov 1a, Volgograd, 400131, Russia;
Department of Pharmacology, Volgograd State Medical Academy, pl. Pavshikh Bortsov 1a, Volgograd, 400066, Russia

The antioxidant and membranoprotective properties of trolox have been studied *in vitro*. It is established that trolox possesses antioxidant properties, inhibiting ascorbate-dependent lipid peroxidation of liver homogenates and Fe²⁺-induced lipid chemiluminescence of egg-yolk lipids. In addition, trolox exhibits a broad spectrum of antiradical activity and interacts with stable free 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl radical so as to reduce the generation of luminol radicals and reactive oxygen species and to bind peroxy radicals. Trolox also possessed membranoprotective properties, being capable of reducing the oxidative hemolysis of erythrocytes.

Key words: Trolox, antioxidant activity, antiradical activity, chemiluminescence, membranoprotective properties, peroxide hemolysis of erythrocytes