

О.С.Кругляк, И.Е.Миронюк, Г.С.Шаповал

МЕХАНИЗМ ДЕЙСТВИЯ И ОПРЕДЕЛЕНИЕ ПРЕВЕНТИВНОЙ АНТИОКСИДАНТНОЙ АКТИВНОСТИ СЕРУСОДЕРЖАЩИХ БИОЛОГИЧЕСКИ АКТИВНЫХ ВЕЩЕСТВ

Методом дифференциальной импульсной вольтамперометрии исследована превентивная антиоксидантная активность серусодержащих биологически активных веществ (БАВ). Об эффективности исследуемых БАВ в качестве превентивных антиоксидантов можно судить по разности сродства к электрону двухвалентного железа и БАВ. С помощью измеренных в одинаковых условиях потенциалов восстановления этих соединений установлены относительные величины их эффективности. По величине сдвига потенциала восстановления двухвалентного железа в присутствии БАВ одинаковой концентрации сделано заключение об относительной прочности образующихся комплексов с каждым из исследуемых БАВ. Показана перспективность использования электрохимического подхода для изучения механизма действия и определения превентивной антиоксидантной активности БАВ.

ВВЕДЕНИЕ. Интерес ученых к окислительно-восстановительным реакциям органических соединений в настоящее время вызван особенностями их протекания в биологических системах под влиянием активных форм кислорода (АФК), которые инициализируют перекисное окисление липидов (ПОЛ) и перекисную модификацию макромолекул белка. Этим обусловлены многочисленные исследования антиоксидантной активности биологически активных веществ (БАВ) [1–3], связанные с возможностью использования их результатов для поддержания антиоксидантной системы организма, нормализации обмена веществ, оздоровления и торможения процессов старения [4, 5].

По принципу действия антиоксиданты могут быть цепь обрывающими — снижающими уровень АФК путем обрыва цепных реакций окисления органических веществ, а также превентивными — реагирующими с ионами металлов переменной валентности, ингибируя их участие в реакциях Фентона, приводящих к образованию АФК.

В системе антиоксидантной защиты организма важная роль отводится серусодержащим соединениям. Они в первую очередь подвергаются окислению АФК, предохраняя таким образом функциональные группы биологических молекул и клеточных мембран.

Исследование антиоксидантной активности *in vivo* сопряжено с влиянием большого числа разнообразных взаимосвязанных процессов, стабилизация которых в условиях экспериментов на

животных и даже на бактериях является весьма проблематичной [6]. Очевидно, поэтому наблюдается непрерывное расширение круга исследований *in vitro* с использованием различных физико-химических методов [7–9]. Причем объектами этих исследований являются как синтетические, так и природные антиоксиданты, участвующие в системе защиты организма от так называемого “кислородного стресса” [10, 11].

С нашей точки зрения, достаточно корректно судить об антиоксидантной активности БАВ на молекулярном уровне можно на основании изучения реакций окисления этих соединений активными формами кислорода, при электрохимическом генерировании последних *in vitro* в условиях, моделирующих “кислородный стресс” организма. Возможность такого моделирования была установлена и успешно использована нами для определения эффективности ряда антиоксидантов [12, 13].

В результате применения указанного метода удалось определить и сопоставить в одинаковых условиях эффективность в качестве цепь обрывающих антиоксидантов ряда БАВ, блокирующих действие АФК, таких как серусодержащие аминокислоты — цистеин, ацетилцистеин, метионин, а также глутатион и липоевая кислота. Однако вопрос о механизме действия на молекулярном уровне и о сравнительной оценке их превентивной антиоксидантной активности требует определенной доработки и несколько иного подхода.

С учетом изложенного, цель настоящей ра-

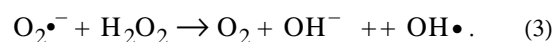
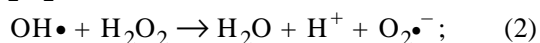
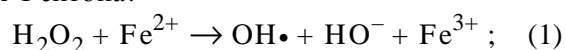
боты — электрохимическое исследование механизма и определение относительной величины превентивной антиоксидантной активности ряда названных выше БАВ, играющих существенную роль в обменных процессах организма.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ. Исследования проведены методом дифференциальной импульсной вольтамперометрии с помощью сопряженного с компьютером полярографа ПУ-1 в трехэлектродной ячейке. В специальном импульсном режиме снимали вольт-амперные кривые восстановления двухвалентного железа на платиновом электроде. Потенциал платинового рабочего электрода задавали относительно хлорсеребряного электрода сравнения, вспомогательным электродом служила платиновая спираль. О превентивной антиоксидантной активности судили по изменениям волны двухвалентного железа, наблюдаемым под влиянием исследуемых БАВ.

Для приготовления растворов применяли следующие БАВ: L-цистеин, N-ацетил-L-цистеин, метионин фирмы Merck, L-глутатион фирмы Serva, α -липовую кислоту фирмы Sigma-Aldrich; для приготовления раствора двухвалентного железа — соль $\text{FeCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ фирмы Sigma-Aldrich.

Соединения использовались без дополнительной очистки. Растворы БАВ и $\text{FeCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ в 0.1 М водном растворе NaCl готовили непосредственно перед измерениями. Фоновый электролит — 0.1 М раствор NaCl получали из дважды перекристаллизованного NaCl квалификации х.ч. в бидистиллированной воде. Концентрация кислорода в исследуемом растворе соответствовала равновесной при атмосферном давлении и температуре 20 °С. Кислород удаляли предварительно осушенным аргоном высшей очистки.

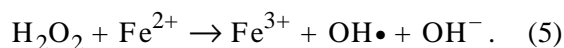
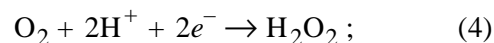
ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ. Значительную роль в окислительно-восстановительных процессах в биосистемах играют ионы металлов переменной валентности, в частности железа и меди. Существует связь между увеличением уровня железа и интенсивностью ПОЛ, вызванного гидроксильными радикалами и другими АФК [14], образующимися в одноэлектронных реакциях Фентона:



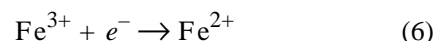
В биосистемах наиболее стабильной из АФК является перекись водорода, окислительный потенциал которой, как и супероксид-аниона, характеризуется сравнительно низким значением [14]. Считают, что эти АФК опасны для организма, вероятно, потому, что в результате реакций (1), (3) образуется наиболее реакционноспособный гидроксильный радикал, способный взаимодействовать с молекулами ненасыщенных жирных кислот и других органических соединений.

Очевидно, поэтому в качестве модели для определения эффективности антиоксидантов используют гидроксильные радикалы, полученные с помощью реакции Фентона [15].

В конце прошлого века появились исследования, в которых гидроксильные радикалы генерировали путем электрохимического восстановления кислорода до перекиси водорода в присутствии ионов двухвалентного железа, которое затем взаимодействует с перекисью:



При этом происходит электрохимическая регенерация двухвалентного железа



и непрерывное восстановление растворенного в среде Фентона кислорода, то есть генерирование перекиси водорода. Этот процесс получил название Электро-Фентон [16].

Следует подчеркнуть, что важным свойством серосодержащих соединений является их способность образовывать комплексные соединения с ионами металлов Fe^{2+} , Cu^{2+} , что может препятствовать окислению этих ионов по механизму реакции Фентона.

По нашему мнению, существенную роль в механизме действия исследуемых соединений как превентивных антиоксидантов, кроме всего прочего, должна играть их способность к восстановлению при взаимодействии с ионом двухвалентного железа. Исходя из этого, мы прежде всего сопоставили потенциалы пиков восстановления двухвалентного железа и исследованных соединений в водном, тщательно продутом аргоном, растворе NaCl.

Потенциалы пика восстановления БАВ (E), разность потенциалов восстановления двухвалентного железа и БАВ (E_p), сдвиг потенциала пика восстановления двухвалентного железа (ΔE) и изменение его высоты в присутствии БАВ (ΔH , $C_{\text{БАВ}} = 0.38 \cdot 10^{-3}$ М/л)

БАВ	$-E$	E_p	ΔE	ΔH , мм
	мВ			
Цистеин	430	100	-30	0.18
Ацетилцистеин	440	90	-70	0.17
Глутатион	470	60	-30	0.16
Метионин	520	10	+20	0.08
α -Липоевая кислота	500	30	-140	0.14

Потенциал пика восстановления двухвалентного железа равен -530 мВ. Потенциалы пиков восстановления, характеризующие сродство к электрону, всех исследуемых БАВ (таблица) ниже потенциала пика восстановления двухвалентного железа, что является основанием для протекания энергетически выгодной реакции переноса электрона от иона железа к БАВ. Как видно из таблицы, разность потенциалов пика восстановления двухвалентного железа и БАВ при их определенной концентрации колеблется в пределах $100\text{--}20$ мВ. С нашей точки зрения, именно эта величина разности потенциалов, измеренных в одинаковых условиях, может характеризовать относительную эффективность исследуемых соединений в качестве превентивных антиоксидантов.

Исследование влияния БАВ на ионы двухвалентного железа при электрохимическом восстановлении последнего позволило установить следующее. Как видно из рис. 1, *a*, под влиянием цистеина пик волны железа сдвигается в катодную область потенциалов, а его высота снижается симбатно концентрации этой аминокислоты. Кроме того, уменьшение предельного тока волны двухвалентного железа сопровождается появлением и ростом с увеличением концентрации добавленной аминокислоты волны трехвалентного железа, не активного в реакции образования гидроксильных радикалов.

Наблюдаемые изменения волны восстановления двухвалентного железа под влиянием цистеина связаны со следующими процессами. Снижение высоты пика происходит за счет окисле-

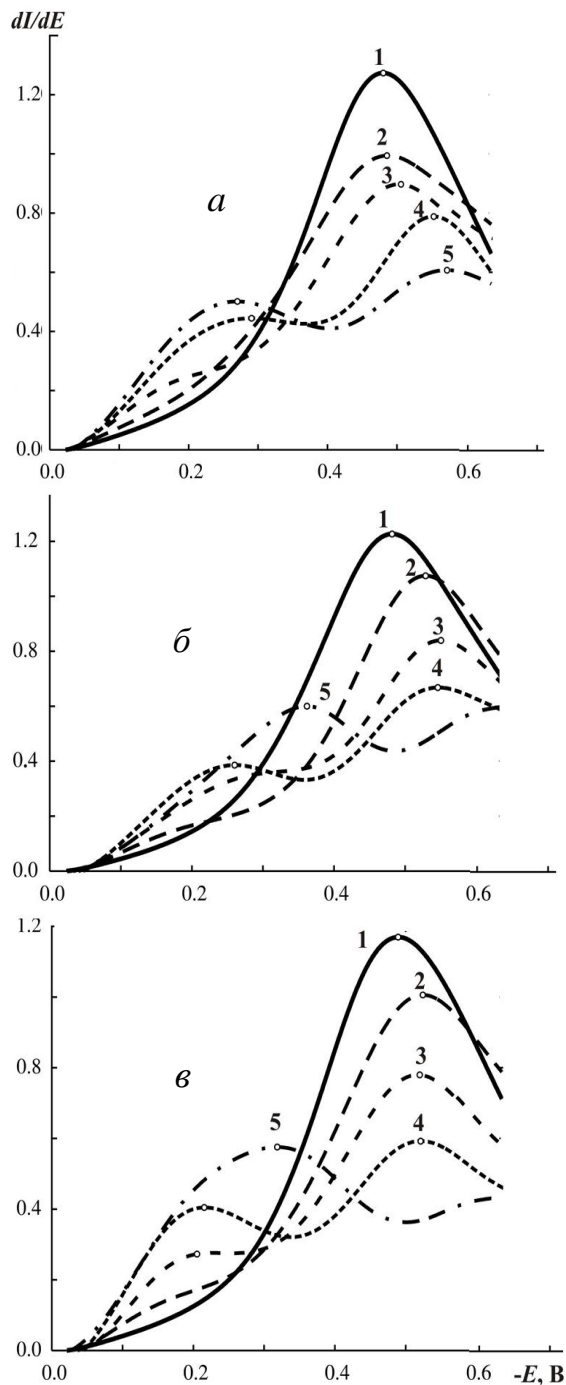
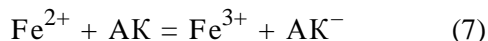


Рис. 1. Дифференциальные вольтамперограммы восстановления Fe^{2+} , $C = 2.42 \cdot 10^{-3}$ М/л (I) на платиновом катоде на фоне 0.1 М раствора NaCl в воде при различных концентрациях цистеина (*a*): 2 – 0.19 ; 3 – 0.38 ; 4 – 0.57 ; 5 – $0.74 \cdot 10^{-3}$ М/л; ацетилцистеина (*б*): 2 – 0.19 ; 3 – 0.38 ; 4 – 0.47 ; 5 – $0.57 \cdot 10^{-3}$ М/л и глутатиона (*в*): 2 – 0.19 ; 3 – 0.38 ; 4 – 0.57 ; 5 – $0.74 \cdot 10^{-3}$ М/л.

ния иона двухвалентного железа при его взаимодействии с аминокислотой

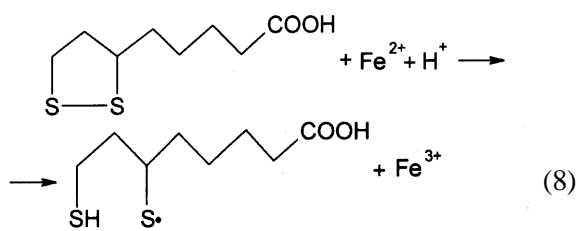


и удаления его из сферы электрохимической реакции. Появление при этом волны трехвалентного железа подтверждает перенос электрона от двухвалентного железа на аминокислоту и снижение его концентрации в приэлектродном пространстве. Сдвиг потенциала восстановления двухвалентного железа с увеличением концентрации аминокислоты, очевидно, связан с образованием комплекса железа с аминокислотой, что согласуется с информацией о биохимических свойствах цистеина [17].

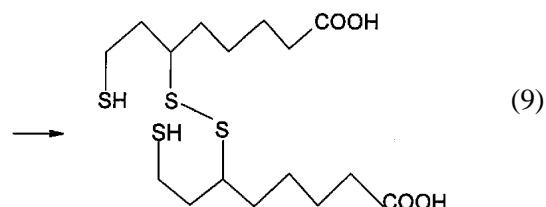
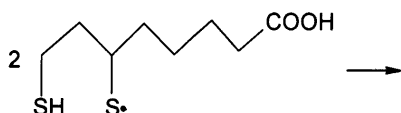
Таким образом, механизм действия цистеина как превентивного антиоксиданта включает не только его известную [18] способность к комплексообразованию, но и к восстановлению.

Аналогичные изменения высоты и потенциала пика восстановления двухвалентного железа, сопровождающиеся появлением волны трехвалентного, происходят и под влиянием ацетилцистеина и глутатиона (рис. 1, б, в).

Несколько отличается зависимость высоты и потенциала пика двухвалентного железа от концентрации α -липоевой кислоты (рис. 2, а), хотя характер зависимости аналогичен. В нашем случае за счет комплексообразования и переноса электрона от двухвалентного железа с образованием трехвалентного и восстановлением дисульфидной группы до сульфгидрильной мы наблюдаем трансформации волны восстановления двухвалентного железа и появление волны трехвалентного:



Эта реакция может сопровождаться последующей димеризацией α -липоевой кислоты, как это происходит в биосистемах [19]:



Полученные данные согласуются с информацией о роли липоевой кислоты в биосистемах [20, 21]. При этом комплексообразование с переходными металлами ответственно за детоксикационную функцию α -липоевой кислоты в организме.

Таким образом, если исследуемые аминокислоты — цепь обрывающие благодаря легкой

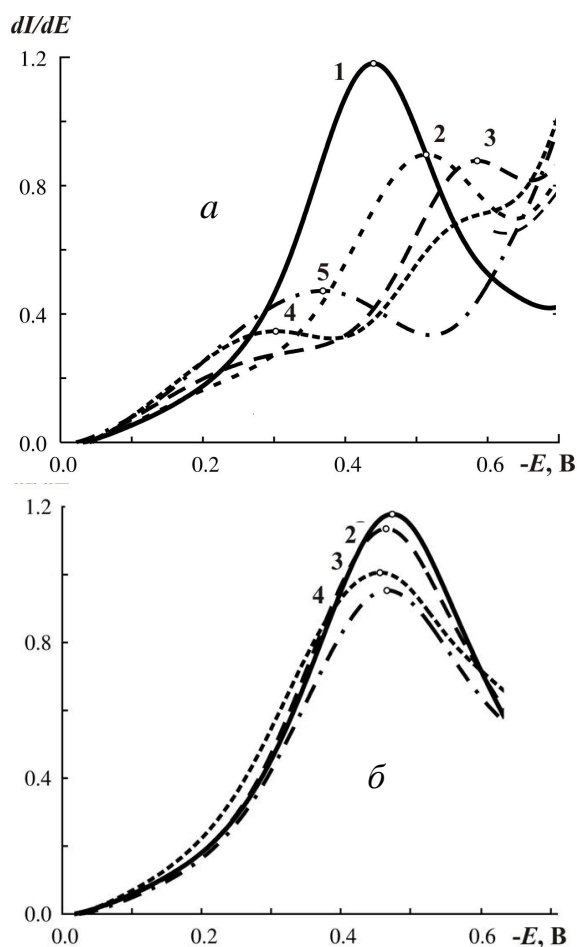
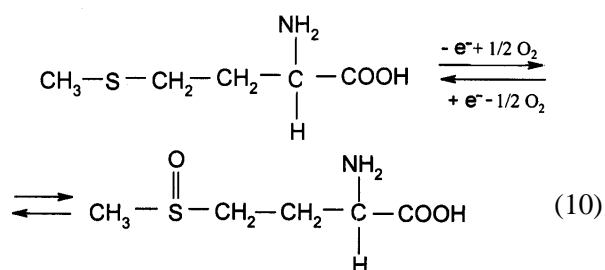


Рис. 2. Дифференциальные вольтамперограммы восстановления Fe^{2+} , $C = 2.42 \cdot 10^{-3}$ М/л (1) на платиновом катоде на фоне 0.1 М раствора NaCl в воде при различных концентрациях α -липоевой кислоты (а): 2 – 0.19; 3 – 0.38; 4 – 0.54; 5 – $0.76 \cdot 10^{-3}$ М/л и метионина (б): 2 – 0.38; 3 – 0.74; 4 – $1.67 \cdot 10^{-3}$ М/л.

окисляемости [12, 13], то превентивными антиоксидантами они являются благодаря достаточно высокому сродству к электрону и способности к комплексообразованию.

В то же время метионин, содержащий закрытую серу, вызывает значительно меньшее снижение высоты пика волны двухвалентного железа. Кроме того, данная аминокислота обуславливает не катодный, а небольшой анодный сдвиг потенциала этого пика (рис. 2, б), то есть продукт взаимодействия двухвалентного железа с метионином обладает большим сродством к электрону, чем сам ион железа. Следует подчеркнуть, что в присутствии этого соединения наблюдать появление волны трехвалентного железа не удается, что свидетельствует о достаточно сложном механизме взаимодействия метионина с ионом двухвалентного железа, очевидно, сопровождающимся участием растворенного кислорода. Это согласуется с литературными данными о роли метионина в биологических системах. Метионин не участвует в каталитических реакциях с переносом электрона и может восстанавливаться только после взаимодействия с АФК, что обеспечивает стабильный пул метионина в биосистемах в результате циклического окисления–восстановления [22, 23]:



Таким образом, действие метионина в качестве ингибитора реакции Фентона в данных условиях неоднозначно.

По представленным в таблице данным, исходя из величины катодного сдвига потенциала пика волны восстановления двухвалентного железа при одинаковой концентрации исследуемых БАВ, можно составить определенное представление об относительной прочности образующихся комплексов с каждым из исследуемых БАВ. Судя по максимальному катодному сдвигу потенциала под влиянием α-липоевой кислоты, с ее участием образуется наиболее прочный комплекс с железом по сравнению с тиолсодержащи-

ми аминокислотами. Таким образом, роль α-липоевой кислоты как превентивного антиоксиданта в большей степени обусловлена ее способностью связывать двухвалентное железо.

Глутатион и ацетилцистеин образуют комплексы практически с одинаковой прочностью и несколько менее прочный комплекс с ионом двухвалентного железа образует цистеин.

Для того чтобы подтвердить действие исследованных БАВ в качестве превентивных антиоксидантов под действием переноса электрона определено изменение высоты пика железа под влиянием определенной одинаковой концентрации БАВ. Судя по данным таблицы, наиболее эффективно снижает высоту пика и, соответственно, концентрацию двухвалентного железа в растворе за счет переноса электрона цистеин, разность потенциала которого по отношению к двухвалентному железу также максимальна.

Исходя из полученных результатов, третьим по эффективности является глутатион, который известен как внутриклеточный антиоксидант, препятствующий перекисному окислению липидов на поверхности мембран клеток. Он, вероятно, в меньшей мере работает как превентивный антиоксидант. Эти данные согласуются с информацией о его роли в поддержании окислительно-восстановительного баланса в организме [24].

ВЫВОДЫ. Использование электрохимического метода для изучения механизма и определения превентивной антиоксидантной активности серусодержащих БАВ является достаточно перспективным. Установлен вклад в величину превентивной антиоксидантной активности исследуемых БАВ разности сродства к электрону иона двухвалентного железа и БАВ и на основании сопоставления потенциалов электрохимического восстановления двухвалентного железа и исследуемых БАВ показана их относительная эффективность. Данные подтверждены опытами по снижению концентрации двухвалентного железа и появлением пика восстановления трехвалентного железа под влиянием исследованных БАВ. На основании сдвига потенциала восстановления двухвалентного железа под влиянием БАВ сделано заключение об их способности к комплексообразованию и определен вклад последнего в превентивную антиоксидантную активность БАВ. Полученные результаты способствуют бо-

лее глубокому пониманию на молекулярном уровне процессов и механизмов антиоксидантной защиты с участием исследованных БАВ.

РЕЗЮМЕ. Методом диференційної імпульсної вольтамперометрії досліджено превентивну антиоксидантну активність сірковмісних біологічно активних сполук (БАВ). Про ефективність досліджуваних БАВ в якості превентивних антиоксидантів можна судити за різницею спорідненості до електрона двовалентного заліза і БАВ. Виміряні в однакових умовах потенціали відновлення цих сполук дозволили визначити відносні величини їх ефективності. За величиною зсуву потенціалу відновлення двовалентного заліза у присутності БАВ однакової концентрації зроблено висновок про відносну міцність комплексів, що утворюються з кожним з досліджуваних БАВ. Показано перспективність використання електрохімічного підходу для вивчення механізму дії і визначення превентивної антиоксидантної активності БАВ.

SUMMARY. A preventive antioxidant activity of sulfur-containing bioactive compounds (BAC) was investigated by differential pulse voltammetry. It was shown that the difference of affinities to the electron of bivalent iron and BAC can be used to judge about an efficiency of investigated BAC as preventive antioxidants. The measured under identical conditions reduction potentials of these compounds allowed to determine the relative values of their efficiency. The conclusion about relative stability of the complexes of the investigated BAC is made on the basis of the values of change of the reduction potential of Fe²⁺ in the presence of BACs. The inference is made about prospective using the electrochemical approach to study the action mechanism and determination of preventive antioxidant activity of BAC.

ЛИТЕРАТУРА

1. *Arshad N.* Antioxidants: An Electrochemical and ESR Spectroscopic Investigation. -Lap Lambert Academ. Publ., 2011.
2. *Udenigwe C.C., Aluko R.E.* // Int. J. Mol. Sci. -2011. -№ 12. -P. 3148—3161.

3. *Suzen S., Cihaner S.S., Coban T.* // Chem. Biol. Drug Des. -2012. -79, № 1. -P. 76—83.
4. *Jain S., Jain A., Sharma P. et al.* // J. Nat. Prod. Plant Res. -2012. -2, № 2. -P. 281—287.
5. *Jelveh S., Kaspler P., Mahmood J. et al.* // Int. J. Radiat. Diol. -2013. -89, № 8. -P. 618—627.
6. *Левин А.Я.* // Рус. мед. журн. -2007. -№ 24. -С. 1851—1855.
7. *Sochor J., Dobes J., Krystofova J. et al.* // Int. J. Electrochem. Sci. -2013. -№ 8. -P. 8464—8489.
8. *Alam Md. N., Bristi N.J., Rafiquzzaman Md.* // Sad. Pham. J. -2013. -21, № 2. -P. 143—152.
9. *Хасанов В.В., Рьжова Г.Л., Мальцева Е.В.* // Химия раст. сырья. -2004. -№ 3. -С. 63—75.
10. *Андреев А.Ю., Кушнарєва Ю.Е., Старков А.А.* // Биохимия. -2005. -70, № 2. -С. 246—264.
11. *Sellam Kh., Ramchoun Mh., Alem Ch. et al.* // Oxid. Antioxid. Med. Sci. -2013. -2, № 3. -P. 211—216.
12. *Шаповал Г.С., Громова В.Ф., Миронюк И.Е., Круглюк О.С.* // Журн. общ. химии. -2008. -78, вып. 12. -С. 2040—2044.
13. *Громова В.Ф., Шаповал Г.С., Миронюк И.Е.* // Там же. -2002. -72, вып.5. -С. 828—833.
14. *Зенков Н.К., Меньшикова Е.В.* // Успехи соврем. биологии. -1993. -113, вып. 3. -С. 286—296.
15. *Oturan M.A., Pinson J.* // J. Electroanal. Chem. -1992. -334. -P. 103—109.
16. *Rosales E., Pazols M., Sanroman M.A.* // Chem. Eng. Techn. -2012. -35, № 4. -P. 609—617.
17. *Santano-Casiano J.M., Gonzalez-Davila M., Rodriguez M.J., Millero F.J.* // Mar. Chem. -2000. -70. -P. 211—222.
18. *Piste P.* // JPCBS. -2013. -3, № 1. -P. 143—149.
19. *Krishnan C. V., Garnett M.* // Int. J. Electrochem. Sci. -2011. -6. -P. 3607—3630.
20. *Барабой В.А.* // Укр. биохим. журн. -2005. -77, № 3. -P. 20—26.
21. *Одинак М.М., Вознюк И.А., Мельникова Е.В. и др.* // Consilium Med. -2007. -8. -С. 179—183.
22. *Levine R.L., Vosoni L., Berlett D.S., Stadtman E.R.* // Proc. Natl. Acad. Sci. -1996. -93. -P. 15036—15040.
23. *Luo Sh., Levine R.L.* // FASEB J. -2009. -23, № 2. -P. 464—472.
24. *Atmaca G.* // Yonsei Med. J. -2004. -45, № 5. -P. 776—788.

Институт биоорганической химии и нефтехимии
НАН Украины, Киев

Поступила 20.06.2014