

УДК 615.22:616.12-008.46-039-08:577.352.333

ДОСЛІДЖЕННЯ АНТИОКСИДАНТНОЇ ДІЇ ПОХІДНИХ БУРШТИНОВОЇ КИСЛОТИ

Ю.П.Гриневич, С.А.Олійник, С.Б.Французова, І.І.Синицька

Інститут ядерних досліджень НАН України, проспект Науки, 47, м. Київ, 03028; Медичний інститут Української асоціації народної медицини, вул. Толстого, 9, м. Київ, 01004, E-mail interdep@kinr.kiev.ua

Дата надходження статті до редакції 25 липня 2001 року

Вивчалася антиоксидантна дія похідних бурштинової кислоти - натрію сукцинату, суфану та яктону - *in vitro*, а також вплив двох останніх при внутрішньом'язевому введенні щурам на осмотичну резистентність еритроцитів. Встановлено, що в реакції із стабільним радикалом дифенілпікрилгідразилом жодна з досліджуваних сполук не виявляє антирадикальної дії. Дослідження антиоксидантних властивостей похідних бурштинової кислоти, проведені хемілюмінісцентним методом, показали, що вони реалізуються переважно в плазмі крові. В еритроцитах вони або майже відсутні, або проявляється прооксидантна дія, найбільш виражена у яктону. Імовірно, це пов'язано із спроможністю яктону знижувати осмотичну резистентність еритроцитів.

КЛЮЧОВІ СЛОВА: антиоксидантна активність, похідні бурштинової кислоти, натрію сукцинат, суфан, яктон, хемілюмінісценція, осмотична резистентність еритроцитів.

Підвищений рівень соматичних захворювань, в патогенезі яких виявляється недостатній рівень забезпечення киснем, вимагає ряду недорогих, малотоксичних нових препаратів з антигіпоксичними та антиішемічними властивостями. Тому пошук та дослідження речовин, які підвищують стійкість організму до гіпоксичних впливів, є актуальним для сучасної медицини [1]. Важливо, щоб ці препарати були максимально наближеними за хімічною будовою до природних метаболітів організму, оскільки вони за низької токсичності та мінімальній кількості ускладнень в терапевтичних дозах, що можуть варіювати у досить широких межах, виявляють числені фармакологічні властивості. Зважаючи на поширеність впродовж останніх років поглядів щодо вільнорадикального механізму цілого ряду патологічних станів [2], зокрема, гіпоксичних та ішемічних уражень, дослідження антиоксидантних властивостей потенційних антигіпоксиків має практичне значення для доповнення оцінки їх фармакологічної дії. Серед таких препаратів можна виділити похідні бурштинової кислоти - натрію сукцинат, суфан та яктон.

Бурштинова кислота є субстратом циклу Кребса і відіграє значну роль в енергетичному обміні [3]. Екзогенно введена на фоні гіпоксії натрієва сіль бурштинової кислоти (натрію сукцинат) нормалізує окислювальне фосфорилування, величину редокс-потенціалу, вміст молочної та лимонної кислот в тканинах та піридиннуклеотидів в мітохондріях печінки тварин, підвищуючи, таким чином, резистентність організму до гіпоксії, ішемії тощо. Імовірно, нормалізуючим впливом на енергетичний метаболізм в умовах кисневого голодування пояснюється і актопротекторна активність натрію сукцинату. Натрію сукцинат, підвищуючи споживання тканинами кисню, знижує його внутрішньоклітинний тиск, що пояснює наявність у препараті радіопротекторної дії. Імовірно, що зниження парціального тиску кисню в тканинах частково є причиною зниження вмісту продуктів ПОЛ, яке спостерігається при застосуванні натрію сукцинату на фоні різноманітної патології (променевого ураження, максимальне фізичне навантаження, інтоксикації) [4].

Суфан (калієва сіль N-сукцин-d,l-триптофану) має кардіотонічні, антиангінальні та антигіпоксичні властивості, збільшує толерантність міокарду при оклюзії коронарної артерії, стимулює колатеральний кровообіг в осередку ішемії серцевого м'язу у собак, знижує потребу серця у кисні, підвищує кисневий резерв міокарда, обмежує зону некрозу при експериментальному інфаркті міокарда у котів. В умовах гострої гіпоксичної гіпоксії суфан сприяє вилученню з крові тканиною міокарду необхідної для задоволення її потреб кількості кисню, запобігаючи утворенню кисневого боргу в такому випадку, тому в постгіпоксичному періоді не виникає потреби у компенсаторному посиленні тканинного дихання. Превентивне введення суфану щурам практично повністю нормалізує зумовлені гіпоксією зміни ультраструктурної організації гематопаренхиматозного бар'єру та мітохондріального апарату кардіоміоцитів, що свідчить про доцільність його застосування при гіпоксичних станах. Подібно до натрію сукцинату, застосування суфану на фоні патологічних станів (максимальні фізичні навантаження, променевого ураження, експериментальні інтоксикації) сприяє зменшенню продуктів перекисного окислення ліпідів (ПОЛ) в крові та органах тварин [5, 6].

Перспективним стреспротектором та антигіпоксиком є інший український препарат, синтезований колективом співробітників Інституту органічної хімії НАН України - сукцинат моно [(2-диметиаміно)

Дослідження антиоксидантної дії похідних бурштинової кислоти

етилового ефіру] бурштинової кислоти, яктон - бурштиновокисла сіль тонібралу. Яктон малотоксичний, проявляє фригопротекторні властивості, суттєво підвищує ефект адаптації до замерзання (морозостійкість організму), сприяє більшому збереженню вмісту глюкози крові та глікогену міокарду і печінки, підвищує рівень аденілових нуклеотидів та креатинфосфату і активність ключових ферментів циклу Кребса в міокарді [7]. Фригопротекторна активність яктону підтвердилася як в експерименті, так і при клінічному дослідженні. Стреспротекторна активність яктону проявляється при розвитку цілого ряду патофізіологічних проявів стрес-синдрому. Так, у щурів підвищується загальна поведінкова активність, фізична витривалість, знижується виразкоутворення на слизовій оболонці шлунка. Стреспротекторний ефект яктону майже такий, як у діазепама. Препарат позитивно впливає на фізичну працездатність. Яктон активує ферменти циклу Кребса і є субстратом для нього, зберігаючи психоенергізуючу активність тонібралу. Препарат інтенсифікує відновлення підвищеного вмісту лактату, що свідчить про активацію синтезу глікогену. Крім того, яктон підсилює регенерацію печінки, підвищуючи функціональну активність мітохондрій та нормалізацію проникності клітинних мембран і енергетичні ресурси гепатоцитів. Подібно іншим похідним бурштинової кислоти, він знижує рівень первинних та кінцевих продуктів ПОЛ в органах (печінка, міокард, головний мозок, селезінка) та крові тварин при променевому ураженні та максимальному фізичному навантаженні [8, 9]. Проте шляхи реалізації антиоксидантної дії похідних бурштинової кислоти на стадії радикалоутворення (та рекомбінації), яка є складовою частиною ПОЛ [10], вивчені недостатньо. Тому дослідження механізмів антиоксидантної дії натрію сукцинату, суфану та яктону в загальній схемі утворення продуктів ПОЛ стало логічним продовженням вивчення їх фармакологічних властивостей.

МАТЕРІАЛИ І МЕТОДИ

Антирадикальну активність досліджуваних препаратів вивчали спектрофотометричним методом за реакцією із стабільним радикалом дифенілпікрілгідразилом (ДФПГ), спиртовий розчин якого має у видимій області максимум поглинання із $\lambda=520$ нм [11]. Спиртові розчини досліджуваних препаратів (в порівнянні з відомим відновлювачем цистеїном) в концентрації $1,902 \cdot 10^{-4}$ М змішували з еквімолярним розчином ДФПГ і реєстрували кінетичні криві зміни оптичної густини розчину ДФПГ з часом при 25°C . Визначали константи швидкості реакції препаратів з ДФПГ (К) та період напівперетворення (T_{50}) ДФПГ у нерадикальну форму під дією субстратів.

Результати отримані в однокомпонентній системі можуть суттєво відрізнитися від багатокомпонентних біологічних систем, тому наявність в досліджуваних препаратів антиоксидантних та антирадикальних властивостей вивчали в компонентах крові за методом хемілюмінесценції (ХЛ). Оскільки H_2O_2 може викликати гемоліз еритроцитів і тим самим впливати на процес свічення, вищевказані властивості вивчали окремо в плазмі та еритроцитах донорів, як описано нами раніше [12]. Метод ХЛ дозволяє визначати сумарну антиоксидантну (АО) активність антиоксидантів без попереднього виділення окремих компонентів [13], в його основі лежить модельна реакція ініціювання окислення вуглеводнів [14]. Метод не вимагає великих об'ємів біологічних проб (від десятих мілілітра до мікролітра), характеризується експресністю проведення аналізу, дає можливість реєструвати кінетику реакції. Антиоксидантну активність препаратів визначали при $t=25^\circ\text{C}$ на хемілюмінометрі ХЛМ1Ц-01 за методикою [15], кінцева концентрація препарату $1 \cdot 10^{-4}$ М. Реєстрували світлосуму (S) за 5 хв, максимальну (I_{max}) та кінцеву ($I_{\text{кін}}$) інтенсивність свічення.

Свічення, що виникає в біологічних об'єктах (системах), пов'язане з екзотермічними окисно-відновними процесами, спряженими з утворенням радикалів різного типу [15]. Тому дослідження процесу ПОЛ на стадії їх рекомбінації (хемілюмінесценції) суттєво доповнює механізми розвитку ПОЛ. Крім того, графічна реєстрація сигналу дає можливість оцінити кінетичні особливості ХЛ-реакції.

Дослідження впливу суфану та яктону на проникливість еритроцитарних мембран проводили на щурах-самцях лінії Вістар масою тіла 150-200 г. Тварини були розподілені на 2 групи: I - контрольна, II - тварини, яким суфан вводили внутрішньом'язево однократно в дозі 50 мг/кг; III - тварини, яким вводили яктон внутрішньом'язево однократно в тій же дозі. Інтегральний показник мембранних процесів - осмотичну резистентність еритроцитів (ОРЕ) - визначали загальноприйнятим методом [16]. Проникливість еритроцитарних мембран (ПЕМ) оцінювали за процентом зруйнованих клітин в пробах крові з гіпотонічним гемолітиком в ряду гіпотонічних розчинів NaCl (0,55-0,1%).

Результати досліджень обробляли статистично з використанням t-критерію Ст'юдента [17].

РЕЗУЛЬТАТИ Й ОБГОВОРЕННЯ

Натрію сукцинат, суфан та яктон практично не виявляють будь-яких відновлювальних властивостей в модельній однокомпонентній системі (табл. 1). Опосередковано швидкість цих реакцій наочно демонструє великий період напівперетворення ДФПГ під дією перерахованих препаратів ($T_{50}=24-174$ діб), який перевищує період спонтанного перетворення ДФПГ в спиртовому розчині в нерадикальну

форму ($T_{50}=12$ діб). Тобто, можна зробити висновок, що зазначені препарати не є антиоксидантами прямої дії.

Таблиця 1.

Характеристика антирадикальної активності досліджуваних препаратів по взаємодії з ДФПГ.

Досліджувані ліганди	K, л/моль*хв	T_{50}
Контроль (без препаратів)	0,305	12,0 доби
Натрію сукцинат	0,154	23,7 доби
Суфан	0,021	173,9 доби
Яктон	0,094	38,8 доби

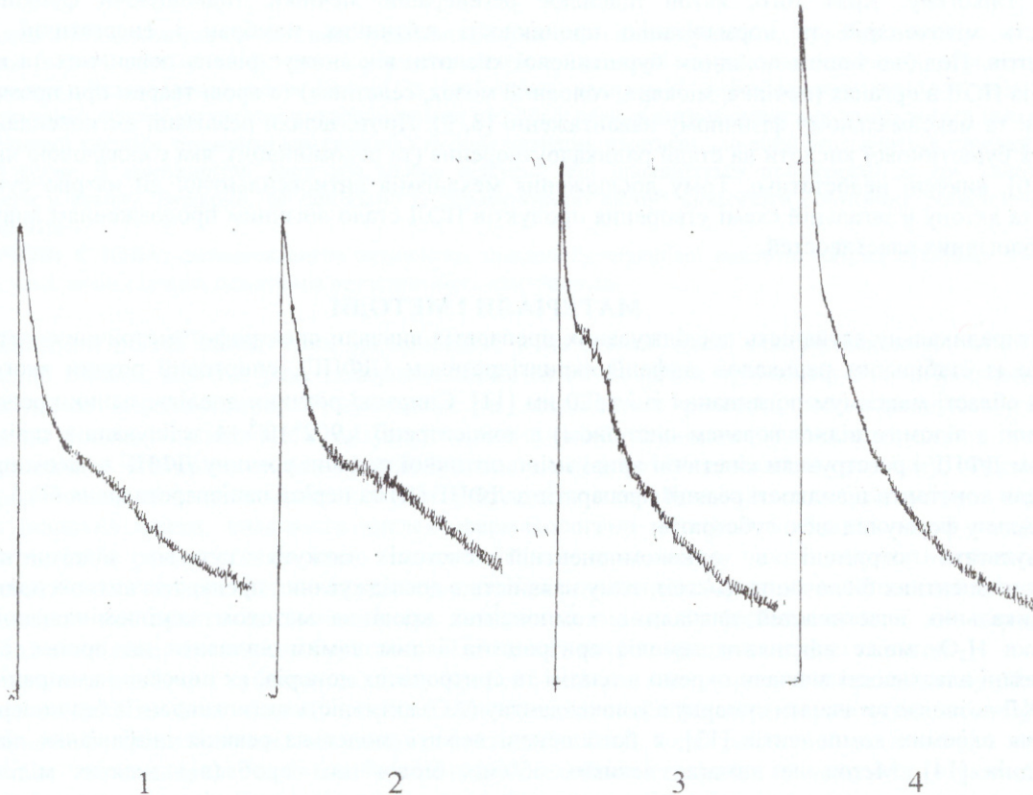


Рис. 1. Хемілюмінограми плазми крові у присутності похідних бурштинової кислоти: 1 - плазма + суфан; 2 - плазма + яктон; 3 - плазма + натрію сукцинат; 4 - плазма (контроль).

Характер хемілюмінограм плазми крові в присутності суфана, яктону та натрію сукцинату однотипний (рис. 1). Криві свічення практично не відрізняються за значеннями інтенсивності свічення ($I_{\max}=2750\pm 283$; 2800 ± 297 та 2800 ± 302 імпл/с для суфана, яктону та натрію сукцинату відповідно) та світлосуми ($S=330000\pm 33582$; 360000 ± 36721 ; 339000 ± 34563 імпл*5 хв відповідно для суфана, яктону та натрію сукцинату). Зменшення інтенсивності свічення та світлосуми плазми крові в присутності вищезазначених препаратів в порівнянні із однією плазмою ($I_{\max}=3700$ імпл/с, $S=380\cdot 10^3$ імпл*5 хв) вказує на наявність у цих препаратів антиоксидантних властивостей. Криві свічення для всіх трьох препаратів характеризуються відсутністю індукційного періоду для першого піку та значною швидкістю його наростання. Другий участок хемілюмінограми (крива свічення) у всіх трьох випадках характеризується різною швидкістю зміни інтенсивності свічення, яка є більш високою для натрію сукцинату (рис. 1, крива 3). Залишкова (кінцева) інтенсивність свічення для системи "плазма+яктон" та "плазма+суфан" практично рівна.

Вплив суфана, яктону та натрію сукцинату на свічення еритроцитів проявляється по-різному (рис. 2). Порівняно із ХЛ еритроцитів без препаратів ($I_{\max}=950\pm 107$ імпл/с, $S=56434\pm 5718$ імпл*5 хв), суфан збільшує амплітуду першого піку свічення в 1,9 рази, а світлосуму - в 2,6 рази ($I_{\max}=1800\pm 195$ імпл/с, $S=149439\pm 15221$ імпл*5 хв). Яктон збільшує амплітуду першого піку в 6,4 рази, а світлосуму - в 12,4 рази

Дослідження антиоксидантної дії похідних бурштинової кислоти

($I_{\max}=6100\pm 639$ імп/с, $S=698604\pm 70521$ імп*5 хв). Натрію сукцинат збільшує амплітуду першого піку в 1,2 рази, а світлосуму - в 1,8 рази ($I_{\max}=1150\pm 123$ імп/с, $S=102335\pm 100798$ імп*5 хв).

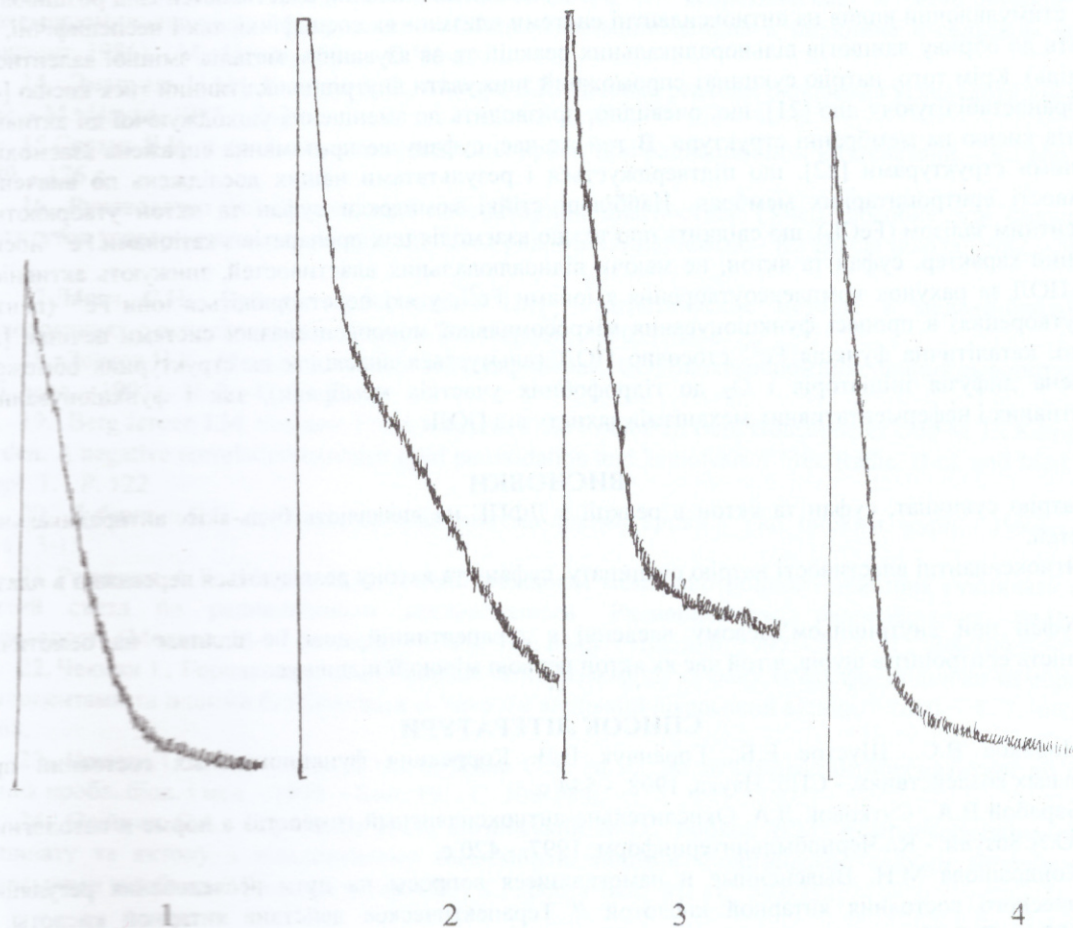


Рис. 2. Хемілюмінограми еритроцитів у присутності похідних бурштинової кислоти: 1 - еритроцити + суфан (масштаб 1:3,5); 2 - еритроцити + яктон (масштаб 1:1); 3 - еритроцити + натрію сукцинат (масштаб 1:6); 4 - еритроцити - контроль (масштаб 1:6).

Зміни кінетичних параметрів ХЛ кривих в присутності досліджуваних препаратів свідчить про різний їх вплив на стан еритроцитів. Якщо суфан та натрію сукцинат незначно посилюють процес свічення, то яктон, очевидно, спричиняє високий рівень гемолізу, внаслідок чого створюються більш сприятливі умови для взаємодії H_2O_2 з залізом, яке, як відомо, є активатором ПОЛ [2, 18]. Проте різна швидкість спаду свічення та його залишкова (кінцева) інтенсивність вказують на складний вплив цих препаратів на ПОЛ в еритроцитах, який не може бути зведеним лише до однієї реакції Хабера-Вайса [19].

Так, при введенні щурям терапевтичних доз суфану та яктону еритроцити щурів контрольної (I) та дослідних (II та III) груп починали гемолізуватися в 0,5-0,45% розчинах NaCl ($4,0\pm 3,4\%$, $6,9\pm 3,9\%$ і $7,2\pm 4,0\%$ відповідно для I, II та III групи). Подальше зниження концентрації посилювало процес руйнування клітин. В 0,4% розчині процент гемолізу досягав $23,8\pm 5,0\%$, $24,6\pm 5,3\%$ та $38,3\pm 5,7\%$ відповідно, в 0,35% розчині - $56,2\pm 6,1\%$, $54,5\pm 5,8\%$ та $74,2\pm 6,0\%$ відповідно. Повний гемоліз еритроцитів щурів I та II груп відбувався в 0,1% розчині, а III групи - в 0,2%. Таким чином, одноразове введення суфану в терапевтичній дозі практично не вплинуло на стан еритроцитарних мембран в порівнянні з контролем, тоді як яктону - призвело до зниження ОРЕ, що може бути пов'язаним з кислотою реакцією розчинів препарату.

Визначення впливу похідних бурштинової кислоти на процеси ПОЛ в плазмі крові та еритроцитах має практичне значення для оцінки особливостей їх фармакологічної дії. Вміст активних метаболітів кисню, що ініціюють процеси ПОЛ, в біологічних рідинах, і, зокрема, в плазмі крові, регулюється специфічними та неспецифічними компонентами антиоксидантної системи. Підвищення рівня вільнорадикальних продуктів кисню в плазмі є, переважно, наслідком інтенсифікації процесів їх

генерування в тканинах. Інтенсивність цього процесу залежить не тільки від швидкості генерування активних форм кисню в клітинах, але й від складу антиоксидантної системи тканин та біологічних рідин, зокрема, плазми [20]. Таким чином, прояви антиоксидантної активності похідних бурштинової кислоти в плазмі крові *in vitro* за умови відсутності у них виражених відновлюючих властивостей слід розцінювати або як їх стимулюючий вплив на антиоксидантні системи плазми - як специфічні, так і неспецифічні, що призводить до обриву ланцюгів вільнорадикальних реакцій та зв'язуванням металів змінної валентності (залізо, мідь). Крім того, натрію сукцинат спроможний знижувати внутрішньоклітинний тиск кисню [4] і має мембраностабілізуючу дію [21], що, очевидно, призводить до зменшення ушкоджуючої дії активних метаболітів кисню на мембранні структури. В той же час, суфану не притаманна виражена взаємодія з мембранними структурами [22], що підтверджується і результатами наших досліджень по вивченню проникливості еритроцитарних мембран. Найбільш стійкі комплекси суфан та яктон утворюють з трьохвалентним залізом ($FeCl_3$), що свідчить про те, що взаємодія цих препаратів з катіонами Fe^{3+} носить специфічний характер: суфан та яктон, не маючи відновлювальних властивостей, знижують активність процесів ПОЛ за рахунок комплексоутворення з іонами Fe^{3+} , у які перетворюються іони Fe^{2+} (центри радикалоутворення) в процесі функціонування мітосомальної монооксигеназної системи печінки [23, 24]. Тобто, каталітична функція Fe^{2+} стосовно ПОЛ гальмується внаслідок як структурних обмежень (уповільнена дифузія ініціаторів і O_2 до гідрофобних участків мембрани), так і функціонуванням ферментативних і неферментативних механізмів захисту від ПОЛ.

ВИСНОВКИ

1. Натрію сукцинат, суфан та яктон в реакції з ДФПГ не виявляють будь-яких антирадикальних властивостей.
2. Антиоксидантні властивості натрію сукцинату, суфану та яктону реалізуються переважно в плазмі крові.
3. Суфан при внутрішньом'язевому введенні в терапевтичній дозі не впливає на осмотичну резистентність еритроцитів шурів, в той час як яктон певною мірою її підвищує.

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. Новиков В.С., Шустов Е.Б., Горанчук В.В. Коррекция функциональных состояний при экстремальных воздействиях. - СПб: Наука, 1998. - 544 с.
2. Барабой В.А., Сутовой Д.А. Окислительно-антиоксидантный гомеостаз в норме и патологии / Под ред. Ю.А.Зозули. - К.: Чернобыльинтеринформ, 1997. - 420 с.
3. Кондрашова М.Н. Выясненные и намечившиеся вопросы на пути исследования регуляции физиологического состояния янтарной кислотой // Терапевтическое действие янтарной кислоты. - Пушино, 1976. - С. 8-30.
4. Руднев М.И., Варезкий В.В., Береговская Н.Н. и др. Влияние низких доз ионизирующей радиации и других факторов окружающей среды на организм / Под ред. М.И.Руднева. - К.: Наук. думка, 1994. - 216 с.
5. Гриневич А.И. Экспериментальные исследования по фармакологии негликозидных кардиотоников: Автореф. дис. ... д-ра мед. наук. - К., 1995. - 42 с.
6. Чекман І., Горчакова Н., Олійник С. та ін. Динаміка перекисного окислення ліпідів в органах шурів при опроміненні та антиоксидантний ефект суфану // Галицький лікарський вісник. - 2000. - Т. 7, число 2. - С. 85-88.
7. Пат. 21966 Україна, МКИ С 07 С 69/40, С 07 С 87/127, А 61 К 31/22. Сукцинат моно[(2-диметиламіно)етилового ефіру] янтарної кислоти, який має адаптогенну та стреспротективну активність / М.О.Лозинський, Ю.Г.Бобков, А.П.Шиванюк та ін. - Опубл. 30.04.98. - Бюл. № 2. - 12 с.
8. Гайворонская В.В. Изыскание средств, защищающих и восстанавливающих функцию печени при повреждающих воздействиях: Автореф. дис. ... к.м.н. - СПб., 1992. - 22 с.
9. Барабой В.А., Олійник С.А., Туманов В.А. та ін. Динаміка перекисного окислення ліпідів в органах шурів при опроміненні та антиоксидантний ефект яктону // Медична хімія. - 2000. - Т. 2, № 4. - С. 17-22.
10. Поливода Б.И., Конев В.В., Попов Г.А. Биофизические аспекты радиационного поражения биомембран. - М.: Энергоатомиздат, 1990. - 155 с.
11. Починок Т.В., Тараховский М.Л., Портнягина В.А. и др. Экспресс-метод определения антиокислительной активности лекарственных веществ // Хим.-фарм. журн. - 1985. - Т. 19, № 5. - С. 565-569.
12. Гриневич Ю.П., Олійник С.А., Марушко Ю.В., Коршевнюк Д.О. Вплив препаратів природнього походження на антиоксидантні властивості плазми крові та еритроцитів // Вісник Харківського

Дослідження антиоксидантної дії похідних бурштинової кислоти

національного університету ім. В.Н.Каразіна, №528, 2001. Сер. Біофізичний вісник. Вип.2 (9). – Харків, 2001. – С. 58-63.

13. Кухтина Е.Н., Наумов В.В., Храпова Н.Г. Особенности хемилюминисцентного метода определения активности природных антиоксидантов // Теоретические и методические основы биофлуоресценции: Матер. симпоз. "Биофлуоресценция в медицине и сельском хозяйстве" (Ташкент, 1986). - М.: Наука, 1986. - С. 56-59.

14. Эмануэль Н.М., Денисов Е.Т., Майзус З.К. Цепные реакции окисления углеводородов в жидкой фазе. - М.: Наука, 1965. - 212 с.

15. Серкиз Я.И. и др. Хемилюминисценция крови при радиационном воздействии. - К.: Наук. думка, 1989. - 176 с.

16. Руководство по клинической лабораторной диагностике (Учеб. пособие для факультетов и институтов усовершенствования врачей) / Под ред. М.А.Базарновой. - К.: Выща школа, 1982. - Ч. 2. - 173 с.

17. Лапач С.Н., Чубенко А.В., Бабич П.Н. Статистические методы в медико-биологических исследованиях с использованием Excel. - К.: Морион, 2000. - 320 с.

18. Зенков Н.К., Меньшикова Е.Б. Индуцированная H_2O_2 биофлуоресценция сыворотки крови // Лаб. дело. - 1991. - № 8. - С. 30-33.

19. Berg Jeroen J.M. van den, Fouw Nanneke J. de Roclofsen Ben, Houstmueler Udo M.T., Kamp Jos A.F. Op den. A negative correlation between lipid peroxidation and hemolysis // Free Radic. Biol. and Med. - 1990. - Suppl. 1. - P. 122.

20. Дубинина Е.Е. Антиоксидантная система плазмы крови // Укр. биохим. журн. - 1992. - Т. 64, № 2. - С. 3-15.

21. Репецкая А.Г., Малюк В.И. Новый механизм мембранотропного действия сукцината натрия // Третий съезд по радиационным исследованиям: Радиобиология, радиозоология, радиационная безопасность (Москва, 14-17 октября 1997 г.): Тез. докл. - Пушино, 1997. - Т. 2. - С. 208-209.

22. Чекман І., Горчакова Н., Олійник С. та ін. Взаємодія суфану із фосфоліпідними мембранами, їх компонентами та іншими біолігандами *in vitro* // Галицький лікарський вісник. - 2000. - Т. 7, число 1. - С. 66-68.

23. Чекман І.С., Горчакова Н.О., Олійник С.А. та ін. До механізму антиоксидантної дії суфану // Вісник пробл. біол. і мед. - 1998. - Вип. 19. - С. 109-118.

24. Олійник С.А., Горчакова Н.О., Лозинський М.О., Бобков В.М. Комплексоутворення натрію сукцинату та яктону з компонентами біомембран, іншими біолігандами, солями металів, деякими лікарськими засобами // Гигиена труда: Сб. - К., 2000. - Вып. 31. - С. 343-351.

Висловлюємо подяку головному інженеру ЦЕПАНІ Інституту ядерних досліджень НАН України Головачу А.І. за технічну допомогу в проведенні експериментів.