

БИОАНТИОКСИДАНТНАЯ АКТИВНОСТЬ 3,5-ДИ-ТРЕТ- БУТИЛПИРОКАТЕХИНА И ЕГО ВЛИЯНИЕ НА ГИПОКСИЮ, ВОСПАЛИТЕЛЬНЫЙ ПРОЦЕСС, БОЛЕВОЙ СИНДРОМ И ОЖОГИ

**О.И.ШАДЫРО, Г.Н.ШИЛОВ, В.А.ТИМОЩУК, В.И.ВЛАСОВА,
А.С.ФЕДУЛОВ И И.МЕЗЕН**

Белорусский государственный университет, г.Минск, Минский медицинский институт, 220080, Ленинградская 14, химический факультет

Изучена биоантиоксидантная активность синтезированного нами на основе двухатомного фенола соединения — 3,5-ди-трет-бутилпирокатехина (3,5-ДТБП). Показано, что оно является более сильным антиоксидантом, чем α -токоферол и дибунол, его ингибирующее действие на процесс перекисного окисления липидов в гомогенате мозга крыс проявляется при концентрации вплоть до 10^{-8} - 10^{-7} М. В опытах на животных (крысы, мыши) установлена корреляция между антиокислительным эффектом 3,5-ДТБП и его защитным действием при моделировании таких патологических состояний организма как гипоксия, воспаление, ожог, болевая реакция, что подтверждает целесообразность поиска и создания лекарственных средств на основе производных двухатомных фенолов.

Ключевые слова: антиоксиданты, гипоксия, воспаление, боль, ожог.

Введение. Усиление неферментативного свободнорадикального окисления липидов сопутствует возникновению многих хронических заболеваний. Для лечения таких патологических состояний, как ишемия, атеросклероз, воспалительные процессы и др., а также патологических состояний организма, возникающих при гипоксии, эмоционально-болевом стрессе, ожогах, судорогах, в последнее время все шире используются биоантиоксиданты, являющиеся эффективными акцепторами свободных радикалов и ингибиторами процессов перекисного окисления липидов (ПОЛ) в клеточных мембранах [1, 2, 3, 4, 5, 6, 7]. В медицинской практике основная доля проводимых исследований приходится на оценку эффективности синтетических структурных аналогов токоферола, флавоноидов, стерически затрудненных одноатомных фенолов [1, 2, 4, 5, 7]. До наших работ в литературе практически отсутствовали сведения о биоантиокислительных и биологических свойствах стерически затрудненных двухатомных фенолов [6]. Нами показано, что производные двухатомных фенолов эффективно ингибируют как процессы ПОЛ, так и другие типы свободнорадикальных реакций, приводящих к повреждению биосистем. Поэтому поиск лекарственных средств среди двухатомных фенолов и их производных представляется одним из наиболее перспективных путей создания новых препаратов.

Целью настоящей работы было установление наличия биоантиоксидантной активности у стерически затрудненного производного двухатомного фенола -3,5-ди-трет-бутилпирокатехина (3,5-ДТБП). Следующим этапом было проведение экспериментов на животных, направленных на изучение корреляции между антиокислительным эффектом соединения и его защитным физиологическим действием при моделировании различных патологических состояний организма: гипоксии, ожоге,

воспалении, болевой реакции. В каждом опыте 3,5-ДТБП использовали в наиболее эффективной концентрации, установленной нами экспериментально.

Методика. Экспериментальную оценку ингибирования 3,5-ДТБП процессов спонтанного и индуцированного железо-аскорбатной смесью ПОЛ проводили по изменению скорости накопления в гомогенате мозга (ГМ) крыс малонового диальдегида (МДА) [8]. В качестве препаратов сравнения использовали широко известные антиоксиданты — токоферол и дибунол.

Исследование антигипоксического действия 3,5-ДТБП проводили на 80 крысах различного пола в возрасте 6-ти месяцев массой 200-300 г и в возрасте 2-х месяцев массой 100-110 г, а также на 44 мышах-самцах массой 20-24 г в условиях гиперкапнической и гипоксической гипоксии. Гиперкапническую гипоксию у крыс и мышей вызывали, помещая животных в герметический сосуд (750 мл — для крыс массой 200-220 г и 250 мл — для крыс массой 100-110 г и мышей). Гипоксическую гипоксию у мышей вызывали путем их подъема в барокамере на высоту 13 км, причем первые 6 км их поднимали со скоростью 1 км/мин, а последующие 7 км — со скоростью 0,5 км/мин. Об устойчивости животных к гипоксии судили по числу выживших грызунов и средней продолжительности жизни погибших. Антигипоксическое действие 3,5-ДТБП изучали в сравнении с известным антиоксидантом — гамма-оксимасляной кислотой (ГОМК). Используемые в эксперименте препараты вводили животным внутрибрюшинно в дозе 25 мг/кг (в объеме 0,25 мл) за 30-60 мин до помещения животных в гермо- или барокамеру. 3,5-ДТБП растворяли в 50%-ном растворе этанола, а ГОМК — в дистиллированной воде, используя 2% и 0,2%-ные растворы. Контрольным животным вводили 50%-ный раствор этанола или дистиллированную воду в том же объеме.

Противовоспалительную активность 3,5-ДТБП изучали на модели воспалительного отека лапы у 28 крыс-самцов, вызываемого субплаптарным введением животным гистамина гидрохлорида в дозе 1 мг/кг (0,1% раствор). 3,5-ДТБП вводили животным вттрибрюшинно в дозе 25 мг/кг за 30 мин до применения гистамина. У животных измеряли периметр лапы до введения гистамина и через 15 мин после его введения [9].

Противоожоговые свойства 3,5-ДТБП изучали на модели, вызванного паром ожога проксимального отдела хвоста 15 крыс. Для этого марлевой салфеткой размером 1,5 x 3 см обворачивали проксимальный отдел хвоста, после чего на 5 с прикладывали паяльник со специальными насадками. На место ожога накладывали таких же размеров фильтр, смоченный подсолнечным маслом (0,2 мл) и растворенного в том же объеме подсолнечного масла витамином А (10 мг/кг) и 3,5-ДТБП (10 мг/кг). О противоожоговом эффекте препарата судили по периметру хвоста, измеренного на месте ожога через сутки.

Для создания болевого синдрома использовали метод горячей пластины [10]. Достоверность результатов оценивали с помощью критерия Стьюдента.

Результаты и обсуждение. В таблице приведены результаты сравнительного исследования биоантиоксидантных свойств 3,5-ДТБП токоферола и дибунола. Токоферол взят для сравнения как известный и широко применяемый в биологии и медицине антиоксидант, дибунол — как соединение, близкое по химическому строению и механизму действия на процессы свободнорадикального окисления.

При добавлении к ГМ крыс 3,5-ДТБП в концентрации 10^{-8} — 10^{-5} М скорость накопления МДА достоверно уменьшается в случае спонтанного ПОЛ на 16,3-52,0%, в случае индукции ПОЛ железо-аскорбатной смесью — на 61,5-93,7%. Токоферол в тех же концентрациях уменьшает скорость накопления МДА на 1,4-34,7% в случае спонтанного ПОЛ и на 1,4-19,7% — в случае индукции ПОЛ. Дибунол же при концентрации 10^{-8} М даже усиливает окисление. Как видно, антиокислительное действие 3,5-ДТБП проявляется даже при концентрации 10^{-8} М, когда известные биоантиоксиданты своего ингибирующего влияния на процессы свободнорадикального окисления не оказывают. В присутствии 3,5-ДТБП в концентрации 10^{-8} — 10^{-7} М уровень МДА в пробах с

индуцированным ПОЛ составляет всего 9,3-38,5%, что в 2,5-10,4 раза меньше, чем в присутствии токоферола или дибунола в тех же концентрациях.

Таблица

Влияние 3,5-ДТБП, α -токоферола и дибунола на скорость накопления МДА в ГМ крыс (в процентах ингибирования образования МДА по отношению к контролю "норма")

Концентрация	Статанное ПОЛ			Железоаскорбат зависимое ПОЛ		
	3,5-ДТБП	α -токоферол	дибунол	3,5-ДТБП	α -токоферол	дибунол
10 ⁻⁴ М	16,3±4,8*	+1,4±0,4**	+25,0±8,8***	61,5±8,2*	+1,4±0,2**	+2,7±0,8***
10 ⁻⁵ М	27,4±6,7*	8,4±2,1**	+36,5±9,1***	90,7±2,0*	3,1±1,2**	3,9±0,8***
10 ⁻⁶ М	33,4±6,1*	12,5±3,8**	+21,3±8,6***	93,8±2,0*	11,7±2,8**	70,0±4,2***
10 ⁻⁷ М	52,0±9,3*	34,7±5,4**	31,3±8,8*	93,7±1,1*	19,7±2,7**	71,0±4,1***
10 ⁻⁸ М	59,1±7,1*	48,6±7,1*	50,0±0,4*	96,6±1,7*	24,8±8,1**	96,1±0,5*
10 ⁻⁹ М	76,8±4,3*	60,4±9,2*	59,4±7,2*	96,8±1,2*	24,6±9,7**	96,8±1,2*

Примечание: достоверность отличий ($p < 0,05 - 0,001$) при сравнении показателей контроля "норма" и опытных проб — *; 3,5-ДТБП и α -токоферола — **; 3,5-ДТБП и дибунола — ***.
+ — активация ПОЛ.

Таким образом, полученные данные свидетельствуют о том, что 3,5-ДТБП, созданный на основе двухатомного фенола, обладает выраженным антиокислительным действием. Учитывая это, непосредственный интерес представляет оценка физиологической активности этого соединения.

На рис. 1 показано влияние 3,5-ДТБП на выживаемость крыс различного пола и возраста, а также мышей в условиях гиперкапнической и гипоксической гипоксии. Из представленных данных видно, что 3,5-ДТБП обладает выраженным антигипоксическим действием на разных видах животных. При его введении в дозе 25 мг/кг увеличивается на 50% продолжительность жизни половозрелых ($p < 0,01$) и на 75% неполовозрелых ($p < 0,01$) животных. Следует отметить, что животных извлекали из термокамеры сразу же после прекращения дыхательных движений. В контрольной группе животных выжила только одна крыса - 5,3%, тогда как в опытной группе, несмотря на значительно более длительное пребывание крыс в термокамере, выжило 6 животных — 27,3% ($p < 0,01$). 3,5-ДТБП увеличивает в условиях гиперкапнической гипоксии продолжительность жизни мышей в 1,5 раза, а также количество выживших мышей с 8,3% до 58,3%. Эффективность антигипоксического действия 3,5-ДТБП увеличивается при увеличении его дозы и достигает максимума при 25 мг/кг. Известный антигипоксикант ГОМК повышал продолжительность жизни животных в условиях гиперкапнической гипоксии на 30% ($p < 0,01$) при введении его в дозе 300 мг/кг. Такой же фармакологический эффект 3,5-ДТБП оказывал при введении его в дозе 10 мг/кг, т.е. в 30 раз меньшей. Использование 3,5-ДТБП в условиях гипоксической гипоксии позволяет увеличить продолжительность жизни мышей на 30%.

Исследование действия 3,5-ДТБП на воспалительный отек лапы крыс, вызванный субплантарным введением гистамина, показало, что у контрольных животных наблюдается увеличение периметра лапы на $5,6 \pm 0,3$ мм, а у животных, которым вводили 3,5-ДТБП в дозе 25 мг/кг, всего на $3,3 \pm 0,5$ мм, т.е. у опытных крыс увеличение периметра лапы было на 41% ($p < 0,01$) меньше, чем у контрольных животных.

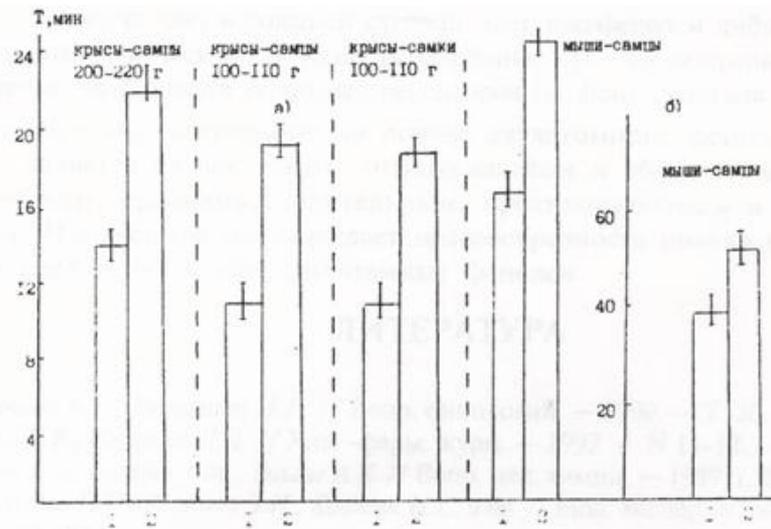


Рис. 1. Влияние 3,5-ДТБП на выживаемость крыс различного пола и возраста, а также мышей в условиях гиперкапнической (а) и гипоксической (б) гипоксии.

T, мин — время жизни в мин; 1 — контроль; 2 — опыт

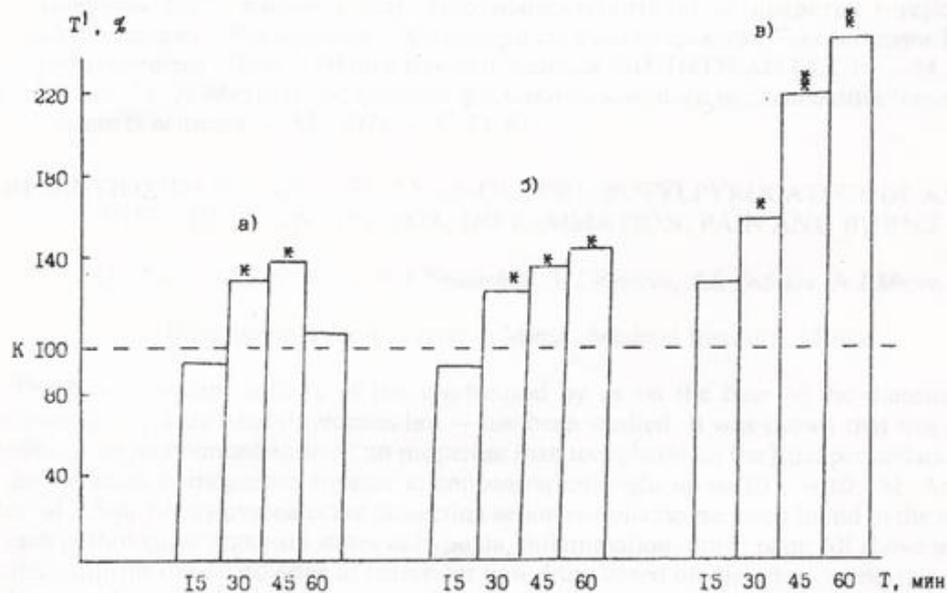


Рис. 2. Влияние различных антиоксидантов на проявление болевого синдрома (метод горячей пластины) на фоне действия морфина.

а) α-токоферол; б) дибунол; в) 3,5-ДТБП

T — время (мин) после инъекции морфина; T' — время в процентном отношении к контролю с момента помещения животных на пластину до проявления болевой реакции

Изучение влияния различных веществ на выраженность отека хвоста крыс в результате термического ожога позволило установить, что подсолнечное масло уменьшает периметр хвоста на месте ожога на 2%, в то время как витамин А — на 35%, а 3,5-ДТБП — на 50%. Результаты эксперимента показывают, что синтезированное нами соединение обладает сравнимым с витамином А эффектом, что свидетельствует о перспективности поиска противоожоговых средств среди производных фенолов.

Полученные данные по изучению опиатных свойств 3,5-ДТБП представлены на рис. 2. Из приведенных данных видно, что при внутрибрюшинном введении этого соединения в дозе 10 мг/кг оно в большей степени, чем токоферол и дибунол в тех же дозах

усиливает анальгетическую активность морфина, что, по-видимому, свидетельствует об изменении аффинитета опиатных рецепторов на фоне действия 3,5-ДТБП.

Таким образом, полученное на основе двухатомного фенола вещество — 3,5-ДТБП — является эффективным антиоксидантом и обладает выраженным анти-гипоксическим, противовоспалительным, противоожоговым и обезболивающим действием. Изложенное подтверждает целесообразность поиска и создания лекарственных средств на основе двухатомных фенолов.

ЛИТЕРАТУРА

1. Бурлакова Е.Б., Полтина И.П. // *Вопр. онкологии.* — 1990. — Т. 36. — С. 1155-1162.
2. Гацура В.В., Смирнов Л.Л. // *Хим.-фарм. журн.* - 1992. - N 11-12. - С. 10-15.
3. Ланкин В.З., Вихерт А.М., Тихазе А.К. // *Вопр. мед. химии.* - 1989. т.35. - N 3. - С. 18-24.
4. Мульдьяров П.Я., Волкова З.И., Козлова И.С. и др. // *Бюл. эксперим. биол.* — 1992. — N 10.—С. 393-395.
5. Хаспектов Л.Г., Ерин А.Н, Викторов И.В. - Там же. - 1992. - N 9. -С. 234-236.
6. Шадыро О.И., Лосев В.И., Тимошук В.А. // 3-я Всесоюзная конф. "Биоантаоксидант": Тезисы докладов. — М., 1989. — Т. 1. — С. 5.
7. Halliwell В., Gutteridge J.M.C. *Free Radicals in Biology and Medicine.* — Clarendon Press Oxford, 1989.
8. Владимиров Ю.Л., Арчаков А.И. *Перекисное окисление липидов в биологических мембранах.*- М., 1972.
9. Либерман С.С, Яхонтов Л.Н. Противовоспалительные средства (стероидные и нестероидные). «Фармакология. Химиотерапевтические средства. Токсикология. Проблемы фармакологии». Том 4. (Итоги науки и техники. ВИНТИ АН СССР). —М., 1973.
10. Гацура В.В. // *Методы первичного фармакологического исследования биологически активных веществ.* — М, 1974. — С. 81-83.
- 11.

BIOANTIOXIDANT ACTIVITY OF 3,5-DI-TERT-BUTYLPYROCATECHOL AND ITS INFLUENCE ON HYPOXIA, INFLAMMATION, PAIN AND BURNS

O.I Shaduro, G.N.Shilov, V.A.Timoschuk, V.I.Vlasova, A.S.Fedulov, N.I.Mezen

Belorussian State University, Minsk, Medical Institute, Minsk

The bioantioxidant activity of the synthesized by us on the base of the diatomic phenol compound — 3,5-di-t-butylpyrocatechol — has been studied. It was shown that this substance exhibits more pronounced antioxidant properties than tocopherol on the lipid peroxidation process in the rat brain homogenate appears in concentrations right up to 10^{-8} — 10^{-7} M. Antioxidant effect of 3,5-di-t-butylpyrocatechol protecting action correlation has been found in the simulation of such pathological organism states as hypoxia, inflammation, burn, pain. All above mentioned results confirms the expedience of search for new drugs based on diatomic phenols.

Key words: antioxidants, hypoxia, inflammation, burn, pain.

