

УДК 547.943.7/541.127/128.24/577.161.6

©Коллектив авторов

АНТИОКСИДАНТНОЕ ДЕЙСТВИЕ НОВЫХ АНАЛОГОВ ПРОБУКОЛА И ИХ КОМПОЗИЦИЙ С α -ТОКОФЕРОЛОМ

Н.М. СТОРОЖОК¹, А.П. КРЫСИН², Н.В.ГУРЕЕВА¹

¹Тюменская государственная медицинская академия, 625023 Тюмень,
ул Одесская, 52, факс (3452) 22-62-00

²Институт органической химии СО РАН, 630090, Новосибирск, пр Лаврентьева, 9,
факс (3832)34-47-52

В модельной системе инициированного окисления метилолеата и этилбензола изучена в сравнении с α -токоферолом и дибунолом антиоксидантная и антирадикальная активность ряда серусодержащих аналогов пробукола. Установлен линейный характер зависимости ингибирующего действия от концентрации веществ. Выявлена способность антиоксидантов блокировать накопление гидропероксидов. Впервые описаны эффекты сочетанного действия наиболее эффективного антиоксиданта – СО-3 – с α -токоферолом.

Ключевые слова: α -токоферол, экранированные фенолы, серусодержащие антиоксиданты.

ВВЕДЕНИЕ. В настоящее время не вызывает сомнения необходимость применения антиоксидантов (АО) в качестве дополнительных средств неспецифической терапии многих заболеваний. В клинической практике используют α -токоферол (α -ТФ) [1-3], дибунол [4], эмоксипин, относящиеся к экранированным фенолам. Серусодержащие аналоги фенолов не нашли широкого применения в медицине, тем не менее, интерес к ним достаточно велик и вызван способностью этих веществ эффективно тормозить окисление по нескольким механизмам. Среди лекарственных препаратов этого класса известен пробукол, ведутся клинические исследования ряда его производных [5, 6].

В Институте органической химии СО РАН г. Новосибирска синтезирован ряд серусодержащих стерически затрудненных АО, в частности, препарат под условным названием СО-3 (бис-[-3-(3',5'-дитрет-бутил-4'-гидроксифенил)-пропил]-сульфид) и его аналоги [7]. Показано, что эти вещества не обладают местным и общетоксическим действием, не оказывают влияния на эмбриогенез и развитие потомства [8, 9], что позволяет использовать их в лечебной практике.

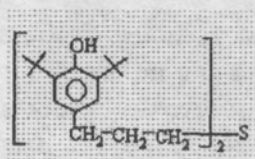
Целью настоящей работы являлось исследование антирадикальной и антиоксидантной активности (АОА) новых серусодержащих соединений в сравнении с известными ингибиторами, изучение перспектив сочетанного применения природных и синтетических АО для стабилизации окисления модельных и природных ненасыщенных липидов.

МЕТОДИКА. Антирадикальную активность соединений тестировали в системе иницированного окисления этилбензола хемилюминесцентным (ХЛ) методом [10]. Ингибирующее действие изучали при окислении модельного субстрата – метилолеата (МО) и окислении рыбьего жира. Процесс иницировали за счет термического разложения при 60°C азобисизобутиронитрила, используемого в концентрации 3×10^{-3} М. Кинетику поглощения кислорода фиксировали в манометрических установках типа Варбурга. Действие ингибиторов оценивали по величине антиоксидантной активности (АОА), количественно определяемой по формуле $АОА = \tau_i / \tau_{rep}$, а также отношением периодов индукции (τ_i / τ_s), где (τ_s) и (τ_i) – периоды индукции окисления субстрата в отсутствие и в присутствии исследуемого АО соответственно, τ_{rep} – период индукции ингибитора, принятого за стандарт. В качестве реперных использовали α -ТФ и дибунол, при этом концентрации АО были сравнимыми.

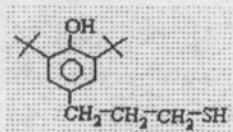
Эффективность совместного ингибирующего действия смеси количественно характеризовали абсолютным значением разности ($\Delta\tau$) периодов индукции окисления МО в присутствии композиции АО (τ_Σ) и простой суммы индивидуальных компонентов ($\Sigma\tau_i$) (аддитивное действие) ($\Delta\tau = \tau_\Sigma - \Sigma\tau_i$), либо выражали в относительных единицах – $(\Delta\tau / \Sigma\tau_i) \times 100\%$.

В работе были использованы α -ТФ (6-гидрокси-2,5,7,8-тетраметил-2-фитилхроман), фирмы «Serva», (Германия), дибунол (1-гидрокси-2,6-дитрет.бутил-4-метил-бензол) («Serva»), серусодержащие препараты: бис-[3-(3',5'-дитрет-бутил-4'-гидроксифенил)-пропил]-сульфид (условное название СО-3) (I), (2',6'-дитрет.бутил-4'-гидроксифенил)-меркаптопропан (II), 1-гидрокси-2,6-дитрет.бутил-4-меркаптобензол (III), МО, синтезированные в Институте органической химии СО РАН.

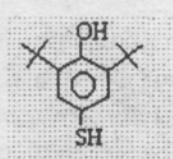
Формулы исследуемых соединений приведены ниже



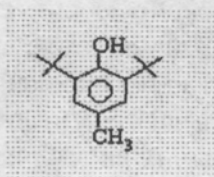
I



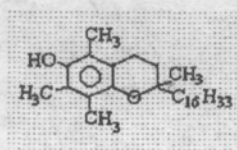
II



III



IV



V

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ. При анализе особенностей структуры изучаемых веществ можно видеть, что соединения (I-IV) относятся к экранированным фенолам и отличаются лишь природой заместителя в *пара*-положении к гидроксильной группе. В дибуноле (IV) этим фрагментом является метильная группа, не участвующая, как известно, в ингибировании окисления. В остальных соединениях присутствуют меркапто-группа, непосредственно связанная с ароматической системой в соединении (III), либо отделенная от нее углеводородной цепью из трех атомов в структурах (I) и (II). Соединение I относится к сульфидам и представляет собой удвоенную структуру II.

Методом ХЛ была определена величина константы элементарной реакции АО с пероксильными радикалами (реакция 7, согласно общепринятой схемы) и фактор ингибирования f ,



показывающий количество свободных радикалов, реагирующих с молекулой ингибитора. В одних и тех же условиях исследована антирадикальная активность СО-3 (I), дибунола (IV), α -ТФ (V). Показано, что вещества проявляют высокую активность. Величина константы K_7 оказалась сравнимой для СО-3 и дибунола и составляла $1,3 \times 10^4 \text{ M}^{-1} \times \text{с}^{-1}$ и $1,4 \times 10^4 \text{ M}^{-1} \times \text{с}^{-1}$ соответственно. Для α -ТФ величина K_7 была выше более чем в 250 раз и имела значение $3,6 \times 10^6 \text{ M}^{-1} \times \text{с}^{-1}$. Антирадикальную активность АО принято оценивать величиной $K_7 \times C$. Видно, что α -ТФ в реакции с пероксильными радикалами среди изучаемых соединений наиболее эффективен.

Стехиометрический коэффициент f для дибунола и α -ТФ как и для большинства известных АО равнялся 2, а для СО-3 он был близок к 4,0 ($f=3,7$). Таким образом, на молекуле СО-3 погибают в среднем 4 свободных радикала. Высокое значение f обусловлено наличием в молекуле двух реакционных центров, взаимодействующих со свободными радикалами независимо друг от друга.

Изучение действия АО в системе окисления метилолеата показало, что все вещества достаточно эффективно тормозят этот процесс, а СО-3 превосходит по своему действию такой сильный реперный ингибитор как дибунол (IV) (рис. 1).

Из рис. 1 видно, что при равных концентрациях СО-3 (I) обеспечивает более высокие периоды торможения, чем (II), что, очевидно, связано с «удвоением» структуры (II) в молекуле (I). При этом каждый реакционный центр, как было показано выше, проявляет ингибирующее действие.

Обращает на себя внимание тот факт, что удаление меркапто-группы от бензольного кольца не снижает, а напротив, увеличивает эффективность действия АО (II). Таким образом, отсутствие π - p -сопряжения между бензольным ядром и меркапто-группой способствует усилению действия АО. Эти данные указывают на то, что различные фрагменты молекул, по всей вероятности, действуют по разным механизмам. Возможно, ароматическая SH-группа более эффективно взаимодействует с пероксильными радикалами, а алкильная SH-группа преимущественно разрушает гидропероксиды.

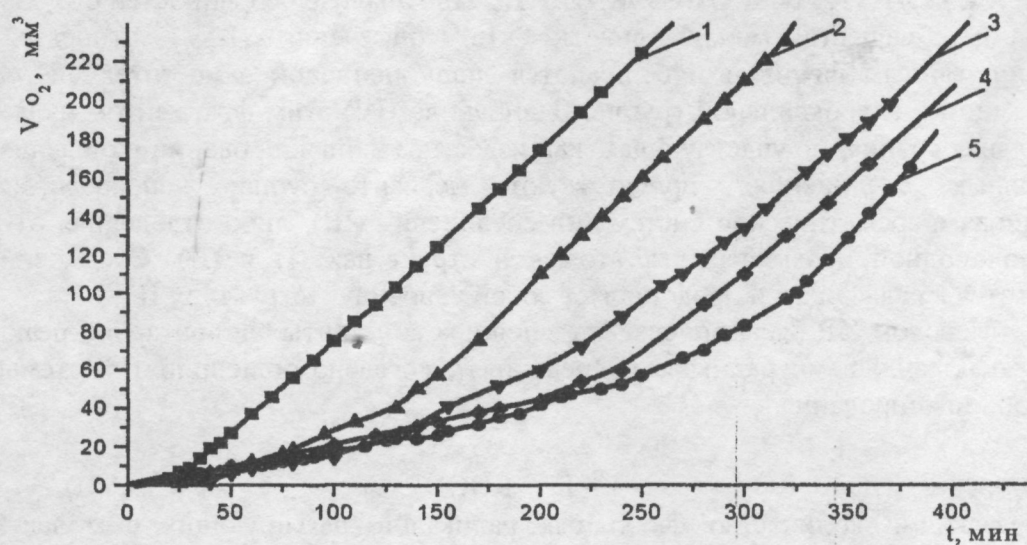


Рисунок 1.

Кинетические кривые поглощения кислорода метилолеатом (МО) (1); МО в присутствии равных концентраций (2×10^{-4} М) разных АО: III (2); II (3); IV (4); I (5). $T = 60^\circ\text{C}$, $C_{\text{АИБН}} = 3 \times 10^{-3}$ М.

Для подтверждения рабочей гипотезы были проведены эксперименты по разрушению ROOH в присутствии соединений I, II, и III (рис. 2).

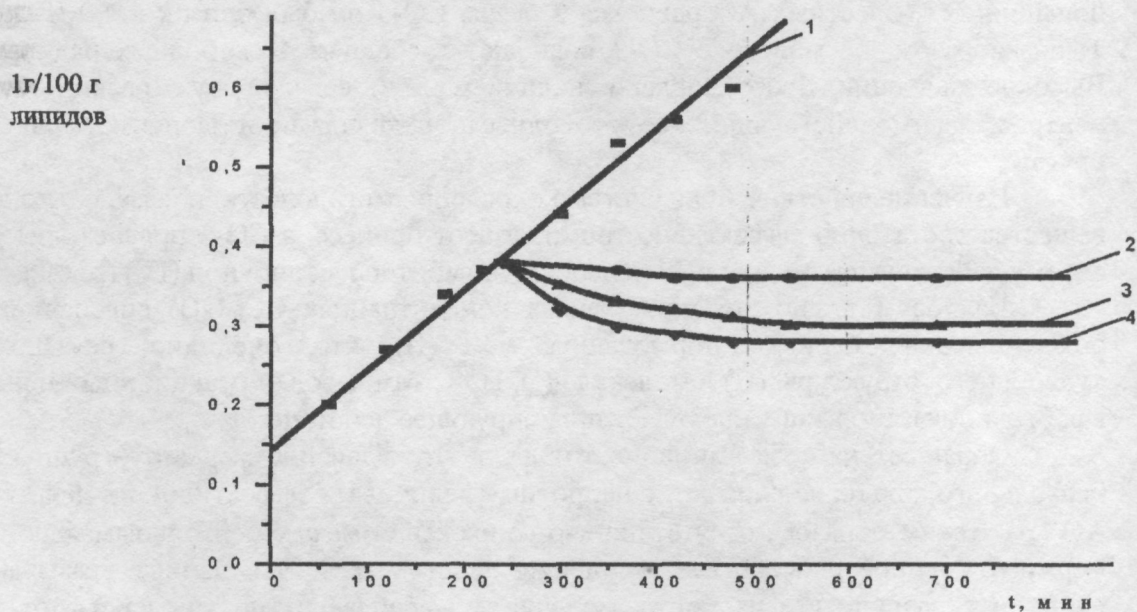


Рисунок 2.

Кинетические кривые накопления гидропероксидов при аутоокислении МО (1) в присутствии равных концентраций ($C = 6 \times 10^{-4}$ М) различных АО: III (2); I (3); II (4); $T = 60^\circ\text{C}$.

Из рис. 2 видно, что при введении в систему окисления веществ I, II, III происходит снижение исходной концентрации гидропероксидов, в дальнейшем их уровень в течение длительного времени остается на низком уровне, тогда как в контроле пероксиды продолжают накапливаться. Наиболее эффективным разрушителем гидропероксидов является вещество II, у которого группа $-SH$ отделена от бензольного ядра цепью из трех углеродных атомов (табл. 1).

Таблица 1. Величины начальной, максимальной скоростей поглощения кислорода при инициированном окислении, разрушения гидропероксидов при аутоокислении МО в присутствии соединений I, II, III ($C_{(AO)} = \text{const} = 2 \times 10^{-4} \text{ M}$). $T = 60^\circ \text{ C}$.

№ п/п	Состав	Инициированное окисление, $C_{(AIBN)} = 3 \times 10^{-3} \text{ M}$		аутоокисление		Процент разрушения ROOH за 7 час
		$W_{O_2 \text{ нач}} \times 10^{-7} \text{ M}^{-1} \text{ c}$	$W_{O_2 \text{ макс}} \times 10^{-7} \text{ M}^{-1} \text{ c}$	$W_{\text{накопл}} \times 10^{-4}, \text{ г I}_2 / 100 \text{ г лип.} \times \text{c}^{-1}$	$W_{\text{разруш.}} \times 10^{-4}, \text{ г I}_2 / 100 \text{ г лип.} \times \text{c}^{-1}$	
1	МО (контроль)	2,50	12,50	8,9	-	-
2	МО + I	1,60	8,10	-	1,7	38,8
3	МО + II	2,40	6,30	-	4,4	46,3
4	МО + III	2,10	5,75	-	1,1	33,3

Таким образом, полученные данные свидетельствуют об участии соединений I, II, III в разрушении первичных продуктов окисления. Распад гидропероксидов сопровождается, по всей вероятности, образованием продуктов нерадикальной природы, поэтому вторичного инициирования окисления не происходит. С этими свойствами веществ I, II, III связано снижение в их присутствии начальной и максимальной скорости поглощения кислорода по сравнению с контролем (табл. 1).

Следовательно, исследуемые соединения в процессе окисления способны эффективно уничтожать пероксильные радикалы и разрушать гидропероксиды молекулярным путем.

В последние годы для некоторых природных АО установлены дозозависимые эффекты при использовании соединений как *in vitro*, так и *in vivo*, показана возможность инверсии антиоксидантного действия на прооксидантное [11-14]. В связи с этим нами детально изучалась зависимость изменения величины периодов индукции от концентрации исследуемых серусодержащих АО в сравнении с α -ТФ и дибунолом (рис.3).

Из рис. 3 следует, что для всех серусодержащих АО и дибунола лаг-периоды возрастают прямо пропорционально количеству ингибитора, тогда как для α -ТФ зависимость носит экстремальный характер. При сравнимой концентрации (например, $5 \times 10^{-4} \text{ M}$) эффективность АО возрастает в ряду: III < V < II < IV < I.

Указанные данные подтверждают наличие упомянутой выше взаимосвязи между строением и АОА соединений. Наиболее эффективными АО являются СО-3 и дибунол. Для СО-3 величина периодов индукции при сравнимых концентрациях практически в 2 раза выше, чем у II (очевидно, за счет "удвоения" структуры) и в 3 раза выше чем у III, в молекуле которого происходит π -р сопряжение электронов бензольного кольца и SH- группы.

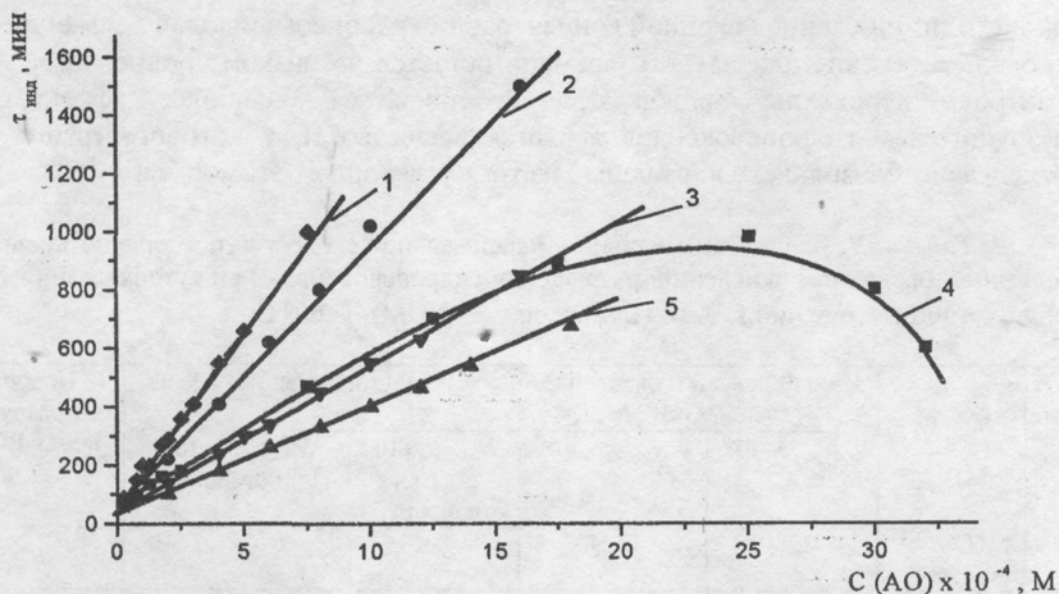


Рисунок 3

Зависимость изменения τ индукции окисления МО от концентрации I (СО-3) (1); IV (дибунол) (2); II (3); V (α -ТФ) (4); III (5). $T = 60^\circ\text{C}$, $C_{\text{АИБН}} = 3 \times 10^{-3}\text{M}$.

Таким образом, исследуемые синтетические серусодержащие ингибиторы либо близки (II), либо превосходят (I - СО-3) по своему действию природный АО - α -ТФ (рис.3). В силу высокой эффективности и низкой токсичности указанные АО имеют перспективы широкого практического применения в пищевой технологии, медицине, косметологии.

Таблица 2. Зависимость величины синергического эффекта от концентрации α -ТФ в смесях с равными концентрациями СО-3 ($C_{\text{СО-3}} = \text{const} = 2 \times 10^{-4}\text{M}$) и дибунола ($C_{\text{диб.}} = \text{const} = 4 \times 10^{-4}\text{M}$), субстрат окисления МО, $C_{\text{АИБН}} = 3 \times 10^{-3}\text{M}$, $T = 60^\circ\text{C}$

№ п/п	$C(\alpha\text{-ТФ}) \times 10^{-4}, \text{M}$	$\tau_{\text{ТФ}}, \text{мин}$	$\tau_{\text{адд}}, \text{мин}$		$\Sigma \tau_i, \text{мин}$		$\Delta \tau, \text{мин}$		$(\Delta \tau / \Sigma \tau_i) \times 100\%$	
			СО-3	ДИБ.	СО-3	ДИБ.	СО-3	ДИБ.	СО-3	ДИБ.
1	0,0	0,0	264	200	264	200	0,0	0,0	0,0	0,0
2	2,5	160	620	610	424	370	196	240	44,0	65,0
3	25,0	930	1980	-	1194	-	786	-	66,0	-

Обращает внимание, что лишь у одного из изучаемых веществ концентрационная зависимость носит экстремальный характер. Этим АО является природный α -ТФ. Обладая наиболее высокой антирадикальной активностью (K_7), это соединение образует при окислении достаточно активные α -токофероксильные радикалы, способные взаимодействовать с субстратом окисления (вступать в реакции продолжения цепей) [2, 15]. В силу этого ингибирующее действие α -ТФ в высоких концентрациях снижается. По всей вероятности, эти свойства α -ТФ имеют регуляторное значение и позволяют поддерживать стационарный уровень окисления *in vivo*. Накопление α -токофероксильных

радикалов при введении высоких доз α -ТФ провоцирует прооксидантный эффект. Поэтому, скорость окисления возрастает, что приводит к ускорению расходования АО, концентрация которого может быстро снизиться до оптимальной, обеспечивающей, как видно из рис. 3, максимальную эффективность ингибирования. Вследствие этого интенсивность окисления вернется к стационарному уровню. Существование концентрационной инверсии антиоксидантного действия было показано и для β -каротина как при окислении модельных систем [12, 13], так и в тканях *in vivo* [11, 14]. Механизм регулирования интенсивности неферментативного окисления в организме, как можно полагать, связан с особенностями действия важнейших эндогенных АО.

Тем не менее, существуют трудности прогнозирования антиоксидантного и фармакологического действия ингибиторов окисления при их длительном применении. Так, известен эффект онкотропии α -ТФ, показано, что опухолевые клетки кумулируют АО [16]. В связи с этим интенсивность окисления в опухолевых клетках по сравнению с нормой существенно снижена. Считают, что существует взаимосвязь между интенсивностью процессов окисления и скоростью деления клеток [16, 17]. В свете этих представлений и данных настоящей работы можно заключить, что неконтролируемое применение высоких доз α -ТФ должно быть курсовым, с тем чтобы в течение длительного времени не вызывать изменения стационарного состояния организма. Курсовое применение АО в качестве неспецифических средств терапии заболеваний, протекающих на фоне усиления процессов окисления, исключает возможность проявления негативных последствий, возможных при пролонгированном приеме высоких доз ингибиторов.

С целью обеспечения наиболее длительного хранения легкоокисляемых липидов *in vitro* α -ТФ целесообразно использовать при концентрациях, расположенных в области его максимальной эффективности. Оптимальными являются концентрации α -ТФ, составляющие 0,15-0,25% от массы субстрата.

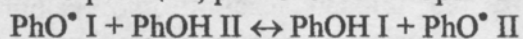
Известно, что синтетические АО используются для стабилизации окисления природных систем, исходно содержащих эндогенные ингибиторы окисления, например, α -ТФ. Поэтому, важно иметь представление о характере взаимодействия АО в процессе окисления, что позволит обосновать тактику их сочетанного применения, отыскать оптимальные количественные соотношения ингибиторов в смесях.

В бинарных композициях АО могут действовать независимо (аддитивность), усиливать (синергизм) либо ослаблять действие друг друга (антагонизм). В связи с этим была изучена эффективность сочетанного действия бинарных смесей СО-3 или дибунола с α -ТФ. Совместное действие АО сравнивалось с их прогнозируемым аддитивным эффектом, проявляющимся при использовании АО порознь. Было показано, что совместный ингибирующий эффект АО значительно превышает простую сумму периодов индукции индивидуальных компонентов, что свидетельствует о проявлении в их совместном действии эффекта синергизма (табл. 2). Синергизм в системе α -ТФ-дибунол был установлен ранее в работе [18]. В настоящем исследовании эффект синергизма при сочетанном применении данных АО был подтвержден, возможность проявления синергизма в действии бинарной смеси СО-3 - α -ТФ показана впервые.

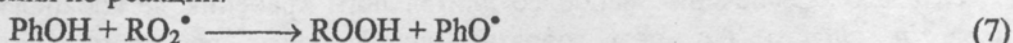
Нами изучена зависимость изменения величины эффекта синергизма от концентрации каждого из составляющих смеси (α -ТФ и СО-3) или (α -ТФ и дибунола). Установлено существование диапазонов, в которых эффективность смесей максимальна. Так, оптимальная область концентраций СО-3 соответствует интервалу $(1,5-2,0) \times 10^{-4}$ М, для дибунола – концентрации $4,0 \times 10^{-4}$ М (табл.2). При этих уровнях СО-3 или дибунола обеспечивается наибольший синергический эффект (65-66%). Величина синергизма увеличивается с ростом количества α -ТФ в смеси (табл.2).

Приведенные данные показывают, что экранированные фенолы образуют высокоэффективные синергические смеси с α -ТФ.

Механизм эффектов синергизма сводится, по всей вероятности, к следующему. В состав синергической композиции входит α -ТФ, представляющий собой фенол с высоким значением k_7 (PhOH I) и пространственно затрудненный АО (PhOH II) (СО-3 или дибунол), антирадикальная активность которых существенно ниже. Однако при окислении α -ТФ образуются достаточно активные токофероксильные радикалы [2, 19], а при окислении экранированных фенолов – неактивные феноксины [20-22]. На начальных стадиях окисления преимущественно расходуется более активный АО, но образующиеся при его окислении токофероксильные радикалы быстро обмениваются водородом с экранированным фенолом по реакции, равновесие которой сильно смещено вправо:



Таким образом происходит регенерация активной фенольной формы α -ТФ. Восстановленная форма более активного АО способна вновь обрывать цепи окисления по реакции:



Феноксины $\text{PhO}^\bullet \text{ II}$ вследствие своей малой активности в дальнейшем практически не участвуют в цепном процессе.

Полученные в работе данные создают методологическую основу для прогнозирования эффективности бинарных смесей АО разного строения.

Применение эффектов синергизма позволяет создавать высокоэффективные композиции АО. При этом ингибирование окисления может осуществляться низкими количествами ингибиторов, что особенно важно при стабилизации окисления лекарственных препаратов, пищевых продуктов, нутрицевтиков, косметических средств, применяемых длительное время.

ЛИТЕРАТУРА

1. Newas M.A., Nawal N.N. (1998) Am. J. Hypertens., **11** (12), 1480-1485.
2. Бурлакова Е.Б., Крашаков С.А., Храпова Н.Г. (1998) Биологические мембраны, **15** (2), 137-167.
3. Brigelius-Flohe R., Traber M.G. (1999) FASEB J., **13**, 1145-1155
4. Дегтярев И.А., Заиков Г.Е. (1992) Хим.-фарм. журнал, N 10, 1160-1168.
5. Тихазе А.К. (1999) Свободнорадикальное окисление липидов при атеросклерозе и антиоксидантная коррекция нарушений метаболизма липопероксидов. Автореф. дисс... д-ра мед. наук, М.
6. Yamamoto K., Fucuda N., Shiroy S., Shiotsuki Y., Nagata Y., Tani T., Sakai T. (1995) Ann. Nutr. Metab., **39** (2), 99-106.

7. *Просенко А.Е.* (2000) ω -(4-гидроксиарил)галогеналканы и серосодержащие антиоксиданты на их основе. Автореф....канд. хим. наук, Новосибирск.
8. *Сорокина Н.В., Латик А.С., Долгих М.П., Попова Л.Н.* (1987) Изв. СО РАН сер. Биол. науки, **1** (6), с.123-128.
9. *Сорокина И.В., Попова Л.Н., Долгих М.П., Орлова Т.Н., Толстикова Т.Г.* (1998) В сб.: Биоантиоксидант. М., с.173-174.
10. *Шлятинтох В.Я., Карпухин О.Н., Постников Л.М. и др.* (1972) Хемилюминесцентные методы исследования медленных химических процессов., М. Наука
11. *Ланкин В.З., Тихазе А.К., Коновалова Г.Г., Козаченко А.И.* (1999) Бюлл. эксп.биологии мед., **128** (9), 314-316.
12. *Сторожок Н.М., Кутузова И.В.* (1995) Хим. фарм. журнал, N12, 37-41.
13. *Сторожок Н.М., Кутузова И.В.* (1996) Вопросы мед. химии, **42** (1), 15-21.
14. *Albanes D.* (1999) Am. J. Clin. Nutr., **69** (6), 1345-1355.
15. *Nagaoka S., Okauchi Y., Urano S., Nagashima U., Mukai K.* (1990) J. Am. Chem. Soc., **112** (24), 8921-8924.
16. *Бурлакова Е.Б.* (1981) Биохимия липидов и их роль в обмене веществ. М., Наука.
17. *Эмануэль Н.М., Кавецкий Р.Е., Тарусов Б.Н., Сидорик Е.П.* (1976) Биофизика рака. Изд-во «Наукова думка», Киев.
18. *Пименова Н.С.* (1985) Механизм действия ряда антиоксидантов и стабилизация липидных витаминных препаратов. Дис.. канд. хим. наук. М.
19. *Mukai K., Okauchi Y.* (1989) Lipids, **24** (11), 936-939.
20. *Денисов Е.Т.,* (1973) Успехи химии, **42** (3), 361-390.
21. *Денисов Е.Т., Азатян В.В.* (1997) Ингибирование цепных реакций. Черноголовка.
22. *Рогинский В.А.* (1984) Фенольные антиоксиданты: реакционная способность и эффективность. М., Наука.

Поступила 23.04.01

ANTIOXIDANT ACTIVITY of NEW PROBUCOL ANALOGS AND THEIR INTERACTION WITH α -TOCOPHEROL

N.M. STOROZHOK¹, A.P. KRISIN², N.V. GUREEVA¹

¹Tyumen State Medical Academy, 625023, Tyumen, st Odesskaya, 52,
fax (3452) 22-62-00

Institute of Organic Chemistry SD RSA, 630090, Novosibirsk, av Lavrenteva, 9,
fax(3832)34-47-52

The antioxidant and antiradical activities of sulfur containing phenols which are analogues of probucol in comparison with α -tocopherol and BHT were tested using initiated methyl oleate oxidation model. The antioxidant effect linearly increased with increasing concentration of phenols. The ability of investigated phenols to destroy and reduced accumulation of hydroperoxides is revealed. The combined inhibitory effect of composition most effective researched antioxidant – CO-3 - with α -tocopherol for the first time are described.

Key words: α -tocopherol, substituted phenols, sulfurcontaining antioxidants.