

УДК 577.16

АНТИОКСИДАНТНЫЙ ПОТЕНЦИАЛ НЕКОТОРЫХ ПРИРОДНЫХ АЗОТСОДЕРЖАЩИХ СОЕДИНЕНИЙ

© 2008 г. В.А. Чистяков, К.В. Азарин, А.В. Усатов

Южный федеральный университет,
344006, Ростов н/Д, ул. Б. Садовая, 105,
Научно-исследовательский институт биологии,
344090, Ростов-на-Дону, Стачки, 194/1,
azkir@rambler.ru

Southern Federal University,
344006, Rostov-on-Don, B. Sadovaya St., 105,
Rostov Biology Research and Development Institute,
344090, Rostov-on-Don, Stachka, 194/1,
azkir@rambler.ru

Проведен сравнительный анализ антиоксидантной активности аллантина и мочевой кислоты. Урат способен более эффективно, чем аллантин, «перехватывать» супероксид анион, проявляя в то же время меньшую способность инактивировать свободнорадикальные продукты, ответственные за ДНК-повреждающую активность перекиси водорода.

Ключевые слова: антиоксидантная система, свободные радикалы, перекисные соединения, мочевая кислота, супероксид анион, аллантин.

The comparative analysis of antioxidant activity allantoin and uric acid were carried out in this research. Urate can more effectively than allantoin «intercept» superoxide anion, but at the same time urate showed less ability to inactivate free radicals responsible for the DNA-destructive activity of hydrogen peroxide.

Keywords: antioxidant system, free radicals, connections, uric acid, superoxide anion, allantoin.

Аэробные условия существования накладывают определенный отпечаток на метаболизм в целом. Основной причиной генотоксического эффекта гипероксии является формирование активных форм кислорода. Активные метаболиты кислорода способны взаимодействовать непосредственно с ДНК, повреждая дезоксирибозо-фосфатные и ДНК-белковые связи, модифицируя пуриновые и пиримидиновые основания. Многочисленными исследованиями было установлено, что окислительный стресс лежит в основе целого ряда патологических изменений иммунной, сердечно-сосудистой, дыхательной систем организма. Это всё приводит к преждевременному старению тканей и организма в целом. В ходе эволюции была создана сложная многокомпонентная антиоксидантная система, которая препятствует повреждающему действию свободных радикалов и перекисных соединений. Важными звеньями «неферментативной части» антиоксидантной системы, обеспечивающими адаптацию к воздействию разнообразных факторов, являются продукты катаболизма пуринов, в частности аллантин и мочевая кислота [1, 2]. Ранее сообщалось об обнаружении способности аллантина и урата подавлять развитие деструктивных процессов, вызываемых активными формами кислорода [1–3]. Изучение влияния аллантина и урата на активность свободных радикалов в модельных системах дополнит существующие знания об антиоксидантном потенциале метаболизма. Цель данной работы – исследование антиоксидантного потенциала аллантина и мочевой кислоты при помощи апробированной нами ранее методологии.

Материал и методы исследования

Антиоксидантную активность исследованных соединений *in vivo* оценивали по способности подав-

лять индуцированный перекисью водорода SOS-ответ клеток *E.coli*. Репортером SOS ответа служил Lux-оперон. Использовали штамм *E.coli* C600 (pPLS-1), несущий плазмиду pPLS-1, в которой оперон биоломинесценции находится под контролем SOS-промотора [2–4]. Для коррекции результатов использовали штамм C600(pPLS-5), Lux-оперон которого находится под контролем конститутивного промотора [5]. Штаммы *E.coli* выращивали на среде LBP. В 50 мл среды вносили 0,1 мл ночной культуры *E.coli* и инкубировали в термостате в течение одного часа при 37 °С. Растворы исследуемых веществ в необходимой концентрации (100 мкл) вводили в аликвоты культуры бактерий за 30 мин до перекиси водорода, которую добавляли до концентрации $3 \cdot 10^{-6}$ М. В контрольные варианты добавляли бидистиллят. Измерения интенсивности биоломинесценции культур проводили на люминометре ЛТ-01.

Фактор индукции определяли как отношение интенсивности свечения суспензии штамма pPLS-1, содержащей тестируемое соединение, к интенсивности контрольной пробы. Коэффициент подавления свечения определяли как интенсивность свечения суспензии штамма pPLS-5 с тестируемым соединением к интенсивности свечения контроля. Истинное значение степени индукции рассчитывали как отношение фактора индукции к коэффициенту подавления. Показатель антимутагенного потенциала (А, %) вычисляли по формуле: $A = (1 - I_a/I_p) \cdot 100$ %, где I_a – фактор индукции SOS-ответа перекисью водорода в присутствии антиоксиданта; I_p – фактор индукции SOS-ответа перекисью водорода.

Для определения способности исследуемых соединений подавлять генерацию $O_2^{\cdot -}$ использовали апробированную нами ранее методику [6]. К 2,9 мл 0,1 М би-

карбонатного буфера (рН 10,2) с 1мМ ЭДТА и 60 мкМ НСТ (нитросиний тетразолий) добавляли 0,1 мл раствора исследуемого вещества в 0,1 М бикарбонатном буфере (опыт), либо 0,1 мл вышеназванного буфера (контроль). Реакцию запускали добавлением 100 мМ раствора солянокислого гидроксилamina в воде до концентрации 1 мМ одновременно в контрольных и опытных пробах. Через 5 мин после запуска реакцию останавливали добавлением равного объема 1 М трис-НСI буфера рН 7,4, содержащего 1 % тритона X100. Экстинкцию определяли на спектрофотометре СФ-46 при длине волны 560 нм. Данные по супероксид-устраняющей активности (СУА) аминокислот пред-

ставляли в виде единиц активности супероксиддисмутазы, рассчитанных согласно Фридовичу [7].

$$СУА = (E_{560}^k - E_{560}^o) / E_{560}^o,$$

где СУА – супероксид-устраняющая активность в условных единицах; E_{560}^k – экстинкция контрольной пробы; E_{560}^o – экстинкция опытной пробы.

Результаты и их обсуждение

В табл. 1 показаны результаты влияния урата и аллантина на индуцированный перекисью водорода SOS-ответ клеток *E.coli*.

Таблица 1

Индукция SOS-ответа *E. coli* перекисью водорода в присутствии урата, аллантина

Концентрация, моль/л	Урат		Аллантоин	
	А, %	Фактор	А, %	Фактор
0	0	100 ± 1	0	100 ± 9,5
10 ⁻¹¹	-7	107 ± 23,2	40	60 ± 6,1
10 ⁻¹⁰	18	82 ± 5,1	74	26 ± 1,6
10 ⁻⁹	23	77 ± 1,4	73	27 ± 1,4
10 ⁻⁸	62	38 ± 3,4	75	25 ± 1,6
10 ⁻⁷	65	35 ± 4,4	80	20 ± 3,1
10 ⁻⁶	40	60 ± 5	84	16 ± 2,3
10 ⁻⁵	49	52 ± 11,7	85	15 ± 1,5
10 ⁻⁴	66	34 ± 10,2	93	6 ± 2,0
10 ⁻³	68	32 ± 6,8	64	36 ± 3,9

Эксперимент показал, что урат проявляет антиму-тагенную активность практически во всех вариантах опыта. Максимальная активность регистрируется для концентрации 10⁻³ М.

Максимальная активность аллантина регистрируется в концентрации 10⁻⁴ М. В отличие от урата его активность сохраняется и при малых концентрациях – 10⁻¹⁰ – 10⁻¹¹ М. Максимальное значение антиму-тагенной активности аллантина превышает аналогичный показатель для урата в 1,37 раза.

В табл. 2 представлены данные по СУА аллантина и мочевой кислоты. Для аллантина увеличение концентрации не приводит к достоверному росту СУА. Тогда как для урата обнаружена явная дозовая зависимость. Максимум СУА урат проявляет в концентрации 10⁻⁵ М, что соответствует физиологической концентрации в плазме крови человека. Это указывает на значительную роль мочевой кислоты в качестве клеточного протектора от активных форм кислорода, таких как супероксид-анион.

Как показали результаты проведенных экспериментов, урат способен более эффективно, чем аллантин, «перехватывать» супероксид-анион, проявляя в то же время меньшую способность инактивировать свободнорадикальные продукты, ответственные за ДНК-повреждающую активность перекиси водорода.

Мочевая кислота, как показано выше, является эффективным тушителем гидроксильных и супероксид-радикалов. С повышением концентрации урата вследствие *Uox*-мутаций [8, 9] связывают увеличение продолжительности жизни у человека и снижение уровня возрастных раковых заболеваний [1]. С другой стороны, в

результате атаки мочевой кислоты свободными радикалами образуется аллантин, обладающий свойствами антиоксиданта, антиму-тагена и витамина [2]. Таким образом, неферментативная генерация аллантина у видов, потерявших уриказную активность, может отражать развитие адаптационной составляющей окислительного стресса. В пользу этого предположения говорят данные по антиоксидантной активности смеси физиологических для плазмы человека концентраций аллантина и урата – 10⁻⁶ и 10⁻⁵ М соответственно.

Таблица 2

Супероксид-устраняющая активность

Концентрация, моль/л	Урат	Аллантоин
10 ⁻¹¹	0,087 ± 0,011	0,088 ± 0,012
10 ⁻¹⁰	0,060 ± 0,019	0,058 ± 0,0035
10 ⁻⁹	0,084 ± 0,012	0,069 ± 0,004
10 ⁻⁸	0,224 ± 0,016	0,089 ± 0,0024
10 ⁻⁷	0,309 ± 0,013	0,129 ± 0,012
10 ⁻⁶	0,339 ± 0,013	0,181 ± 0,011
10 ⁻⁵	0,401 ± 0,010	0,171 ± 0,0025
10 ⁻⁴	0,029 ± 0,007	0,137 ± 0,018

Из табл. 3 видно, что смесь низкомолекулярных продуктов деградации пуринов проявляет *in vivo* способность подавлять генотоксическое действие перекиси водорода.

Причём, несмотря на то, что содержание аллантина составляло всего десятую часть от урата, процент уменьшения генотоксической активности перекиси

водорода в присутствии смеси выше, чем только в присутствии мочевой кислоты (табл. 1, 3).

Таблица 3

Индукция SOS-ответа *E. coli* перекисью водорода в присутствии урата и аллантина

Концентрация, моль/л	A, %	Фактор
0	–	128 ± 8,2
10 ⁻⁵ +10 ⁻⁶	65	45 ± 4,3

Подобный эффект синергизма при совместном действии антиоксидантов в физиологических концентрациях согласуется с представлениями, что биоантиоксиданты наиболее эффективны в составе природных смесей. Значение СУА смеси достоверно не отличается от такового для урата – 0,386 ± 0,014. В организме существует целый ряд взаимосвязанных антиоксидантных систем, основная роль которых заключается в поддержании гомеостаза клеток и тканей при разнообразных экстремальных факторах, обладающих прооксидантными свойствами. Поэтому проблема совместного действия антиоксидантов требует дальнейших исследований.

Полученные в этой работе данные позволяют рационально оценить место урата и аллантина в системе антиоксидантной защиты. Низкомолекулярные антимутагены – это лишь часть системы защиты от ДНК-тропных воздействий. Но эта часть отражает эволюционное развитие метаболизма, сложившегося в аэробных условиях и несущего определенную антиоксидантную нагрузку. Совокупность таких антиоксидантов, как мочевая кислота и аллантин, вносит вклад в

общий антиоксидантный пул метаболизма, величина которого имеет важнейшее адаптивное значение.

Литература

1. Ames B.N., Cathcart R., Schwiers E., Hochstein P. Uric acid provides an antioxidant defense in humans against oxidant- and radical-caused aging and cancer: a hypothesis // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1981. Vol. 11. P. 6858–6862.
2. Гуськов Е.П. и др. Аллантин как тушитель свободных радикалов // Докл. АН. Серия биохимия, биофизика. 2002. Т. 383. № 2. С. 105–107.
3. Гуськов Е.П. и др. Аллантин как витамин. // Докл. АН. 2004. № 6. С. 1–6.
4. Птицын Л.П. Биоломинесцентный анализ SOS-ответа клеток *Escherichia coli*. // Генетика // Генетика. 1996. № 3. С. 354–358.
5. Сазыкина М.А., Чистяков В.А., Войнова Н.В. Способ определения генотоксичности химических веществ. // Патент РФ № 2179581. 2001.
6. Чистяков В.А. и др. Супероксидустраняющая активность некоторых аминокислот в водных растворах. // Биофизика 2005. Т. 50. № 4. С. 601–605.
7. Imlay J.A., Fridovich I.J. // Biol. Chem. 1991. Vol. 226. P. 6957–6965.
8. Oda M. et al. Loss of urate oxidase activity in hominoids and its evolutionary implications // Molecular Biology and Evolution. 2002. Vol. 19. P. 640–653
9. Wu X. et al. Two independent mutational events in the loss of urate oxidase during hominoid evolution. // J. Mol. Evol. 1992. Vol. 34. P. 78–84.

Поступила в редакцию

18 декабря 2007 г.