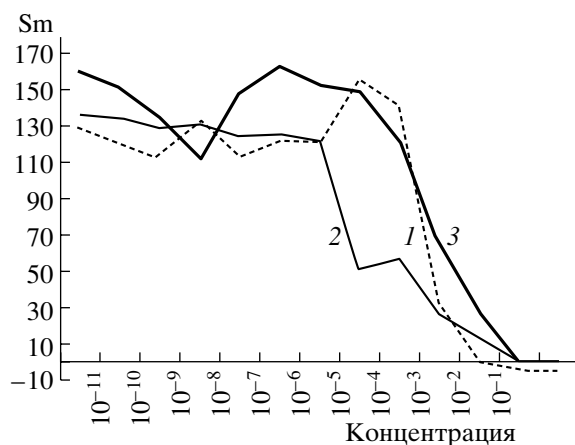


**Рис. 1.** Суммарные энергетические эффекты модельных реакций (1) и (2).  $E_{отн}$  – относительные энергии. Расчеты эффектов сольватации проведены по схеме [6]. За начало отсчета приняты суммарные энергии реагентов в (1) и (2) в водной среде.

ления  $Fe^{2+}$ -индуцированной ХЛ применяли в качестве активатора флуоресцирующий краситель родамин 6Ж. Хемилюминесцентный анализ проводили по ранее описанной методике [3].

Результаты интенсивности ХЛ представлены на рис. 2. Как следует из полученных данных, витамин С в конечной концентрации от  $10^{-5}$  до  $10^{-6}$  М увеличивает  $Fe^{2+}$ -индуцированную ХЛ на 30% по сравнению с концентрацией  $10^{-7}$  М. В концентрациях выше  $10^{-5}$  М аскорбиновая кислота выступает в качестве тушителя ХЛ-реакции и снижает ее интенсивность до уровня фона. В концентрациях от  $10^{-7}$  до  $10^{-12}$  М влияние аскорбиновой кислоты на  $Fe^{2+}$ -зависимое свободнорадикальное окисление липопротеидов выявлено не было, за исключением концентрации, равной  $10^{-10}$  М. Таким образом, аскорбиновая кислота в данной постановке эксперимента проявила себя как антиоксидант в концентрациях до  $10^{-5}$  М, в концентрациях  $10^{-5}$ – $10^{-6}$  М как прооксидант, а в концентрации ниже  $10^{-7}$  М не оказывала существенного влияния на  $Fe^{2+}$ -индуцированную ХЛ, за исключением подъема свечения при  $10^{-10}$  М. Данная концентрация, а именно  $10^{-10}$ – $10^{-11}$  М оказалась значимой и для других исследованных препаратов.

Аллантоин в конечной концентрации  $10^{-11}$  М снижал интенсивность ХЛ-реакции на 12%. Это снижение наблюдали при повышении его концентрации вплоть до  $10^{-6}$  М, при которой оно достигает 19%. Концентрации аллантоина выше  $10^{-5}$  М не влияли на эффект свободнорадикальных процессов (СРП), индуцированных  $Fe^{2+}$ . ПАБК, подобно аскорбиновой кислоте, в конечных концентрациях от  $10^{-1}$  до  $10^{-5}$  М практически полностью ингибировали хемилюминесцентный ответ ЖЛП. В концентрациях от  $10^{-6}$  до  $10^{-9}$  М интенсивность



**Рис. 2.** Интенсивность светосуммы ( $Sm$ )  $Fe^{2+}$ -индуцированной ХЛ желточных липопротеидов в присутствии аскорбиновой кислоты, аллантоина и ПАБК. Выражено в импульсах за 500 с свечения.

1 – аскорбиновая кислота + аллантоин, 2 – ПАБК, 3 – аллантоин + ПАБК.

свечения пробы ЖЛП практически не отличалась от контроля. Однако при конечной концентрации ПАБК в пробе, равной  $10^{-10}$  М, выявлено снижение ХЛ-ответа на 29% по сравнению с контролем.

Применение смеси аллантоина и ПАБК в равных молярных отношениях показало, что мощный антиоксидантный эффект выявляется при их конечных концентрациях от  $10^{-6}$  до  $10^{-7}$  М, интенсивность хемилюминесценции в 3 раза снижается по сравнению с теми же концентрациями каждого из препаратов отдельно. В концентрациях ниже  $10^{-7}$  М свечение стабилизируется на уровне контроля. Таким образом, несмотря на то, что в концентрации  $10^{-6}$  М ПАБК не оказывал антиоксидантного эффекта, а эффект аллантоина не очень значителен (19%), применение смеси данных препаратов позволяет уменьшить интенсивность СРП, индуцированных ионами  $Fe^{2+}$  в суспензии желточных липопротеидов, на 63%. Это подтверждает наше предположение о том, что в системе аллантоин-ПАБК *n*-аминобензойная кислота может выступать в качестве донора электрона для аллантоина и тем самым поддерживать шунтирующий антиоксидантный эффект аллантоина.

Влияние аллантоина на уровень активности репарационных систем *in vivo* оценивали методом биолюминесцентного анализа SOS-ответа клеток *E. coli*, индуцированного перекисью водорода. Использовали штамм *E. coli* С600(pPLS-1), несущий плазмиду pPLS, содержащую *lux*-оперон под контролем SOS-промотора [7]. Повреждение ДНК-тестерного штамма ведет к индукции свечения.

Для коррекции артефактов, связанных с подавлением активности люциферазы, мы использовали дополнительный штамм РТ-5 (С600(pPLS5)), генотип которого аналогичен SOS-*lux*-штамму, но *lux*-

оперон находится под контролем конститутивного промотора [8]. Дополнительный штамм позволяет оценить, как изменяется активность люциферазы за счет механизмов, не связанных с индукцией фермента, что делает возможным расчет соответствующего коэффициента коррекции. Операции с обоими штаммами проводили параллельно.

Раствор аллантаина необходимой концентрации (100 мкл) вводили в суспензию бактерий за 30 мин до перекиси водорода, которую добавляли до концентрации  $2 \cdot 10^{-5}$  М, вызывающей эффективную SOS-индукцию [7]. В контрольные варианты добавляли бидистилла. Измерение интенсивности биолюминесценции культур, содержащих анализируемые соединения, и контрольных культур проводили на люминометре ЛТ-01(Россия).

Степень индукции (фактор индукции) определяли как отношение интенсивности свечения суспензии SOS-*lux*-штамма (PT-1), содержащей тестируемое соединение ( $L_c$ ), к интенсивности свечения контрольной суспензии SOS-*lux*-штамма ( $L_k$ ):  $I = L_c/L_k$ . Коэффициент подавления свечения определяли как отношение интенсивности свечения суспензии *lux*-штамма (PT-5) в присутствии тестируемого соединения ( $l_c$ ) к интенсивности свечения контрольной суспензии этого штамма ( $l_k$ ),  $K = l_c/l_k$ . Истинные значения фактора индукции рассчитывали по формуле:  $I = I/K$ , где  $I$  – фактор индукции,  $K$  – коэффициент подавления. Показатель антимуtagenного потенциала ( $A$ , %) рассчитывали как процент уменьшения генотоксической активности перекиси водорода в присутствии изучаемой пробы.

Результаты по влиянию исследованных соединений на индуцированный перекисью водорода SOS-ответ представлены в табл. 1. Эксперименты показали, что оба вещества проявляют антимуtagenную активность в использованной системе. При этом максимальная активность регистрируется для аллантаина в концентрации  $10^{-4}$  М, а для аскорбата  $10^{-2}$  М. Кроме того, антимуtagenная активность аллантаина сохраняется и при его малых концентрациях, в которых аскорбат начинает усиливать SOS-индукцию, вызванную перекисью. Таким образом, оба исследованные соединения обладают способностью подавлять генотоксическое действие перекиси водорода.

Антимуtagenное действие аллантаина было изучено на луке *Allium* сера L. после обработки проросших корешков перекисью водорода. В опытах использованы семена сорта Луганский 2-годового срока хранения. Семена проращивали в чашках Петри на фильтровальной бумаге, в термостате при 25°C. Проростки на 5-е сутки прорастания обрабатывали растворами аллантаина различных концентраций ( $10^{-7}$ – $10^{-2}$  М) в течении одного ч при 25°C. Затем проростки промывали и обрабатывали 1 ч – 0.05 М раствором перекиси водорода.

**Таблица 1.** Индукция SOS-ответа *E. coli* перекисью водорода в присутствии аллантаина и аскорбиновой кислоты

Концентрация витаминов, М	Аллантаин		Аскорбат	
	A, %	Фактор индукции	A, %	Фактор индукции
0		141 ± 9.0		158 ± 11.2
$10^{-12}$	39	83 ± 5.2	-403	638 ± 40.7
$10^{-11}$	36	92 ± 8.5	-120.5	190 ± 12.6
$10^{-10}$	75	37 ± 2.2	-140	221 ± 24.2
$10^{-9}$	75	37 ± 2.2	-226	356 ± 41.3
$10^{-8}$	75	37 ± 2.2	40	95 ± 6.3
$10^{-7}$	86	22 ± 3.1	54	73 ± 6.4
$10^{-6}$	82	24 ± 3.2	50	79 ± 5.6
$10^{-5}$	86	22 ± 2.1	65.5	55 ± 4.2
$10^{-4}$	93	9 ± 2.8	49	80 ± 7.1
$10^{-3}$	64	51 ± 5.4	73	43 ± 3.3
$10^{-2}$	75	35 ± 3.3	95.5	7 ± 1.2

да. Далее корешки промывали и продолжали проращивать 18 и 42 ч с последующей фиксацией в ацетоалкоголе. В клетках корневой меристемы регистрировали митотический индекс и уровень aberrаций хромосом (АХр) с помощью анафазно-телофазного метода. Клеточный цикл у *A. сера* длится 24 ч; таким образом, анализ aberrаций хромосом проводили на первых и вторых митозах после обработки.

Как видно из табл. 2, перекись водорода при фиксации проростков через 18 ч после обработки снижает частоту клеточных делений ( $p < 0.01$ ) и повышает долю aberrантных клеток ( $p < 0.001$ ). При фиксации проростков через 42 ч после воздействия  $H_2O_2$  нет отличия от контроля; однако уровень aberrаций хромосом более чем в 4 раза превышает спонтанный ( $p < 0.001$ ).

Обработка проростков лука аллантаином в концентрации  $10^{-6}$ – $10^{-5}$  М (фиксация через 18 ч) достоверно ( $p < 0.001$ ) снижает уровень АХр, индуцированный перекисью водорода. В пределах этих концентраций отмечена тенденция ( $p < 0.01$ ) к нормализации митотического индекса. Через 42 ч после действия перекиси водорода уровень АХр снижается, если проростки были предварительно обработаны аллантаином в концентрации  $10^{-6}$ ,  $10^{-5}$ ,  $10^{-3}$  М.

Таким образом, аллантаин даже в очень высоких концентрациях не оказывает ни цитотоксического, ни цитостатического эффектов, а антимуtagenным действием обладают концентрации, соответствующие физиологическим дозам его содержания в плазме крови человека, –  $6.5 \cdot 10^{-6}$  М.

**Таблица 2.** Цитогенетические последствия в клетках корневой меристемы лука после обработки аллантином и перекисью водорода

Вариант	Число анафаз	Из них с АХр	АХр, %	<i>P</i>	Митотический индекс, %	<i>P</i>
Контроль	1156	18	1.5 ± 0.35		8.48 ± 0.83	
Через 18 ч после обработки H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>						
0.05 М H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	1142	73	6.39 ± 0.72	<i>P</i> <sub>1</sub> < 0.001	6.32 ± 0.41	<i>P</i> <sub>1</sub> < 0.01
Алл 10 <sup>-2</sup> М + + 0.05 М H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	560	43	7.68 ± 1.12	<i>P</i> <sub>1</sub> < 0.001 <i>P</i> <sub>2</sub> > 0.1	6.51 ± 0.74	<i>P</i> <sub>1</sub> < 0.05 <i>P</i> <sub>2</sub> > 0.1
Алл 10 <sup>-3</sup> М + + 0.05 М H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	571	32	5.60 ± 0.96	<i>P</i> <sub>1</sub> < 0.001 <i>P</i> <sub>2</sub> > 0.1	5.60 ± 0.65	<i>P</i> <sub>1</sub> < 0.01 <i>P</i> <sub>2</sub> > 0.1
Алл 10 <sup>-4</sup> М + + 0.05 М H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	1095	57	5.20 ± 0.67	<i>P</i> <sub>1</sub> < 0.001 <i>P</i> <sub>2</sub> > 0.1	7.15 ± 0.67	<i>P</i> <sub>1</sub> > 0.1 <i>P</i> <sub>2</sub> > 0.1
Алл 10 <sup>-5</sup> М + + 0.05 М H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	937	27	2.88 ± 0.55	<i>P</i> <sub>1</sub> < 0.05 <i>P</i> <sub>2</sub> < 0.001	8.30 ± 0.77	<i>P</i> <sub>1</sub> > 0.1 <i>P</i> <sub>2</sub> < 0.01
Алл 10 <sup>-6</sup> М + + 0.05 М H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	1054	33	3.13 ± 0.55	<i>P</i> <sub>1</sub> < 0.01 <i>P</i> <sub>2</sub> < 0.001	8.20 ± 0.84	<i>P</i> <sub>1</sub> > 0.1 <i>P</i> <sub>2</sub> < 0.01
Алл 10 <sup>-7</sup> М + + 0.05 М H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	976	40	4.09 ± 0.63	<i>P</i> <sub>1</sub> < 0.01 <i>P</i> <sub>2</sub> < 0.001	8.50 ± 0.84	<i>P</i> <sub>1</sub> > 0.1 <i>P</i> <sub>2</sub> < 0.01
Через 48 ч после обработки H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>						
0.05 М H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	1090	77	7.06 ± 0.78	<i>P</i> <sub>1</sub> < 0.001	7.50 ± 0.91	
Алл 10 <sup>-2</sup> М + + 0.05 М H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	426	31	7.28 ± 1.26	<i>P</i> <sub>1</sub> < 0.001 <i>P</i> <sub>2</sub> > 0.1	7.45 ± 0.75	<i>P</i> <sub>1</sub> > 0.1 <i>P</i> <sub>2</sub> > 0.1
Алл 10 <sup>-3</sup> М + + 0.05 М H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	1234	51	4.13 ± 0.58	<i>P</i> <sub>1</sub> < 0.001 <i>P</i> <sub>2</sub> < 0.001	6.17 ± 0.74	<i>P</i> <sub>1</sub> < 0.5 <i>P</i> <sub>2</sub> > 0.1
Алл 10 <sup>-4</sup> М + + 0.05 М H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	938	53	5.39 ± 0.72	<i>P</i> <sub>1</sub> < 0.001 <i>P</i> <sub>2</sub> > 0.1	7.98 ± 0.72	<i>P</i> <sub>1</sub> > 0.1 <i>P</i> <sub>2</sub> > 0.1
Алл 10 <sup>-5</sup> М + + 0.05 М H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	869	37	4.26 ± 0.68	<i>P</i> <sub>1</sub> < 0.001 <i>P</i> <sub>2</sub> > 0.01	7.07 ± 0.25	<i>P</i> <sub>1</sub> > 0.1 <i>P</i> <sub>2</sub> > 0.1
Алл 10 <sup>-6</sup> М + + 0.05 М H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	1001	40	4.00 ± 0.62	<i>P</i> <sub>1</sub> < 0.001 <i>P</i> <sub>2</sub> < 0.001	7.74 ± 0.73	<i>P</i> <sub>1</sub> > 0.1 <i>P</i> <sub>2</sub> > 0.1

Примечание. *P*<sub>1</sub> – достоверные отличия по сравнению с контролем; *P*<sub>2</sub> – достоверные отличия по сравнению с вариантом, обработанным перекисью водорода. АХр – абберация хромосом.

Ранее было показано, что нарушение эмбриогенеза и патологические беременности у крупного рогатого скота связаны с недостатком аллантина: мутации гена *Uox* провоцируют гиперурикемию и уратнефропатию, и более половины мутантов погибают в возрасте до 4 недель [10].

Сходные результаты получены нами и для человека. Методом высокоэффективной жидкостной хроматографии [11] было определено содержание аллантина в гомогенатах тканей ворсинок хориона и плаценты, полученных при медицинском аборте у практически здоровых женщин (*n* = 35), при ранних (*n* = 10) и поздних (*n* = 10) самопроизвольных абортах, неразвивающейся беременности (*n* = 10). Содержание аллантина при физиологической беременности практически не изменяется от срока беременности, что наряду с незначительной вариабельностью этого показателя указывает на его физиологическую значимость (табл. 3). Неразвивающаяся беременность сопровождалась

статистически достоверным снижением уровня аллантина. Для ранних самопроизвольных абортов зарегистрировано повышение, а для поздних – почти двукратное понижение содержания аллантина, что хорошо согласуется с классической моделью динамики адаптивно значимых факторов при стрессе [12]. Вероятно, повышение содержания аллантина при самопроизвольном аборте свидетельствует о развитии выраженной гипоксии в плаценте, что создает предпосылки для активации свободнорадикального окисления и неферментативной деградации мочевой кислоты в аллантиин.

Аскорбиновая кислота, дефицит которой проявляется в подавлении ферментативного гидроксиглирования, при котором остатки пролина в коллагене соединительной ткани превращаются в производные 4-гидроксипролина, по биохимическим функциям отличается от аллантина тем, что его эффект менее специфичен и играет суще-

**Таблица 3.** Содержание аллантаина в плаценте в норме и при патологии беременности

Срок беременности	Тип патологии	Содержание аллантаина, мкмоль/г белка	<i>P</i>
Первый триместр	Контроль (физиологическая беременность)	5.18 + 0.13	<0.001
	Неразвивающаяся беременность	4.21 + 0.14	
	Ранний самоаборт	6.54 + 0.42	
Второй триместр	Контроль (физиологическая беременность)	5.01 + 0.34	<0.001
	Поздний самоаборт	2.03 + 0.32	

ственную роль, главным образом, в коррекции адаптивного развития плода.

Очевидно, что аллантаин, не синтезирующийся в организме, но накапливающийся в избыточных концентрациях в плаценте приматов, по сравнению с другими тканями берет на себя ведущую роль барьера защиты плода от экстремальных по отношению к плоду источников свободных радикалов и является доминирующим антиоксидантом эмбриона. Складывается впечатление, что одной из специфических функций аллантаина является защита от окислительного стресса генетического аппарата, детоксикация токсичных продуктов в аллантаине и стабилизация клеточного цикла интенсивно пролиферирующих тканей. Именно с этим связаны его эмбриопротекторное действие и способность активировать регенеративные процессы. Быстрая пролиферация наблюдается также при выработке иммунного ответа. Если наше предположение верно, аллантаин может быть эффективным неспецифическим иммуностимулятором.

В этой связи, несмотря на недостаточную изученность роли аллантаина, мы полагаем, что данный продукт деградации пуриновых оснований может претендовать, подобно аскорбиновой кислоте, на роль биологически активного вещества – водорастворимого витамина, так как соответствует следующим параметрам:

- 1) не синтезируется у приматов;
- 2) является антиоксидантом;
- 3) проявляет свойства репарагена и модулирует активность ROS-ферментов;
- 4) сходен с витамином С по термодинамическим параметрам, антиоксидантным свойствам.

5) обеспечивает жизнеспособность развивающегося эмбриона млекопитающих.

Таким образом, аллантаин как экзогенный витамин является ведущим фактором адаптации онтогенеза приматов к внешней среде и эффективен как эндогенный доминирующий компонент защиты развивающегося эмбриона от активных форм кислорода.

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Haldane J.B.S.* // Nature. 1955. V. 176. № 4473. P. 169–170.
2. *Masako Oda, Yoko Satta, Osaumi Takenaka, Naoyuki Takahata* // Mol. Biol. Evolut. 2002. V. 19. № 5. P. 640–653.
3. *Гуськов Е.П., Клецкий М.Е., Корниенко И.В. и др.* // ДАН. 2002. Т. 383. №3. С. 105–107.
4. *Девис М., Остин Дж., Патридж Д.* Витамин С: Химия и биохимия. М.: Мир, 1999. 176 с.
5. *Гуськов Е.П., Шкурат Т.П., Милютин Н. и др.* // ДАН. 2001. Т. 379. № 3. С. 398–401.
6. *Miertus S., Scrocco E., Tomasi J.* // Chem. Phys. 1981. V. 55. P. 117–129.
7. *Птицын Л.А.* // Генетика. 1996. Т. 32. № 3. С. 354–355.
8. *Сазыкина М.А., Чистяков В.А., Войнова Н.В.* Пат. РФ № 2179581. // Изобр. полез. модели. 2002. № 5. Ч. 1. С. 193.
9. *Лакин Г.Ф.* Биометрия. М.: Высшая шк. 1980. 293 с.
10. *Wu X., Wakamiya M., Vaishnav S. et al.* // Proc. Nat. Acad. Sci. USA. 1994. V. 91. P. 742–746.
11. *Czauderna M., Kowalczyk J.* // J. Chromatogr. B. Biomed. Sci. 2000. V. 744. P. 129–138
12. *Selye H.* // Can. Med. Assoc. J. 1976. V. 115. № 1. P. 53–56.

