

АНТИПЕРОКСИРАДИКАЛЬНАЯ АКТИВНОСТЬ
ДИМЕТИЛСЕЛЕНОКСИДА

А. Д. СААКЯН, Л. А. АРУТЮНЯН и Л. А. ТАВАДЯН

Институт химической физики им. А.Б. Налбандяна
НАН Республики Армения
Армения, 0014, Ереван, ул. Паруйра Севака, 5/2
Факс: (374-10)297309 E-mail: tavadyan@ichph.sci.am

Поступило 19 VI 2012

Методом определения поглощающей емкости по отношению к кислородным радикалам (ORAC) выявлена антипероксирадикальная активность у диметилселеноксида (DMSeO). Антипероксирадикальная емкость DMSeO превышает эту величину для водорастворимого аналога (-токоферола – тролокса, и приближается к величине, определенной для бутилированного гидрокситолуола (BHT). Вольтамперометрическими методами циклической (ЦВ) и дифференциальной импульсной вольтамперометрии (ДИВ) определены редокс-характеристики DMSeO.

Выявленные анодные пики окисления DMSeO в интервале потенциалов -1200 ($+1500$ мВ относительно Ag/Ag^+ в среде CH_2Cl_2 подтверждают наличие у DMSeO антиоксидантной активности по отношению к окислителям – пероксильным радикалам.

Рис. 2, табл. 1, библи. ссылок 21.

В последние годы особое внимание привлекают селенсодержащие соединения в качестве антиоксидантов, регулирующих протекание свободно-радикальных превращений в организме, существенно влияя на его состояние [1-6]. Им отводится способность нейтрализовывать – «захватывать», свободные радикалы и другие реакционноспособные кислородсодержащие компоненты (РКК), которые в условиях их избыточной генерации вызывают многочисленные патологические состояния, так называемый окислительный стресс [7-11]. Оксоселеновые органические соединения в физиологических условиях образуются в результате двухэлектронного окисления селенорганических соединений как биогенного (селенометионин [12]), так и препаративного (эбселен

[13]) происхождения. Между тем, роль оксоселенорганических соединений как *in-vivo*, так и *in-vitro* условиях остается невыясненной.

В настоящей работе поставлена цель – исследовать антипероксирадикальную активность простого представителя оксоселенорганического соединения – диметилселеноксида (DMSeO). Эти результаты важны для предсказания антиоксидантной активности DMSeO в цепных свободнорадикальных реакциях пероксидного окисления липидов мембран клеток.

Экспериментальная часть

Материалы и методы

Реактивы. DMSeO синтезирован согласно методике, описанной в [14]. 2,2'-Азо-бис(2-амидинопропан)гидрохлорид (AAPH), 6-гидрокси-2,5,7,8-тетраметилхроман-2-карбоновая кислота (тролокс), 2,6-дитретбутил-4-метилфенол (BHT), двунатриевая соль флуоресцеина (F1) приобретены из химической компании Sigma-Aldrich (США). Тетрабутиламмоний перхлорат (ТВАР), нитрат серебра (AgNO_3), растворители – метиленхлорид (CH_2Cl_2), метанол (CH_3OH) (все из компании Sigma-Aldrich), очищались согласно методике, описанной в [15].

Метод определения поглощающей емкости по отношению к кислородным радикалам («Oxygen Radical Absorbption Capacity» ORAC) основан на измерении во времени интенсивности флуоресценции F1, связывающего кислородные радикалы [16, 17]. Антиоксиданты, вводимые в реакционную среду, замедляют расходование F1.

В методе ORAC использовался флуоресцентный спектрометр «Perkin-Elmer» с компьютерной регистрацией кинетики изменения интенсивности флуоресценции F1. Длины волн возбуждаемого и эмиссионного света равны 485 и 520 нм, соответственно. Количественное определение антипероксирадикальной активности – емкости исследуемых соединений, осуществлялось по площади между двумя кинетическими кривыми уменьшения интенсивности флуоресценции F1 в отсутствие и с добавлением антиоксидантов. В качестве стандартного антиоксиданта использовался водорастворимый аналог (-токоферола – тролокс. Значение антипероксирадикальной емкости – f_{ac} , определялось согласно следующему уравнению [16]:

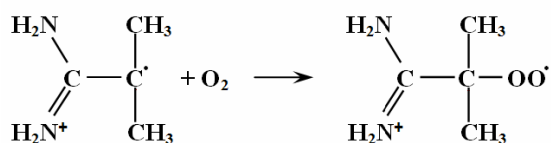
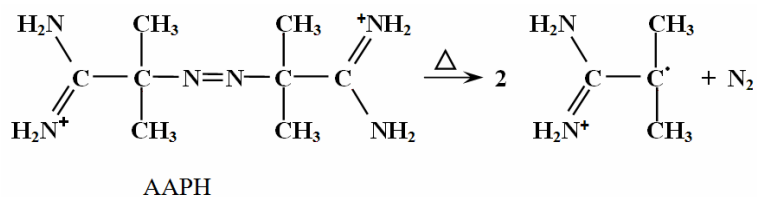
$$f_{ac} = \frac{(S_{AO} - S_o)M_{trolox}}{(S_{trolox} - S_o)M_{AO}} \times f_{trolox} \quad (1)$$

где S_o , S_{AO} и S_{trolox} – площади, ограниченные кинетическими кривыми уменьшения интенсивности флуоресценции в отсутствие и в присутствии исследуемого антиоксиданта и тролокса, соответственно; M_{trolox} ,

M_{AO} – молярные концентрации тролокса и антиоксиданта, соответственно; f_{trolox} – антипероксирадикальная емкость тролокса.

Интегрирование соответствующих площадей осуществлялось по закону трапеции с помощью компьютерной вычислительной программы Microcal Origin 6.0.

Пероксильные радикалы генерировались путем термического распада водорастворимого азосоединения AAPH при температуре 37°C по схеме:



Электрохимические измерения

Измерения циклической (ЦВ, CV) и дифференциальной импульсной (ДИВ, DPV) вольтамперометрии проводились на биоаналитическом комплексе (BAS – 100 B/W, США). ЦВ и ДИВ вольтамперограммы снимались с использованием трехэлектродной схемы, где в качестве рабочего электрода использовался стеклографитовый электрод сечением 0.09 см². Электрод очищался посредством пудры из Al₂O₃ перед каждым определением в течение 3 мин, электрод сравнения – хлорсеребряный, вспомогательный – платиновый электрод. В качестве фонового электролита использовался ТВАР концентрации 0.1 М в CH₂Cl₂. Концентрированный раствор DMSeO (5(10⁻³ М) приготавливался в метаноле.

В экспериментах исследуемый раствор насыщался азотом (99.99%) в течение 5 мин. Работа электрохимической аналитической системы проверялась с помощью эталонных растворов NaFe(CN)₆. Объем электрохимической ячейки составлял 10 мл, температура – 20°C±1°C, скорость развертки напряжения – 20 мВ/с, ЦВ и ДИВ вольтамперограммы снимались в диапазоне потенциалов -1200 (+1500 мВ).

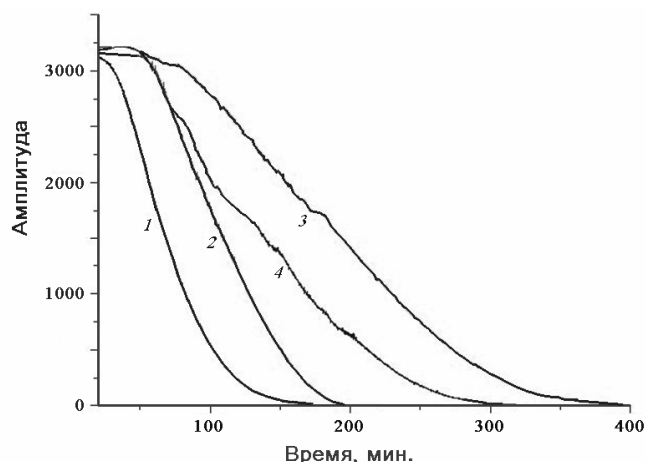


Рис. 1. Кинетические кривые уменьшения интенсивности флуоресценции F1 при 520 *нм* в результате реакции с пероксильными радикалами в отсутствие (1) и в присутствии антиоксидантов: тролокс (2), ВНТ (3) и DMSeO (4) при температуре 37°C. [AAPH]=5.1(10⁻² *М* (скорость зарождения радикалов $R=3.2(10^{-8}$ *Мс*⁻¹), [trolox]₀=2.1(10⁻⁶ *М*, [ВНТ]₀=2.63(10⁻⁸ *М*, [DMSeO]=1.66(10⁻⁸ *М*. Растворитель – деионизированная вода.

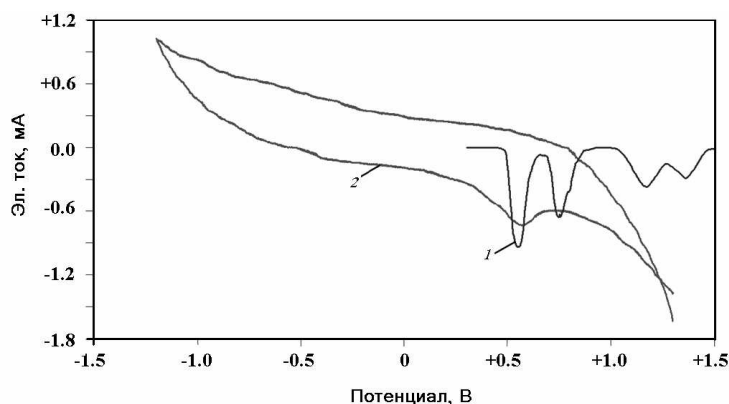


Рис. 2. Вольтамперограммы ЦВ и ДИВ для DMSeO концентрации 10⁻⁴ *М* в CH₂Cl₂. Температура – 20°C, скорость сканирования равна 20 *мВ*/(с⁻¹). В случае ДИВ амплитуда импульса составляет 50 *мВ*, длительность импульса – 50 *мс*, период импульса – 200 *мс*.

Результаты и их обсуждение

На рис. 1 представлены кинетические кривые уменьшения интенсивности флуоресцентного сигнала F1 при 520 *нм* в отсутствие и в присутствии антиоксидантов: DMSeO и в качестве сравнения тролокса и модельного антиоксиданта ВНТ. При добавлении образца антиоксиданта отчетливо заметен период индукции реакции – время, по истечении которого скорость расходования F1 заметно возрастает. Это свидетельствует об антипероксирадикальной активности всех трех исследуемых антиоксидантов, включая DMSeO. На основе кинетических данных

измеренные по уравнению (1) значения антипероксирадикальных емкостей DMSeO и ВНТ относительно тролоксового эквивалента ($f_{\text{ОТН,ТЕ}} = f_{\text{АО}} / f_{\text{троlox}}$) представлены в таблице.

Таблица

Антипероксирадикальная емкость ($f_{\text{ОТН,ТЕ}}$) антиоксидантов относительно тролоксового эквивалента

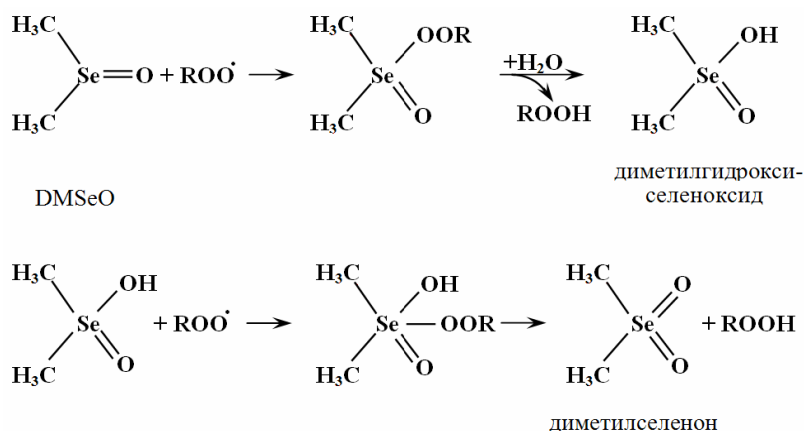
Антиоксидант	$f_{\text{ОТН,ТЕ}}$
DMSeO	1.84
ВНТ	2.08

Как следует из данных рис. 1 и таблицы, антипероксирадикальная активность DMSeO, выраженная в данном случае в виде антипероксирадикальной емкости $f_{\text{ОТН,ТЕ}}$, превышает это значение для тролокса и приближается по величине для ВНТ.

Для оценки антирадикальной активности DMSeO мы также обратились к электроаналитическим методам ЦВ и ДИВ, широко используемым для этих целей [18-20].

На вольтамперограмме ДИВ, представленной на рис. 2, отчетливо наблюдаются четыре пика окисления: первый – при $E = 548$, второй – при $E = 756$, третий – при $E = 1172$ и четвертый – при $E = 1360$ мВ относительно Ag/Ag⁺. На вольтамперограмме ЦВ на анодной ветви зарегистрирован необратимый пик окисления (отсутствует обратный катодный пик) при $E = 567$ мВ относительно Ag/Ag⁺. Значение потенциалов пиков окисления вплоть до значений E (1 мВ свидетельствует о достаточно выраженных восстановительных свойствах DMSeO, что характерно для антиоксидантов, действующих по механизму обрыва цепи реакций пероксидного окисления липидов. Так, для таких антиоксидантов, какими являются α -токоферол и ВНТ, значения потенциалов характерных анодных пиков равны 550 [21] и 818 мВ (измерены в настоящей работе) относительно Ag/Ag⁺, соответственно. Полученные результаты электроаналитических исследований DMSeO находятся в хорошем согласии с данными антипероксирадикальной активности DMSeO, выявленной методом ORAC.

Антипероксирадикальное действие DMSeO можно представить совокупностью последовательных реакций одноэлектронного окисления атома Se-а пероксильными радикалами:



Таким образом, методом ORAC выявлена антипероксирадикальная активность у простого представителя оксиселенорганического соединения – DMSeO. Антипероксирадикальная емкость DMSeO превышает таковую для водорастворимого аналога (α-токоферола – тролокса, и приближается к величине, определенной для ВНТ. Вольтамперометрическими методами ЦВ и ДИВ определенные количественные редокс-характеристики DMSeO – значения потенциалов анодных пиков окисления, объясняют наличие антирадикальной активности у DMSeO. Предполагается, что оксоселенорганические соединения *in vivo* могут выступать в качестве антиоксидантов по механизму антипероксирадикального действия.

Авторы выражают благодарность Г. Г. Мкряну и Н. Г. Мкряну за химический синтез DMSeO, а также КН МОН РА за финансирование работы по гранту N 11-1d226, 2011 г.

ԴՄՍԵՕ-Ի ՍԵԼԵՆՕՐԳԱՆԻԿ ՀԱՎԱՊԵՐՕՔՍԻՌԱԴԻԿԱԼ ԱՎՏԻՎՈՒԹՅՈՒՆԸ

Ա. Դ. ՄԱՀԱԿՅԱՆ, Լ. Հ. ՀԱՐՈՒԹՅՈՒՆՅԱՆ և Լ. Ա. ԹԱՎԱԴՅԱՆ

Թթվածնային ռադիկալների նկատմամբ կլանման տարողության որոշման եղանակով (ORAC) բացահայտվել է դիմեթիլսելենօքսիդի (ԴՄՍԵՕ) հակապերօքսիդանտային ակտիվությունը: ԴՄՍԵՕ-ի հակապերօքսիդանտային տարողությունը գերազանցում է (-տոկոֆերոլի ջրալուծ նմանակի՝ տրոլօքսի, այդ արժեքը և մոտենում է բուտիլացված հիդրօքսիտոլուոլի համար որոշված արժեքին:

ԴՄՍԵՕ-ի վերօքսիդացմանը որոշվել են ցիկլիկ և դիֆերենցիալ իմպուլսային վոլտամպերաչափական եղանակներով: ԴՄՍԵՕ-ի օքսիդացման անոդային պիկերի բացահայտված պոտենցիալները -1200(+1500 մՎ միջակայքում (ըստ Ag/Ag⁺(ջ)-ի՝ CH₂Cl₂-ի միջավայրում) հաստատում են օքսիդիչների՝ պերօքսիլային ռադիկալների նկատմամբ ԴՄՍԵՕ-ի հակաօքսիդիչ ակտիվության առկայությունը:

ANTIPEROXYRADICAL ACTIVITY OF DIMETHYLSELENOXIDE

A. D. SAHAKYAN, L. H. HARUTYUNYAN and L. A. TAVADYAN

A.B. Nalbandyan Institute of Chemical Physics NAS RA
5/2, P.Sevak Str., Yerevan, 0014, Armenia
E-mail: tavadyan@ichph.sci.am

Antiperoxyradical activity of the dimethyl selenoxide (DMSeO) was identified by the determination of absorbing capacity of oxygenic radicals (ORAC method). Antiperoxyradical capacity of DMSeO exceeds that of the water-soluble prototype of α -tocopherol, trolox, approaching the value determined for the butylated hydroxytoluene (BHT). Redox characteristics of DMSeO were determined by the use of voltamperometric methods: cyclic and differential pulse voltammetries. The identified anodic peaks of DMSeO in the potential range $-1200 \div +1500$ mV relative to Ag/Ag^+ (aq) in the CH_2Cl_2 medium verify that DMSeO exhibits antioxidant activity in relation to peroxy radicals oxidizers.

ЛИТЕРАТУРА

- [1] *Tinggi U.* // Environ Health Prev. Med., 2008, v.13, p.102.
- [2] *Mugesh G., Du Mont W., Sies H.* // Chem. Rev., 2001, v.101, p.2125.
- [3] *Plano D., Baquedano Y., Ibanez E., Jimenez I., Palop J.A., Spallholz J.E. Sanmartin C.* // Molecules, 2010, v.15, p.7292.
- [4] *Arteel G.E., Sies H.* // Environ Toxicol Pharmacol., 2011, v.10, p.153.
- [5] *Ramontar R.R., Brumaghim J.L.* // Cell Biochem. Biophys., 2010, v.58, p.1.
- [6] *Holmgren A.* // Free Radical Biol. and Med., 2006, v.41, p.862.
- [7] *Halliwell B., Gutteridge J.M.S.* Free Radicals in Biology and Medicine. Oxford University Press, Oxford, 1999.
- [8] *Denisov E.T., Afanasiev I.B.* Oxidation and Antioxidants in Organic Chemistry and Biology. CRC Press, Boca Raton, FL, 2005.
- [9] *Tavadyan L., Khachoyan A., Martoyan G., Kamal-Eldin A.* // Chem. Phys. Lipids, 2007, v.147, p.30.
- [10] *Бурлакова Е.Б.* Химическая и биологическая кинетика. Новые горизонты. М., Химия, 2005, с.10.
- [11] *Зенков Н.К., Ланкин В.З., Меньшикова Е.Б.* Окислительный стресс. М., Наука / Интерпериодика, 2001.
- [12] *Padmara S., Squadrito G.L., Lemerrier J.N., Cueto R., Pryor W.A.* // Free Radical Biol. And Med., 1996, v.21, p.317.
- [13] *Mareque A.M., Faez J.M., Chistiaens L., Kohnen S., Deby C., Noebeke M., Lomy M., Deby-Dupont G.* // Redox Report Commun. in Free Radical Research, 2004, v.9, p.81.
- [14] *Paetzold R., Bochmann G.* // Untersuchungen an Selen-Verbindungen. XLVI. Aliphatische Selenoxide und Selenone. Aliphatische Selenoxide und Selenone, 1968, v.360, p.293.
- [15] *Гордон А., Форд Р.* Спутник химика. М., Мир, 1976, с.541.
- [16] *Ou B., Hampsh-Woodil M., Prior R., Agric J.* // Food Chem., 2001, v.49, p.4619.
- [17] *Roginsky V., Lissi E.A.* // Food Chem., 2005, v.92, p.235.
- [18] *Chevion S., Roberts M.A., Chevion M.* // Free Radical Biol. and Med., 2000, v.28, p.317.
- [19] *Kipp B.H., Faraj C., Li G., Njus D.* // Bioelectrochemistry, 2004, v.64, p.7.
- [20] *Battin E.E., Zimmerman T., Ramoutar R.R., Quarles C.E., Brumaghim J.L.* // Metallomics, 2011, v.3, p.503.
- [21] *Litescu S.C., Radu G.L.* // European Food Research a Technology, 2000, v.211, p.218.