

УДК 616.843: 541.57.138

Кузнецова Т.Ю.¹, Соловйова Н.В.²

МОДЕЛИРОВАНИЕ ВЛИЯНИЯ ВОДНОЙ СРЕДЫ НА МЕХАНИЗМ ВЗАИМОДЕЙСТВИЯ МОЛЕКУЛ АНТИОКСИДАНТОВ СО СВОБОДНЫМИ РАДИКАЛАМИ КИСЛОРОДА

¹Полтавський національний технічний університет ім. Ю. Кондратюка

²ВДНЗ України «Українська медична стоматологічна академія», м. Полтава

Отсутствие систематических исследований, особенно на молекулярном уровне, антирадикальной активности различных антиоксидантов при их взаимодействии со свободными радикалами в биосистемах обуславливают не только наличие противоречивых оценок в интерпретации экспериментально полученных закономерностей, но и создают трудности в развитии общих представлений о механизме взаимодействия антиоксидантов со свободными радикалами и целенаправленного подхода к управлению этими процессами, что имеют практическое применение в медицине. Это делает задачу изучения антирадикальной активности разных антиоксидантов особенно актуальной. На основании анализа результатов квантовохимического моделирования взаимодействия молекул антиоксидантов с радикалами кислорода установлено, что оно происходит по кислотно-основному механизму, причем антиоксидант в отношении гидроксил-радикала выступает как основание, а по отношению к супероксид-анион-радикала – как кислота.

Ключевые слова: антиоксидант, гидроксил-радикал, супероксид-анион-радикал, глутатион, мелатонин.

Введение

Функционирование любого организма направлено на биосинтез веществ тела и поддержание жизненных функций в активном состоянии. Биосинтетические процессы требуют затрат энергии, которые в организме человека выделяются в окислительно-восстановительных процессах. Ежесекундно в клетках совершаются миллионы и миллиарды химических реакций, связанных с процессами окисления и восстановления, с процессами синтеза и распада органических соединений. В стрессовых условиях возможно нарушение метаболизма, что приводит к окислительному стрессу организма.

В настоящее время под состоянием окислительного стресса понимают интенсификацию процесса накопления в клетках организма свободных радикалов кислорода (СР), к числу которых относят супероксид-анион-радикал ($\bullet\text{OO}^-$) и гидроксилрадикал ($\bullet\text{OH}$). Эти соединения являются сильными окислителями и способны повреждать «здоровые» молекулы, участвующие в обмене веществ, за счет изменения структуры ДНК, в которых хранится наследственная информация, параллельно участвуя в синтезе вредного холестерина, тем самым повышая риск возникновения, например, сердечно-сосудистых заболеваний [1-3].

Свободные радикалы могут образовываться в клетке и в процессе естественного метаболизма. Однако воздействие на организм неблагоприятных условий приводит к смещению динамического равновесия в клетке и провоцирует накопление большого количества свободных радикалов кислорода в ней.

Свободнорадикальные процессы, протекающие под влиянием неблагоприятной экологической обстановки, химических, радиационных и многих других воздействий на биосистемы, вы-

звали появление все возрастающего числа исследований, посвященных изучению и определению эффективности известных и потенциальных антиоксидантов в организме человека [1,2,3].

Особая роль в антиоксидантной системе защиты организма принадлежит мелатонину (MLT) и глутатиону (GSH). В литературе [4,5] широко обсуждаются антиоксидантные свойства гормона шишковидной железы мелатонина, активность которого сравнивают с активностью глутатиона, причем не в пользу последнего [6]. Такое заключение, с нашей точки зрения, является недостаточно корректным, поскольку в публикациях нет данных сравнительных исследований антиоксидантной активности этих соединений в одинаковых условиях и на молекулярном уровне.

Отсутствие систематических исследований, особенно на молекулярном уровне, антирадикальной активности различных антиоксидантов при их взаимодействии со свободными радикалами в биосистемах обуславливают не только наличие противоречивых оценок в интерпретации экспериментально полученных закономерностей, но и создают трудности в развитии общих представлений о механизме взаимодействия антиоксидантов со свободными радикалами и целенаправленного подхода к управлению этими процессами, что имеет практическое значение.

Поэтому для приближения результатов предыдущего [7, 8] квантовохимического моделирования к реальным условиям взаимодействия молекул GSH и MLT с гидроксил-радикалом и супероксид-анион-радикала в организме человека представляется актуальным изучение эффективности действия эндогенных антиоксидантов путем моделирования механизма их взаимодействия со свободными радикалами, с уче-

том влияния водной среды, методами квантовой химии в сочетании с экспериментальными медицинскими клиническими исследованиями, что дает возможность не только получить обоснование положительного эффекта использования антиоксидантов, но и установить их потенциальную значимость в качестве лекарственных средств.

Цель работы

Исследование влияния водной среды на антирадикальные свойства эндогенных антиоксидантов мелатонина и глутатиона путем моделирования механизма их взаимодействия со свободными радикалами ($\bullet\text{OH}$ и $\bullet\text{OO}^-$).

Объекты и методы исследований

Теоретическое изучение механизма взаимодействия MLT и GSH с $\bullet\text{OO}^-$ и $\bullet\text{OH}$ выполнялось с помощью программного модуля GAMESS (версия от 27 марта 20007 года) и программного модуля Firefly 8 современным неэмпирическим квантовохимическим методом в базисе 6-31G** [9]. Для расчета влияния водной среды на свойства исследуемых систем была применена модель поляризованного континуума PCM и использована программа CAUSSIAN 09 (D.01).

Результаты и их обсуждение

Для анализа антиоксидантной активности молекул MLT и GSH принципиально важное значение имеет установление наиболее активных центров взаимодействия этих молекул со свободными радикалами кислорода.

Для поиска минимумов полной энергии, которые соответствуют максимумам взаимодействия $\bullet\text{OH}$ и $\bullet\text{OO}^-$ с молекулами MLT и GSH, было проведено детальное сканирование поверхности полной энергии взаимодействия в окрестности «мест атаки» молекул MLT и GSH путем расчета переходного состояния реакции взаимодействия с определением энергии активации для каждого из «направлений атаки» при изменении угла между соответствующими межатомными связями молекул антиоксидантов и радикалами и соответствующих расстояний между атомами реагентов, которое показало наличие для молекулы GSH - 17, а для молекулы MLT-16 минимумов полной энергии, включая глобальный (рис.1).

При взаимодействии молекулы GSH с одним супероксид-анион-радикалом в точке глобального минимума полной энергии взаимодействия

происходит перераспределение заряда величиной в $0,702e$ с $\bullet\text{OO}^-$ на молекулу глутатиона через атом водорода H (23), указывая на возможность эффективного взаимодействия супероксид-анион-радикала с GSH, с вероятным образованием стабильных комплексов [8]. Аналогично этот процесс происходит при взаимодействии $\bullet\text{OO}^-$ с молекулой мелатонина (перенос заряда величиной в $0,664e$ с супероксид-анион-радикала на молекулу MLT), в результате чего изменяется длина связи как в свободном радикале с $0,136$ до $0,143$ нм, так и в молекуле мелатонина N(8)–H(14) с $0,0999$ до $0,142$ нм [8].

При взаимодействии молекулы GSH с одним $\bullet\text{OH}$, наоборот, происходит рост электронной плотности на атоме кислорода гидроксил-радикала на $0,208e$, в результате чего увеличивается длина связи S(22)–H(23) в молекуле глутатиона с $0,132$ нм до $0,317$ нм, указывает на возможность отрыва этого атома водорода от молекулы GSH и последующим присоединением его к $\bullet\text{OH}$ с образованием молекулы воды [10].

Для «изолированного» гидроксил-радикала рост электронной плотности при взаимодействии с атомом водорода H (14) (в глобальном минимуме полной энергии) молекулы MLT составляет около $0,229e$, в результате чего увеличивается длина связи между атомом азота и атомом водорода N (8)–H (14) в молекуле мелатонина с $0,0999$ до $0,311$ нм, указывая тем самым на вероятность отрыва этого атома водорода от молекулы MLT и присоединение его к молекуле $\bullet\text{OH}$ с образованием молекулы воды [7].

Для приближения результатов расчетов к реальным условиям взаимодействия мелатонина и глутатиона со свободными радикалами в организме человека и моделирования ситуации влияния водной среды на механизм взаимодействия молекул MLT и GSH со свободными радикалами были проведены квантовохимические расчеты в рамках программы Firefly 8 [11].

При расчетах учитывали, что диэлектрическая проницаемость водной среды равна $\epsilon = 8,355$, а температура $T = 298$ К в рамках модели растворителя PCM.

Анализ полученных результатов (табл.1, табл.2) при учете влияния водной среды на взаимодействие молекул антиоксидантов со свободными радикалами показал, что механизм перераспределения электронной плотности усиливается для взаимодействий MLT $\cdots\bullet\text{OH}$ [$\bullet\text{OO}^-$] и GSH $\cdots\bullet\text{OH}$ [$\bullet\text{OO}^-$].

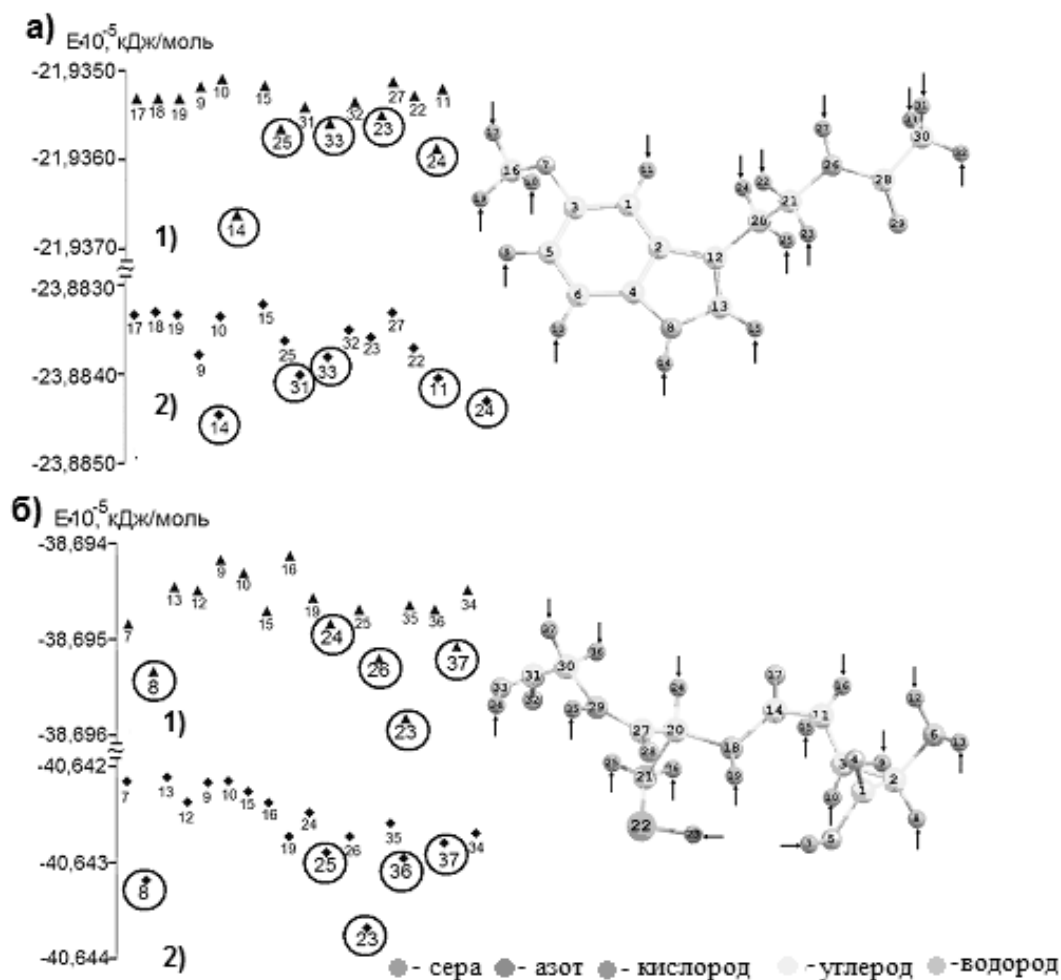


Рис. 1. Минимумы полной энергии взаимодействия (E) в комплексах:
 а) $MLT \cdots OH[•OO•]$; б) $GSH \cdots OH[•OO•]$ при атаке различных центров молекул антиоксидантов свободными радикалами:
 1) $•OH$; 2) $•OO•$ (выделенные 5 наиболее глубокие минимумы – O).

Таблица 1
 Сравнительное распределение зарядов q по Лёвдину и энергии активации E_a для взаимодействий $GSH[MLT] \cdots OH[•OO•]$ и свободных радикалов в точках глобального минимума

Взаимодействие		q						E_a , кДж/моль	
		GSH			MLT			GSH	MLT
		S(22)	H(23)	O(38)	N(8)	H(14)	O(34)		
•OH	Без РСМ	0,045	0,215	-0,449	-0,184	0,210	-0,470	101	106
	РСМ	0,036	0,222	-0,465	-0,178	0,215	-0,485	100	105
•OO•	Без РСМ	-0,660	0,216	-0,206	-0,342	0,220	-0,204	17	31
	РСМ	-0,731	0,211	-0,187	-0,370	0,209	-0,200	7	30

Таблица 2
 Распределение порядков связей V_{ij} и расстояний R для взаимодействий $GSH[MLT] \cdots OH[•OO•]$ в точках глобального минимума

Взаимодействие		GSH				MLT			
		S(22)-H(23)		O(38)-H(23)		N(8)-H(14)		O(34)-H(14)	
		V_{ij}	$R_{нм}$	V_{ij}	$R_{нм}$	V_{ij}	$R_{нм}$	V_{ij}	$R_{нм}$
•OH	Без РСМ	-	0,265	0,872	0,095	-	0,311	0,820	0,094
	РСМ	-	0,268	0,859	0,094	-	0,314	0,816	0,095
•OO•	Без РСМ	0,163	0,185	0,713	0,098	0,149	0,142	0,671	0,098
	РСМ	0,153	0,195	0,738	0,096	0,139	0,144	0,689	0,097

Так, при взаимодействии молекул GSH и MLT с $•OH$ величина заряда на атомах кислорода в гидроксил-радикалах уменьшается в 1,03 (табл.1), что приводит к увеличению величин порядков связей $O(34)-H(14)$ и $O(38)-H(23)$ в 1,01 и как следствие, происходит незначитель-

ное уменьшение величины длины соответствующих связей (табл.2). Все это приводит к увеличению вероятности отрыва атомов водорода от молекул MLT и GSH с образованием молекул воды, в отличие от взаимодействия молекул антиоксидантов с $•OO•$, где идет усиление образо-

вання комплексов $MLT[GSH] \cdot \bullet OO^-$. При учете впливу сольватационних ефектів проиходить перерасподілення електронної густоти з $\bullet OO^-$ на молекули антиоксидантів, в результаті чого зменшуються величини зарядів на атомах N(8) і S(22) в 1,08-1,1 (табл.2), що призводить до незначительного збільшення величин порядків зв'язей S(22)–H(23) і N(8)–H(14) в 1,07 і відстаней між цими атомами (табл.2).

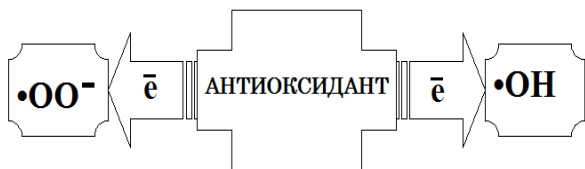


Рис.2. Схема перерасподілення електронної густоти при взаємодії молекули антиоксиданта (MLT і GSH) з $\bullet OH$, $\bullet OO^-$.

Полученные результаты зарядового перераспределения подтверждаются сравнительным анализом результатов расчетов энергий активации комплексов реакций взаимодействия молекул антиоксидантов со свободными радикалами, которые указали на незначительное изменение энергии активации при учете сольватационных эффектов (табл. 1), оставляя неизменным полученный результат, что механизм взаимодействия молекул MLT и GSH со свободными радикалами кислорода инициирует разнонаправленное перераспределение электронной густоты в молекуле антиоксиданта и проходит по схеме (рис.2).

Выводы

На основе анализа результатов квантовохимического моделирования взаимодействия молекул MLT и GSH с $\bullet OH$ и $\bullet OO^-$ в пределах континуальной модели растворителя РСМ дает возможность сделать вывод о том, что водная

среда с диэлектрической проницаемостью $\epsilon = 78,355$ при $T = 298$ К принципиально не влияет на перераспределение электронной густоты молекул антиоксидантов, а исследованные реакции происходят за кислотно-основным механизмом, причем молекула антиоксиданта по отношению к $\bullet OH$ выступает как основа, а по отношению к $\bullet OO^-$ – как кислота.

Литература

1. Чеснокова Н.П. Молекулярно-клеточные механизмы инактивации свободных радикалов в биологических системах / Н.П. Чеснокова, Е.В. Понукалина, М.Н. Бизенкова. // Успехи соврем. естествознания – 2006. – № 7. – С.29-36.
2. Магин Д.В. Фотохемилюминесценция как метод изучения антиоксидантной активности в биологических системах. Математическое моделирование / Д.В. Магин, Д.Ю. Измайлов, И.Н. Попов [и др.] // Вопр. мед. хим.– 2000. – Т.46, №4. – С. 61-66.
3. Roginsky V. Review of methods to determine chain-breaking antioxidant activity in food / V. Roginsky, E.A. Lissi // Food chemistry. – 2005. – Vol. 92. – P. 235.
4. Беленичев И.Ф. Регуляция антиоксидантного гомеостаза и системы детоксикации организма гормоном мелатонином. Роль мелатонин-зависимых рецепторов в реализации этой функции / И.Ф. Беленичев, Ю.И. Губский, Е.Л. Левицкий // Соврем. проблемы токсикологии. – 2003. – № 2. – С.2-16.
5. Бачурин С. О. Медико-химические подходы к направленному поиску препаратов для лечения и предупреждения болезни Альцгеймера / С. О. Бачурин // Вопр. мед. хим. – 2001. – Т.47, № 2. – С. 155-197.
6. Russel J. Melatonin: Lowering the High Price of Free Radicals / J. Russel // News Physiol. Sci. – 2000. – V. 15. – P. 246-250.
7. Кузнецова Т.Ю. Моделирование антиоксидантных свойств мелатонина и глутатиона при взаимодействии с гидроксил-радикалом / Т.Ю. Кузнецова, Н.В. Соловьева // Актуальні проблеми сучасної медицини : вісник Укр. мед. стоматолог. акад. – 2012. – Т.12, Вип.1–2. – С.189-193.
8. Solovyova N.V. Quantum chemical modeling of antioxidant activity of glutathione interacting with hydroxyl- and superoxide anion radicals / N.V. Solovyova, T.Yu. Kuznetsova // Ukr. Biochem. J. – 2015. – Vol. 87, № 2. – P.156-162.
9. Alex A. Granovsky. Firefly and PC GAMESS / Firefly version 8.0.1. [Electronic resource]. – Access mode // <http://classic.chem.msu.su/gran/games/forum/discussion.html>
10. Кузнецова Т.Ю. Моделирование антирадикальных процессов с участием глутатиона в биологических системах / Т.Ю. Кузнецова, Н.В. Соловьева // Актуальні проблеми сучасної медицини : вісник Укр. мед. стоматолог. акад. – 2014. – Т.14, Вип.4(48). – С.201-204.
11. Granovsky A. Firefly and PC GAMESS / Firefly version 8.0.1. [Electronic resource]. – Access mode: <http://classic.chem.msu.su/gran/games/forum/discussion.html>.

Реферат

МОДЕЛЮВАННЯ ВПЛИВУ ВОДНОГО СЕРЕДОВИЩА НА МЕХАНІЗМ ВЗАЄМОДІЇ МОЛЕКУЛ АНТИОКСИДАНТІВ ІЗ ВІЛЬНИМИ РАДИКАЛАМИ КИСНЮ

Кузнецова Т.Ю., Соловйова Н.В.

Ключові слова: антиоксидант, гідроксил-радикал, супероксид-аніон-радикал, глутатіон, мелатонін.

Відсутність систематичних досліджень, особливо на молекулярному рівні, антирадикальної активності різних антиоксидантів при їх взаємодії з вільними радикалами в біологічних системах зумовлює не тільки наявність суперечливих оцінок в інтерпретації експериментально одержаних закономірностей, але й створює труднощі у розвитку загальних уявлень відносно механізму взаємодії антиоксидантів із вільними радикалами та цілеспрямованого підходу до керування цими процесами, які мають практичне застосування у медицині. Це актуалізує вивчення антирадикальної активності різних антиоксидантів. На основі аналізу результатів квантовохімічного моделювання взаємодії молекул антиоксидантів з радикалами кисню встановлено, що вона відбувається за кислотно-основним механізмом, причому антиоксидант по відношенню до гідроксил-радикалу виступає як основа, а по відношенню до супероксид-аніон-радикалу – як кислота.

Summary

SIMULATION OF AQUEOUS MEDIUM INFLUENCE UPON MECHANISM OF INTERACTION BETWEEN ANTIOXIDANTS MOLECULES AND OXYGEN FREE RADICALS

Kuznetsova T. Yu, Solovyova N. V.

Key words: antioxidant, hydroxyl radical, superoxide- anion-radical, glutathione, melatonin.

The lack of systematic research, especially at the molecular level, clarifying the antiradical activity of various antioxidants in their interaction with free radicals in biological systems, not only leads to controversial opinions

as to the interpretation of experimentally obtained patterns, but also impedes the development of general ideas of the mechanism of interaction between antioxidants and free radicals, and, in this way hinders the focused approach to the management of these processes that are of great clinical importance. This explains the necessity to study antiradical activity of various antioxidants. Having based on the analysis of the results obtained by quantum chemical simulation of interaction between antioxidants molecules and oxygen radicals, it has been found out that this activity can be described in terms of the acid-base mechanism, where antioxidant acts as a base towards the hydroxyl radical, and as an acid towards superoxide- anion- radical.

УДК 611.08:612.064

Макаренко О.М.

ПОВЕДІНКОВІ ТА ГІСТОСТРУКТУРНІ ОСОБЛИВОСТІ ЛАКТОГЕНЕЗУ У ЩУРІВ НА ТЛІ ВВЕДЕННЯ ОКСИТОЦИНУ

ВДНЗ «Переяслав-Хмельницький державний педагогічний університет імені Г.Сковороди»

У статті представлено результати експериментального дослідження змін лактогенезу на тлі передродової стимуляції окситоцином. Вагітним щурам за 72, 48 і 24 години до пологів вводили окситоцин (0,1 мл / 100 г маси тіла, одноразово), а на третю добу лактаційного періоду виділяли черевні молочні залози для гістологічного дослідження. Додатково оцінювали рівень материнської агресії. За результатами досліджень зроблено висновок, що 3-кратне введення окситоцину перед пологами позначилося на гістофізіологічних основах лактогенезу. Виявлено зміни морфології альвеолярних ацинусів часточок залоз, менший рівень синтетичної та секреторної активності лактоцитів дослідної групи порівняно з контролем (при введенні 0,85% розчину NaCl у дозі 0,1 мл/100 г ваги). У групі самок, які були переведені на збагачену білком дієту (+20% молочного білка до стандартного раціону) також встановлено недостатній лактогенез, а в деяких випадках – атрофічні зміни залозистої тканини. На поведінковому рівні у дослідних групах тварин виявлено вищий рівень материнської агресії та число епізодів гострої агресивної реакції ($P < 0,05$). На основі гістологічних досліджень зроблено висновок про пригнічуючий вплив передродової стимуляції окситоцином на лактогенез.

Ключові слова: молочна залоза, лактогенез, окситоцин, передродова стимуляція, експеримент

Синтетичний окситоцин є найбільш часто використовуваним препаратом для стимуляції пологів. Дані про те, що екзогенний окситоцин не впливає на породіль, були поставлені під сумніви [1,2]. Припускається, що синтетичний окситоцин, який вводять під час пологів, може мати негативний вплив на рефлекс новонароджених і грудне вигодовування. У матерів, які мали епідуральну аналгезію під час пологів і отримали екзогенний окситоцин, відмічено більший ризик затримки початку лактації ніж у жінок, які не отримували окситоцин [3]. У інших спостереженнях встановлено більший ризик відмови від грудного годування у 2,2 рази [4]. При цьому жінки, які після пологів продовжували грудне вигодовування, отримували значно меншу дозу окситоцину під час стимуляції пологів [5]. Показано зв'язок передродової стимуляції окситоцином і високої частоти відмов жінок від грудного вигодовування, послаблення ритмічних, антигравітаційних та інших неонатальних рефлексів у новонароджених [6]. Одночасно з цим інші автори не виявили зв'язку між передродовою стимуляцією і материнською поведінкою [7].

Гальмівний ефект екзогенного окситоцину, ймовірно, може бути пов'язаний із проникненням через плаценту або негативним впливом на нейроендокринному регуляцію лактогенезу. Але ці дані не були ретельно досліджені і тому для підтвердження цієї гіпотези потрібні подальші дослідження. Однак, оскільки експериментальні

дослідження показали зменшення споживання їжі у відповідь на введення окситоцину [8], а клінічні дослідження продемонстрували зв'язок між введенням окситоцину та ризиком штучного вигодовування, незалежно від епідуральної анестезії, гіпотеза про те, що синтетичний окситоцин може вплинути на грудне вигодовування заслуговує на подальше вивчення.

Іншою проблемою є дефіцит лактації та штучне вигодовування. Зниження поживних речовин під час вагітності та лактації ускладнює загальний ріст і розвиток плоду. В експериментальних дослідженнях показано зниження продуктивності молочної продукції, затримку набору ваги потомства при дефіциті протеїну в раціоні тварин, затримку статевого дозрівання [9,10]

Метою дослідження стало експериментальне вивчення виявленого в клінічних умовах факту різкого зменшення або розвитку повної відсутності у породіль молока, тобто розвитку гіпогалактії у випадках, коли вагітним був застосований окситоцин з метою пологової стимуляції.

Матеріали та методи дослідження

У досліді були включені 27 вагітних самок щурів (середня вага 180-220 г). Тварини були розділені 3 групи. Контрольною групою стали тварини, яким вводили 0,85% розчину NaCl у дозі 0,1 мл/100 г ваги (група 1, n=11) і споживали стандартний гранульований комбікорм. Дослідним тваринам за 72, 48 і 24 години до пологів