

УДК 577.3+57.052

**КОРРЕЛЯЦИЯ СТРУКТУРЫ И АНТИОКСИДАНТНОЙ АКТИВНОСТИ МОЛЕКУЛ
МЕЛАТОНИНА И ТРИПТОФАНА****В. Т. Чешевич¹, С. Н. Соколовская¹, Е. А. Лапшина², С. Н. Ильина³**¹Институт фармакологии и биохимии НАН Беларуси, г. Минск²Гродненский государственный аграрный университет³Гродненский государственный медицинский университет

Изучали радикал-скэвенджерные свойства мелатонина и триптофана в системах, генерирующих алкоксильные и пероксильные радикалы (эритроциты человека, обработанные окислителем терт-бутилгидропероксид (тБГП)). Структурные и электронные свойства мелатонина, триптофана и окисленных производных данных молекул были исследованы теоретически с использованием AM1 полуэмпирического метода и ab initio метода. Высокая радикал-скэвенджерная способность мелатонина может быть обусловлена высокими значениями площади поверхности и дипольного момента молекулы, который отражает плотность заряда молекулы. С термодинамической точки зрения N1-ацетил- N2 -формил-5-метоксикинурамин (АФМК) является самым стабильным продуктом окисления мелатонина. Сравнительное исследование радикал-скэвенджерных, структурных и электронных свойства молекул мелатонина, его предшественника — триптофана продемонстрировало, что мелатонин в отличие от триптофана является потенциальным липидным антиоксидантом и эффективным скэвенджером алкоксильных и пероксильных радикалов.

Ключевые слова: структура, электронные свойства, радикал-скэвенджер, мелатонин, триптофан.

**STRUCTURE AND ANTIOXIDANT ACTIVITY ASSOCIATIONS
FOR MELATONIN MOLECULE AND ITS DERIVATIVES****V. T. Cheshchevik¹, S. N. Sakolouskaya¹, E. A. Lapshina², S. N. Iljina³**¹Institute for Pharmacology and Biochemistry NAS Belarus, Minsk²Grodno State Agricultural University³Grodno State Medical University

Structural and electronic properties of melatonin, tryptophan, and oxidative products of these molecules were determined theoretically by performing semi-empirical and ab initio calculations. The radical scavenging effects of melatonin and tryptophan were studied using the alkoxy and peroxy radical-generating systems. We have shown that melatonin, rather than tryptophan, is a potent lipid antioxidant and an effective scavenger of alkoxy- and peroxy radicals.

Key word: structure, electronic properties, radical-scavenger, melatonin, tryptophan.

Введение

В ряде исследований продемонстрировано, что мелатонин является эффективным антиоксидантом и скэвенджером свободных радикалов [1]. Показано, что мелатонин связывает гидроксильные радикалы, токсические пероксильные радикалы, но, с другой стороны, не взаимодействует непосредственно с супероксиданион радикалом [2]. Ранее мы продемонстрировали, что мелатонин является эффективным скэвенджером гипохлорной кислоты [3]. С целью выяснения корреляций структуры молекулы мелатонина, его физико-химических свойств и биохимической активности нами было проведено сравнительное исследование радикал-скэвенджерных, структурных и электронных свойства молекул мелатонина, его предшественника — триптофана и их производных, определены возможные молекулярные центры связывания радикалов. Радикал-скэвенджерные свойства мелатонина и триптофана изучали в системах, генерирующих алкоксильные и пероксильные радикалы (эритроциты человека, обработанные окислителем тБГП). Структурные и электронные свойства мелатонина, триптофана и окисленных производных данных молекул были исследованы теоретически с использованием полуэмпирических (AM1) методов и *ab initio* расчетов.

Материалы и методы исследований

В работе использовали бутилированный гидрокситолуол (БГТ), 2-тиобарбитуровую кислоту (ТБК), трихлоруксусную кислоту (ТХУ), додецил сульфат натрия, этилендиаминтетраацетат (ЭДТА), терт-бутилгидропероксид, 2, 2'-азобис (2-амидинпропан) дигидрохлорид (AAPH) (Sigma — Aldrich Chemie GmbH, Германия). Флуоресцентный зонд 1-(триметиламмоний фенил)-6-фенил-1,3,5-гексаатриен-р-толуолсульфонат (TMA — DPH) получен от Molecular probes, Eugene, OR, USA. Все остальные реактивы производства «Реахим» (Россия). Все растворы готовили на воде, очищенной с помощью Milli-Q системы (Millipore), имеющей проводимость 18,4 МΩ см⁻².

Эритроциты. Кровь здоровых доноров (с добавлением 3 % раствора цитрата натрия) получали на Станции переливания крови г. Гродно. После удаления плазмы и слоя лейкоцитов эритроциты промывали 3 раза холодным (4 °С) изотоническим раствором NaCl, содержащим фосфатный буфер (ФБ: 0,145 М NaCl, 1,9 мМ NaH₂PO₄ и 8,1 мМ Na₂HPO₄, pH = 7,4). Эритроциты использовали немедленно после получения. Мембраны эритроцитов получали по методу Доджа и соавт. [4, 5]. Гемолизат готовили лизисом 0,1 мл суспензии эритроцитов (5 % гематокрит) в 1 мл H₂O.

Переокисное окисление липидов определяли как количество ТБК-реактивных соединений (ТБКРС) в кислоторастворимой фракции суспензии эритроцитов по методу Стокса и Дормэнди [6].

Окислительный стресс индуцировали, инкубируя эритроциты человека (гематокрит 10 %) в ФБ с различными концентрациями тБГП при 21 °С в течение часа.

Результаты исследования и их обсуждение

На рисунке 1 показана концентрационная зависимость ингибирования мелатонином процессов перекисного окисления липидов (ПОЛ) в суспензии эритроцитов, обработанной тБГП. Ингибирование, вероятно, осуществляется прямым скэвенджированием алкоксильных и пероксильных радикалов, образуемых при разложении перекиси в эритроцитах. Другая возможность заключается во взаимодействии липидных пероксильных радикалов с мелатонином, что приводит к ингибированию процессов перекисного окисления мембранных липидов. Мы сравнили эффективность взаимодействия мелатонина, триптофана и известного липидного антиоксиданта БГТ со свободными радикалами и продемонстрировали ингибирование образования ТБКРС в суспензии эритроцитов (рисунок 1) или тушение люминол-зависимой хемиллюминесценции данными эффекторами в системе генерации свободных радикалов Fe²⁺ — тБГП (рисунок 2).

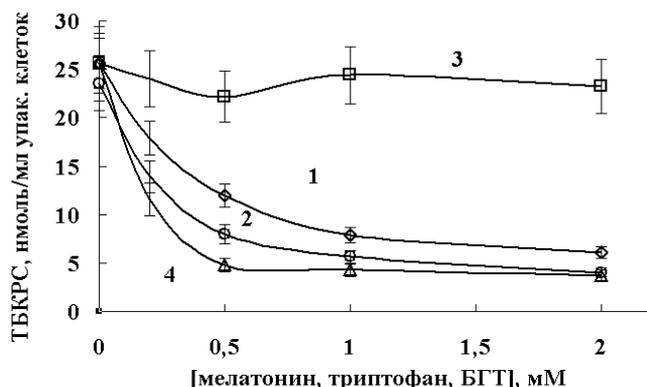


Рисунок 1 — Протекторный эффект мелатонина (1, 2), триптофана (3) или БГТ (4) при тБГП-индуцированном перекисном окислении мембранных липидов в эритроцитах (1, 3, 4) и в гемолизатах (2) того же количества клеток. Суспензию клеток (5% гематокрит) или гемолизат в ФБ (рН 7,4) обрабатывали 1,25 мМ тБГП при 37 °С в течение 30 мин. Предварительно клетки или гемолизат преинкубировали с различными концентрациями мелатонина, триптофана и БГТ при 37 °С в течение 20 мин

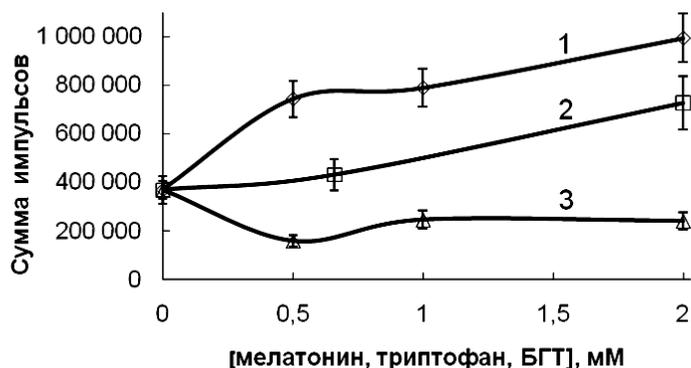


Рисунок 2 — Эффект мелатонина (1), триптофана (2) или БГТ (3) на люминол-зависимую хемиллюминесценцию, генерируемую в системе Fe^{2+} (1 мМ) + тБГТ (20 мМ) в ФБ (рН 7,4) при 37 °С

Концентрации мелатонина и липофильного антиоксиданта БГТ, вызывающие 50 % ингибирование окислительного процесса (IC50), составили 450 ± 55 и 180 ± 15 мкМ соответственно (рисунок 1). В то же время мелатонин не оказывал эффекта на внутриклеточные окислительные процессы: окисление внутриклеточного глутатиона и образование метНв. Как видно на рисунке 1, протекторный эффект мелатонина, наблюдаемый в гемолизатах эритроцитов после обработки тБГТ, был выше, чем в суспензии эритроцитов. На рисунке 2 показаны эффекты мелатонина, триптофана и БГТ на общую интенсивность хемиллюминесценции, генерируемой в системе Fe^{2+} + тБГТ эритроцитах. Значения IC50 ингибирования генерации радикалов в системе «эритроциты/тБГТ» составили 490 ± 65 и 95 ± 11 мкМ для мелатонина и БГТ соответственно. Интересно, что мелатонин и в меньшей степени — триптофан повышал интенсивность люминол-зависимой хемиллюминесценции, генерируемой в системе Fe^{2+} + тБГТ (рисунок 2).

Процессы тушения люминол-зависимой хемиллюминесценции, генерируемой свободными радикалами, являются сложными, поэтому графики Штерна-Фольмера тушения хемиллюминесценции не являются линейными. Используя графики Штерна-Фольмера для ингибирования образования ТБКРС в эритроцитах, мы рассчитали кажущуюся константу Штерна-Фольмера, характеризующую взаимодействие мелатонина со свободными радикалами. Кажущаяся константа Штерна-Фольмера для мелатонина, которую определили из линейной части графика, составила $(0,23 \pm 0,05) \times 10^4 \text{ M}^{-1}$. Значения кажущихся констант Штерна-Фольмера для ингибирования перекисного окисления липидов в эритроцитах ВНТ и триптофаном, определенные из начальных линейных участков графиков Штерна-Фольмера, составили $(0,85 \pm 0,10) \times 10^4 \text{ M}^{-1}$ и $(0,02 \pm 0,005) \times 10^4 \text{ M}^{-1}$ соответственно.

Мелатонин ингибировал тБГТ-индуцированную люминол-зависимую хемиллюминесценцию в

эритроцитах, что подтверждает предположение о непосредственном взаимодействии алкоксильных и пероксильных радикалов с мелатонином (рисунок 2). Люминол-зависимая люминесценция, как известно, отражает внутри- и внеклеточный уровень генерируемых свободных радикалов. Мы предполагаем, что мелатонин и в меньшей степени — триптофан увеличивали хемиллюминесценцию в системе Fe^{2+} + тБГТ, восстанавливая Fe^{3+} в Fe^{2+} (рисунок 2). Подобным образом найдено, что серотонин увеличивал образование гидроксильных радикалов в системе Fe^{3+} -ЭДТА, аскорбат, перекись водорода вследствие прямого восстановления Fe^{3+} -ЭДТА в Fe^{2+} -ЭДТА. Термическое разложение азосоединения ААРН приводит к образованию свободных радикалов, локализованных на атоме углерода, которые быстро реагируют с кислородом, давая пероксильные радикалы. Мы показали эффективное взаимодействие мелатонина с пероксильными радикалами, используя ААРН-люминол систему (данные не представлены). Далее мы определили кажущиеся константы Штерна-Фольмера для ингибирования эффекторами процессов генерации радикалов в данной системе. Кажущиеся константы Штерна-Фольмера для мелатонина, триптофана и ВНТ, определенные из линейного участка графиков, составили $(0,42 \pm 0,05) \times 10^4 \text{ M}^{-1}$, $(0,04 \pm 0,01) \times 10^4 \text{ M}^{-1}$ и $(0,53 \pm 0,08) \times 10^4 \text{ M}^{-1}$ соответственно. Рассчитанные значения констант Штерна-Фольмера продемонстрировали способность мелатонина непосредственно взаимодействовать со свободными радикалами. Радикал-скэвенджерные свойства мелатонина намного превосходят таковые для триптофана и близки к радикал-скэвенджерным свойствам БГТ, известного антиоксиданта.

Описано несколько механизмов взаимодействия радикалов с мелатонином. Предполагается, например, что мелатонин при взаимодействии с гидроксильным радикалом, отдает электрон на гидроксильный радикал с образованием катион-радикала мелатонина [7]. При

взаимодействии катион-радикала с супероксиданионом образуется N1-ацетил-N2-формил-5-метоксикинурамин (АФМК) [7]. С другой стороны, с термодинамической точки зрения на основе математических расчетов Турьянский с соавторами предположил, что мелатонин может напрямую взаимодействовать с гидроксильным радикалом с образованием 2-гидроксиизомера мелатонина [8]. Стасика и соавт. предположили, что C₂ углеродный атом индольного кольца мелатонина является самым вероятным центром радикальной атаки, а C₃ атом — наименее возможный центр взаимодействия с радикалами [9].

В таблице 1 представлены некоторые свойства молекул мелатонина, триптофана и их производных, значения энергий и дипольных моментов. Как видно из полученных в таблице 1 данных, молекула мелатонина имеет относительно большой дипольный момент (4,76 Д) по сравнению с молекулой триптофана (3,32 Д). Значение энергии связывания для молекулы

мелатонина, полученное по методу AM1, составило –3433,27 ккал/моль, что выше соответствующего значения –2891,53 ккал/моль, полученного для молекулы триптофана. Теплота образования молекулы мелатонина (–32,94 ккал/моль) ниже теплоты образования молекулы триптофана (–41,4 ккал/моль). Молекула мелатонина имеет значительно большую площадь поверхности (412,75 Å²) по сравнению с молекулой триптофана (289,73 Å²). В молекулах цикло 3-гидрокси мелатонина и цикло 3-гидрокси триптофана третье пентагональное кольцо, образованное в результате окисления молекул мелатонина и триптофана, соответственно, выдвинуто из плоскости индольного кольца. Для молекулы цикло 3-гидрокси мелатонина полуэмпирический метод (AM1 метод) дает значение угла между плоскостями индольного и третьего пентагонального колец, равное 119°. Соответствующий угол в молекуле цикло 3-гидрокси триптофана составил 122°.

Таблица 1 — Расчеты молекулярных свойств, значений энергии и дипольных моментов молекул мелатонина, триптофана и продуктов окисления этих молекул

Показатель	Мелатонин	АФМК	Цикло 3-гидрокси мелатонин	Триптофан	Формил кинурамин	Цикло 3-гидрокси триптофан
Число электронов	124	140	132	108	124	116
Мультиплетность	Синглет	Синглет	Синглет	Синглет	Синглет	Синглет
Группа мол. симметрии	C1	C1	C1	C1	C1	C1
Площадь поверхн., Å ²	412,75	478,33	368,89	289,73	348,32	290,92
Объем, Å ³	741,91	802,74	730,16	618,37	673,39	628,82
Энерг. гидра-та, ккал/моль	-6,90	2,54	-7,32	-14,21	-3,55	-14,75
AM1						
Общая энергия, ккал/моль	-67772,5	-82565,2	-75164,8	-60607,3	-75395,13	-68006,99
Энергия связыв., ккал/моль	-3433,27	-3646,81	-3535,98	-2891,53	-3100,19	-3001,63
Теплота обр., ккал/моль	-32,94	-127,37	-76,11	-41,4	-130,9	-91,94
Ab initio						
Общая энергия, ккал/моль	-471104,9	-563733,5	-517448,2	-422666,6	-515310,5	-469032,3
Кин. энергия, ккал/моль	466534,0	558457,9	512436,3	418791,7	510644,2	464707,6
НОМО, эВ	-5,585	-6,441	-5,494	-6,110	-6,563	-6,186
LUMO, эВ	6,581	6,122	7,036	6,266	5,487	7,155
Δ E, эВ	12,166	12,563	12,530	12,376	12,050	13,341
Самый низкий энерг. ур., эВ	-550,7	-552,6	-552,0	-552,205	-552,756	-552,692
Самый высокий энерг. ур., эВ	31,86	30,43	31,07	31,42	30,543	31,248
Дипольный момент, Д	4,76	4,603	4,349	3,320	4,766	2,244

В работах Эркоса и соавторов теоретически исследованы структурные и электронные свойства мелатонина и его шести изомеров [10]. Наши расчеты молекулярных свойств молекул мелатонина и цикло-3-гидрокси мелатонина согласуются с данными Эркоса и соавторов [10]. Мелатонин является высоко полярной молекулой, следовательно, он легко взаимодействует с молекулами своего окружения. Эркос и соавторы предположили, что отрицательный избыточный заряд на индольном кольце молекулы

мелатонина способствует взаимодействию с радикалами [10]. Согласно нашим расчетам по методу ab initio, суммарный отрицательный заряд на гексагональном и пентагональном кольцах триптофана выше соответствующих зарядов в молекуле мелатонина (таблица 1). Мы предполагаем, что плотность заряда, мерой которой является дипольный момент молекулы, а не избыточный заряд, обуславливает сильные радикал-скэвенджерные свойства молекулы мелатонина. Из расчетов по методу

АМ1 следует, что молекула АФМК имеет самую высокую энергию связывания и теплоту образования по сравнению с молекулой цикло-3-гидрокси мелатонина (таблица 1) или по сравнению с другими продуктами окисления молекулы, которые были рассчитаны Эрксом и соавторами [10], или по сравнению с молекулой триптофана (таблица 1). Из наших данных следует, что АФМК является самым стабильным продуктом среди всех рассмотренных продуктов окисления мелатонина (таблица 1). В то же время следует отметить, что разница между теплотой образования молекулы мелатонина и продуктов его окисления близка к разнице между теплотой образования молекулы триптофана и продуктов его окисления (таблица 1). Следовательно, с термодинамической точки зрения окисление мелатонина не является предпочтительным по сравнению с окислением триптофана. Избыточный положительный заряд на C_2 атоме (+0,042 е) пентагонального кольца молекулы мелатонина делает этот атом возможной точкой нуклеофильной атаки или атомом, от которого может отщепиться водород. Однако не только избыток заряда на атоме, но и термодинамическая стабильность образовавшегося интермедиата играют важную роль в образовании соответствующего продукта реакции.

Заключение

Таким образом, мы показали, что мелатонин в отличие от триптофана является потенциальным липидным антиоксидантом и эффективным скэвенджером алкоксильных и пероксильных радикалов. Мы предположили, что

высокая радикал-скэвенджерная способность мелатонина может быть обусловлена высокими значениями площади поверхности и дипольного момента молекулы, который отражает плотность заряда молекулы. С термодинамической точки зрения, согласно нашим расчетам N^1 -ацетил- N^2 -формил-5-метоксикинурамин (АФМК) является самым стабильным продуктом окисления мелатонина.

БИБЛИОГРАФИЧЕСКИЙ СПИСОК

1. Pharmacological actions of melatonin in oxygen radical pathophysiology / R. J. Reiter [et al.] // *Life Sci.* — 1997. — Vol. 60(25). — P. 2255-2271.
2. Melatonin: a potent, endogenous hydroxyl radical scavenger/ D. X. Tan [et al.] // *Endocrine J.* — 1993. — Vol. 1. — P. 57–60.
3. Hypochlorous acid-induced oxidative stress in Chinese hamster B14 cells: viability, DNA and protein damage and the protective action of melatonin/ I. B. Zavadnik [et al.] // *Mut Res.* — 2004. — Vol. 559. — P. 39–48.
4. The preparation and chemical characteristics of hemoglobin-free ghosts of human erythrocytes/ J. T. Dodge [et al.] // *Arch. Biochem. Biophys.* — 1963. — Vol. 100. — P. 119–130.
5. Comparison of human red cell lysis by hypochlorous and hypobromous acids: insights into the mechanism of lysis / M. C. M. Vissers [et al.] // *Biochem. J.* — 1998. — Vol. 330. — P. 131–138.
6. Stocks, J. The autoxidation of human red cell lipids induced by hydrogen peroxide/ J. Stocks, T. Dormandy // *Brit. J. Haematol.* — 1971. — Vol. 20. — P. 95–111.
7. The significance of the metabolism of the neurohormone melatonin: antioxidative protection and formation of bioactive substances / R. Hardeland [et al.] // *Neurosci. Biobehav. Rev.* — 1993. — Vol. 17. — P. 347–357.
8. Turjanski A.G., Reactions of melatonin and related indoles with free radicals: a computational study / A. G. Turjanski [et al.] // *J. Med. Chem.* — 1998. — Vol. 41. — P. 3684–3689.
9. Stasica, P. Hydroxyl radical reaction with melatonin molecule: a computational study / P. Stasica, P. Paneth, J. Rosiak // *J. Pineal Res.* — 2000. — Vol. 29. — P. 125–127.
10. Erkoç, S. Theoretical investigation of melatonin and its hydroxy isomers / S. Erkoç, F. Erkoç, N. Keskin // *J. Mol. Struct.* — 2002. — Vol. 587. — P. 73–79.

Поступила 01.03.2011