

АНТИОКСИДАНТНЫЕ СВОЙСТВА *para*-АМИНОБЕНЗОЙНОЙ КИСЛОТЫ И ЕЕ НАТРИЕВОЙ СОЛИ

© 2017 г. Т.В. Сирота, Н.Е. Лямина, Л.И. Вайсфельд*

*Институт теоретической и экспериментальной биофизики РАН,
142290, Пущино Московской области, ул. Институтская, 3*

**Институт биохимической физики им. Н.М. Эмануэля РАН, 119334, Москва, ул. Косыгина, 4*

E-mail: sirotatv@rambler.ru

Поступила в редакцию 20.03.17 г.

После доработки 28.04.17 г.

С использованием супероксидгенерирующей модельной системы – реакции автоокисления адреналина в щелочной среде – были выявлены антиоксидантные свойства известного вещества из группы витаминов *para*-аминобензойной кислоты и ее натриевой соли. Эти соединения ингибировали накопление адренохрома, продукта окисления адреналина, а также образование супероксид анионов, для идентификации которых использовали нитросиний тетразолий. Разработаны подходы для получения истинного раствора *para*-аминобензойной кислоты и условия для измерения антиоксидантной активности *para*-аминобензойной кислоты и ее натриевой соли. Наличие антиоксидантных свойств указывает на возможность участия этих соединений в окислительно-восстановительных процессах в клетке и может быть также одной из причин их эссенциальности.

Ключевые слова: para-аминобензойная кислота, натриевая соль para-аминобензойной кислоты, адреналин, адренохром, супероксид, нитросиний тетразолий.

Para-аминобензойная кислота (ПАБК) принадлежит к группе витаминов, синтезируется растениями и микроорганизмами, в том числе и бактериальной флорой кишечника. Биологическая важность ПАБК связана с участием в синтезе фолиевой кислоты, которая необходима для биосинтеза тетрагидрометанооптерина и тетрагидрофолата соответственно для синтеза пуринов и пиримидинов, т.е. РНК и ДНК [1–5]. Кроме того, она известна как индуктор эндогенного интерферона и как прямой антикоагулянт, у нее обнаружены противовирусные и антиоксидантные свойства [6]. Предложена лекарственная форма ПАБК [7,8]. И.А. Рапопортом с коллегами изучалось влияние ПАБК на фенотипические признаки, и она была рекомендована для практического применения в сельском хозяйстве [9]. Молекулярный механизм действия ПАБК связан, по нашему мнению, не только с процессами синтеза, но и с участием в окислительно-восстановительных реакциях в клетке, что реализуется, вероятно, через соответствующие антиоксидантные ферменты, которые реагировали, как показано в опытах *in vivo*, на прекондиционирование этим веще-

ством [2,10,11]. В условиях гипербарической оксигенации [10], рентгеновского облучения и гипоксии [11] под действием ПАБК в некоторых исследуемых тканях изменялись активность антиоксидантных ферментов (супероксиддисмутазы и каталазы) и показатели перекисного окисления липидов. В работе [2] показано непосредственное участие ПАБК в защите от теплового стресса. Один из механизмов защитного действия ПАБК связан, по мнению авторов, с активацией антиоксидантных ферментов. Установлено, что с увеличением температуры среды усиливалась экспрессия не только белков теплового шока, но и транскрипция гена *Pabs*, кодирующего фермент ПАБК-синтазу, в результате увеличивалось содержание эндогенной ПАБК и возрастала термотолерантность гриба. Такой же эффект наблюдался и с экзогенной ПАБК. Также возрастала активность ферментов супероксиддисмутазы и каталазы. Эти результаты демонстрируют важную роль ПАБК в усилении термотолерантности гриба за счет двух механизмов: подъема уровня специфических защитных белков и удаления H_2O_2 при участии антиоксидантных ферментов [2].

Эксперименты с использованием различных модельных систем для выявления антиоксидантной активности (АОА) позволяют предполо-

Сокращения: ПАБК – *para*-аминобензойная кислота, АОА – антиоксидантная активность.

жить механизм действия изучаемого соединения. Исследования антиоксидантной активности ПАБК *in vitro* единичны. В работе [12] показано, что в реакции типа Фентона ($\text{Fe}^{3+} + \text{EDTA}/\text{H}_2\text{O}_2/\text{аскорбиновая кислота}$) ПАБК защищала ДНК от повреждений, взаимодействуя с гидроксил-радикалами ($\bullet\text{OH}$) и синглетным кислородом, но не удаляла супероксид-анионы (O_2^\bullet) и не реагировала с H_2O_2 . Однако в исследованиях *in vivo*, как отмечено выше [2,10,11], выявлено изменение активности супероксиддисмутазы и каталазы, что указывает на участие ПАБК в супероксидгенирующих процессах в клетке. В работе [11] сообщалось об опыте в модельной системе « $\text{Fe}^{2+} + \text{аскорбат}$ », но конкретные результаты экспериментов не представлены. Кроме того, непонятно, каким образом авторы этой работы использовали раствор с высокой концентрацией ПАБК («0,1 М ПАБК – оптимальная концентрация» [11]). По нашим данным, при такой концентрации раствор ПАБК имеет вид суспензии, а не истинного раствора.

Используя именно супероксидгенирующую модельную систему, мы поставили задачу изучить антиоксидантную активность ПАБК *in vitro*. Подобных исследований в доступной нам литературе не обнаружено. Поскольку ПАБК, как известно [9,13], плохо растворима в воде, были разработаны условия для получения истинного раствора ПАБК и подходы для измерения АОА. Также было обнаружено, что ПАБК идеально растворялась в 0,2 М карбонатном буфере, pH 10,55, именно в том буфере, который применяется в используемой супероксидгенирующей модельной системе [14–18]. Таким образом, наши исследования были проведены как с ПАБК, так и с натриевой солью Na-ПАБК, образующейся в карбонатном буфере.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Исследование антиоксидантных свойств ПАБК и Na-ПАБК проводили по разработанному нами ранее подходу [14–18], представляющему модификацию метода Misra and Fridovich [19], основанного на использовании супероксидгенирующей реакции автоокисления адреналина в щелочной среде. Способность исследуемых веществ ингибировать эту реакцию оценивалась как антиоксидантная активность.

Спектрофотометрически при длине волны 347 нм определяли накопление продукта окисления адреналина адренохрома [14,15,17,18]. Образование O_2^\bullet регистрировали по диформазау (длина волны 560 нм), продукту восстановления

нитросинего тетразолия супероксид-анионами [16–18]. Спектральные исследования проводили в 0,2 М карбонатном буфере, pH 10,55, на спектрофотометре Unikon 923 (Италия) и «UV-VIS» (Германия) в режиме «time Driver» и «Wavelength Scan» при комнатной температуре (19–21°C). При регистрации образования адренохрома добавка в реакционную среду адреналина составляла 0,23 мМ, при измерении диформаза вносил 0,025 мМ нитросинего тетразолия в кювету с карбонатным буфером до адреналина и затем 0,029 мМ адреналина. Время регистрации составляло три или четыре минуты. Скорость реакции образования адренохрома и диформаза оценивали по изменению оптической плотности в единицу времени и рассчитывали по формуле: $\Delta E/\Delta t = (E_t - E_1)/\Delta t$, где E_1 – регистрируемая оптическая плотность при длине волны 347 или 560 нм сразу же после внесения адреналина, E_t – оптическая плотность через время Δt , в течение которого регистрируется автоокисление адреналина. АОА выражали в условных единицах: 1 усл. ед. = 1% ингибирования.

В специальных экспериментах регистрировали спектры в процессе автоокисления адреналина, делая несколько последовательных измерений оптической плотности в диапазоне 240–700 нм после одной добавки адреналина.

Приготовление рабочего раствора 50 мМ ПАБК и Na-ПАБК. Особенности проведения исследования АОА ПАБК. Для получения истинного раствора ПАБК суспензию прогревали до полного растворения вещества (70–75°C), в процессе работы раствор содержали в теплой бане (45–50°C). В этой же бане находился сосуд с водой, соответствующие аликвоты которой вносили в измерительную кювету к буферу как контроль на объемную добавку воды и влияния температуры. При постановке опытной пробы в кювету с буфером аналогично добавляли теплый раствор ПАБК. Объемы аликвоты «теплого» 50 мМ ПАБК или воды варьировали от 10 до 300 мкл, концентрация ПАБК составляла соответственно от 0,25 мМ до 7,5 мМ. Вносимые добавки ПАБК не изменяли величину pH 0,2 М карбонатного буфера. Спектрофотометрические измерения проводили при комнатной температуре.

Растворяя ПАБК при комнатной температуре непосредственно в щелочном 0,2 М карбонатном буфере, pH 10,55, который использовали для инициации автоокисления адреналина [14–18], получали истинный раствор соли Na-ПАБК, pH которого корректировали концентрированным NaOH до 10,55. 0,2 М карбонатный буфер готовили из Na_2CO_3 , pH уста-

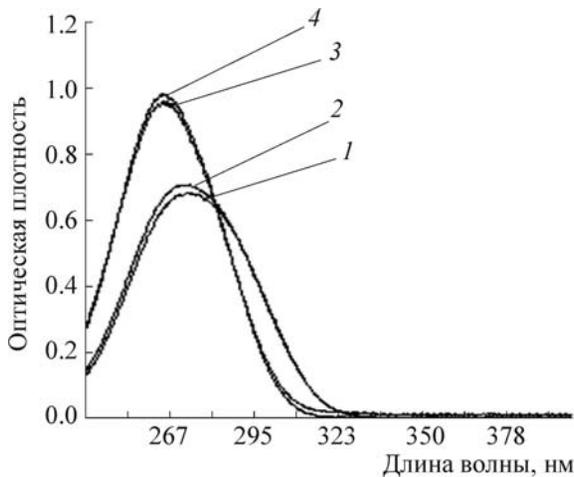


Рис. 1. Спектры ПАБК (0,0625 мМ) в различных растворителях: 1 – бидистиллированная вода; 2 – водопроводная вода; 3 – физиологический раствор; 4 – 0,2 М карбонатный буфер, рН 10,55. В кювете сравнения соответствующий растворитель.

наливали добавлением к раствору сухого NaHCO_3 . Все растворы готовили на бидистиллированной воде.

В работе использовали реактивы: Na_2CO_3 , нитросиний тетразолий (Sigma, США), NaHCO_3 (J. T. Baker, Голландия), фармакопейную форму адреналина гидрохлорида-Виал (эпинефрин) (Шаньдун Шэнлу Фармасьютикал Ко., Лтд Норт оф Сыхэ Роуд, Сыхэ Стрит, Сишуи Канути, Китай), ПАБК производства Ереванского завода химреактивов (Армения).

Статистическую обработку результатов проводили с использованием *t*-критерия Стьюдента (в программе Microsoft Excel): определяли среднее значение (*M*) и стандартное отклонение (*s.d.*). Представленные данные являются средними значениями, полученными в независимых экспериментах при четырех–шести параллельных измерениях в каждом опыте.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

В процессе работы возникли проблемы с получением истинного раствора необходимой рабочей концентрации ПАБК, поскольку при комнатной температуре вещество не растворялось в воде. Эта проблема в некоторых цитированных нами работах не обсуждается [6,11], но описываемые в работах условия эксперимента указывали на ее существование: ПАБК растворяли в горячей воде [9,20], в 3% уксусной кислоте [13].

Мы разработали условия и подходы для получения истинных растворов и использовали их для исследования АОА (см. раздел «Мате-

риалы и методы»). Также мы обнаружили, что растворы ПАБК имеют кислую реакцию и изменяют рН буферов. Однако в опытах, проводимых в работах [6,9,11,13,20,21], контрольные эксперименты относительно рН не ставились, даже в случае растворения ПАБК в уксусной кислоте [13]. Это свойство ПАБК учитывалось в наших экспериментах и величина рН раствора Na-ПАБК (ПАБК в карбонатном буфере) корректировалась.

На рис. 1 представлены спектральные исследования растворов ПАБК и Na-ПАБК в различных растворителях: кривые 1 и 2 – ПАБК соответственно в бидистиллированной и водопроводной воде; кривые 3 и 4 – Na-ПАБК соответственно в физиологическом растворе и 0,2 М карбонатном буфере, рН 10,55. Амплитуда пика Na-ПАБК увеличена в сравнении с ПАБК и его максимум незначительно сдвинут в коротковолновую область. Рассчитанный коэффициент молярной экстинкции (ϵ) Na-ПАБК составляет $1,4 \cdot 10^4 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ (длина волны 265 нм). Повторные спектральные измерения через различные промежутки времени показали устойчивость ПАБК и Na-ПАБК в щелочной среде. Особо важное заключение из этих экспериментов – область спектра, где измеряется накопление адренохрома (длина волны 347 нм), не перекрывается собственным спектром ПАБК (рис. 1). Это наглядно демонстрируется и на рис. 2.

На рис. 2 также представлены результаты исследования влияния ПАБК на кинетику автоокисления адреналина в щелочном карбонатном буфере при регистрации спектров в диапазоне 240–700 нм. Показано, что при добавлении в среду ПАБК (0,5 мМ) наблюдается снижение оптической плотности в области 330–365 нм (рис. 2б) в сравнении с динамикой спектральных изменений в отсутствие ПАБК (рис. 2а). Обнаруженное ингибирующее действие исследуемого вещества указывает, что ПАБК обладает антиоксидантной активностью в используемой модельной системе.

Данные о влиянии разных концентраций ПАБК на скорость реакции представлены на рис. 3а (темные столбики). Эксперименты проводили с «теплым» раствором ПАБК, как описано в разделе «Материалы и методы». Скорость реакции при внесении в реакционную среду объемной аликвоты теплой бидистиллированной воды (ПАБК отсутствует) показана на этом рисунке в виде светлых столбиков. Постановка таких проб – это контроль на влияние температуры и объема вносимой аликвоты воды. Сравнение скорости реакции в опытной пробе с соответствующей величиной скорости

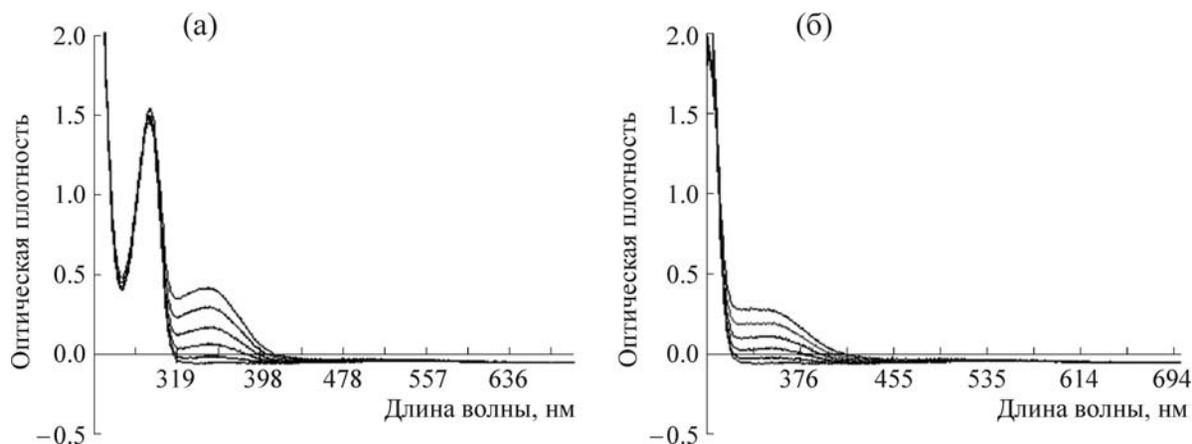


Рис. 2. Изменения спектров при автоокислении одной добавки 0,23 мМ адреналина в 0,2 М карбонатном буфере, рН 10,55: (а) – контроль в отсутствие ПАБК; (б) – в присутствии 0,5 мМ ПАБК. Спектры регистрировали через равные промежутки времени в течение 15 мин (шесть проходов каретки спектрофотометра). Температура в кювете 20°C.

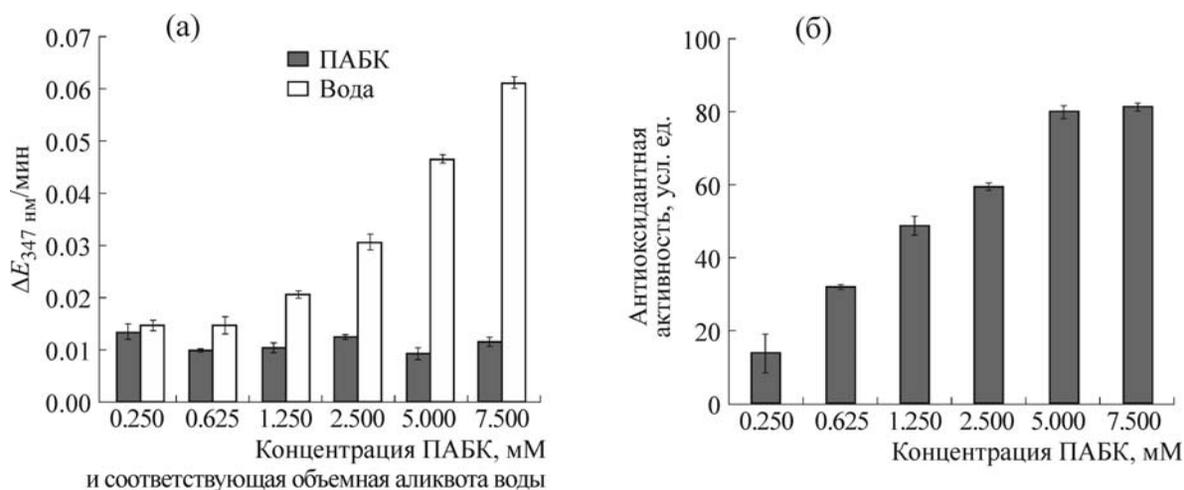


Рис. 3. (а) – Скорость образования адrenoхрома в реакции автоокисления адреналина в присутствии разных концентраций «теплой» ПАБК (темные столбики) и соответствующего объема аликвоты «теплой» воды (светлые столбики); (б) – рассчитанная антиоксидантная активность ПАБК. Условия проведения реакции: 0,2 М карбонатный буфер, рН 10,55; 0,23 мМ адреналина. Температурные условия, расчет скорости реакции и антиоксидантной активности описаны в разделе «Материалы и методы».

в контрольной пробе демонстрирует ингибирующее действие исследуемых концентраций ПАБК. Кроме того, в поставленных таким образом экспериментах ярко проявился температурный эффект: добавляемые увеличивающиеся по объему аликвоты теплой воды существенно ускоряли автоокисление адреналина (рис. 3а, светлые столбики). В то же время скорость реакции в присутствии «теплой» ПАБК в аналогичных условиях практически не изменялась, что указывает на проявление ею антиоксидантных свойств, которые сдерживают действие температурного влияния (рис. 3а, темные столбики). Рассчитанные величины АОА исследуемых

концентраций ПАБК представлены на рис. 3б. Показано, что при увеличении концентрации ПАБК величина АОА возрастает, однако в области 5,0 и 7,5 мМ эффект действия ПАБК стабилизируется и не изменяется.

На рис. 4а,б приведены результаты исследования действия Na-ПАБК на кинетику образования адrenoхрома и диформаза, продукта восстановления нитросинего тетразолия под действием супероксид-анионов, образующихся при автоокислении адреналина. Использование нитросинего тетразолия, как показано нами ранее [16], позволяет непосредственно идентифицировать образование $O_2^{\bullet-}$ в этой реакции. Хи-

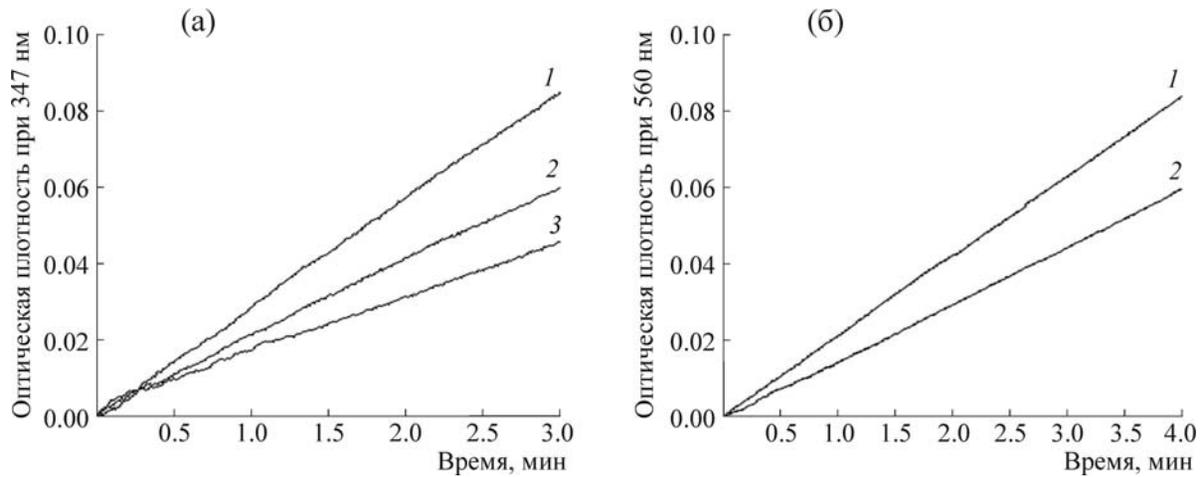


Рис. 4. Кинетика образования адренохрома (а) и диформазана (б) в присутствии Na-ПАБК: (а) – 1 – без Na-ПАБК, 2 – 5,0 мМ Na-ПАБК, 3 – 10,0 мМ Na-ПАБК; (б) – 1 – без Na-ПАБК, 2 – 10,0 мМ Na-ПАБК. Условия проведения реакции: 0,2 М карбонатный буфер, рН 10,55, при регистрации адренохрома (347 нм) вносится 0,23 мМ адреналина (а); при регистрации диформазана (560 нм) вносится 0,025 мМ нитросинего тетразолия и 0,029 мМ адреналина (б). Температура в кювете 20°C.

мизм этих процессов детально описан в литературе [22–23] и наших работах [16,17,24]. Таким образом, установлено, что Na-ПАБК также проявляет антиоксидантные свойства: наблюдается ингибирование как накопления адренохрома (рис. 4а, кривые 2 и 3), так и накопления диформазана (т.е. образования $O_2^{\bullet-}$) (рис. 4б, кривая 2).

Таким образом, на основании полученных результатов, можно заключить, что ПАБК и ее натриевая соль в супероксидгенирующей модельной системе реакции автоокисления адреналина проявили антиоксидантную активность. Сравнить рассчитанные величины АОА двух этих веществ не следует, поскольку условия проведения процедуры измерений не идентичны: по понятным причинам использовали теплый раствор ПАБК, а раствор Na-ПАБК имел комнатную температуру.

Необходимо отметить, что эффективно действующие концентрации ПАБК и Na-ПАБК были достаточно высокими (миллимолярные концентрации), в то время как другие, ранее исследуемые нами соединения – аскорбиновая кислота, цистеин, ионы меди – проявляли АОА при микромолярных дозах [14,16,25]. Недостаточность антиоксидантных свойств ПАБК отмечена и при окислительном стрессе, вызванном гипербарической оксигенацией (опыты *in vivo*) [10]. Более эффективным средством оказалась предложенная авторами смесь аллантиина и ПАБК, которая обладала большей антиоксидантной емкостью и мощностью, чем отдельные ее компоненты. Сделанный в работе [12] вывод, что

«...ПАБК не удаляет $O_2^{\bullet-}$ », возможно, также связан с недостаточным количеством используемого вещества.

Результаты нашей работы убедительно показали, что в условиях *in vitro* ПАБК и ее натриевая соль проявили антиоксидантную активность. Механизм их действия, возможно, связан с влиянием как на собственный путь химического превращения адреналина в процессе его окисления, так и на сопряженный с ним процесс переноса электронов от промежуточных продуктов окисляющегося адреналина на кислород, растворенный в среде. В последнем случае не исключается возможность непосредственного участия ПАБК в окислительно-восстановительных процессах в клетке. Этот вопрос может быть предметом дальнейшего исследования.

Свойство быть витамином, т.е. жизненно необходимым веществом, обусловлено, возможно, не только участием ПАБК в биосинтетических процессах, но и, благодаря наличию антиоксидантных свойств, непосредственным участием в процессах, связанных с переносом электронов. Такое предположение можно сделать на основании результатов настоящего исследования, показавшего наличие АОА для ПАБК и Na-ПАБК в модельной супероксидгенирующей системе.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Е. Ф. Иваненко, *Биохимия витаминов* (Вища школа, Киев, 1970), с. 108.

2. Z. Lu, X. Kong, Z. Lu, et al., PLoS One **9** (3), e91298 (2014), doi: 10.1371/journal.pone.0091298.
3. G. J. Basset, E. P. Quinlivan, S. Raveland, et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA **101** (6), 1496 (2004).
4. A. D. Hanson and J. F. Gregory, Current Opinion in Plant Biology **5**, 244 (2002).
5. S. J. Weinstein, T. J. Hartman, R. Stolzenberg-Solomon, et al., Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev. **12** (11, Pt 1), 1271 (2003).
6. С. И. Акберова, Изв. АН. Сер. биол. **4**, 477 (2002).
7. Т. П. Гальбинур и Е. А. Новикова, Офтальмология **9** (3), 57 (2012).
8. Инструкция врачам. Информационная брошюра «Актипол» для врачей, аптек и больных, www.aktipol.com.
9. Химические мутагены и пара-аминобензойная кислота в повышении урожайности сельскохозяйственных растений, под ред. А. И. Рапопорт (Наука, М., 1989).
10. Е. П. Гуськов, Т. П. Шкурат, Н. П. Милютин и др., Патент № 2228744, опубл. 20.05.2004.
11. С. А. Акберова, П. И. Мусаев, Н. М. Магомедов и др., Докл. РАН **361** (3), 419 (1998).
12. M.-L. Hu, Y.-K. Chen, L.-C. Chen, et al., J. Nutritional Biochem. **6**, 504 (1995).
13. С. А. Бекузарова, Н. А. Боме, Л. И. Вайсфельд и др., Вестн. Российской с.-х. науки **6** 48 (2011).
14. Т. В. Сирота, Вопр. мед. химии **45** (3), 263 (1999).
15. Т. В. Сирота, Патент РФ на изобретение № 2144674, Б.И. №2 (2000).
16. Т. В. Сирота, Биомед. химия **59** (4), 399 (2013).
17. Т. В. Сирота, в сб. Труды IX Международной конференции «Биоантиоксидант» (Москва, 2015), сс. 279–288.
18. Т. В. Сирота, Биомед. химия **62** (6), 650 (2016).
19. H.P. Misra and I. Fridovich, J. Biol. Chem. **247**, 3170 (1972).
20. Н. С. Эйгес, в сб. Химические мутагены и пара-аминобензойная кислота в повышении урожайности сельскохозяйственных растений, под ред. А. И. Рапопорт (Наука, М., 1989), сс. 99–123.
21. Г. В. Андреев, М. А. Карабасова, Л. В. Лютова и др., Докл. РАН **346** (2), 268 (1996).
22. A. Bindoli, M. P. Rigobello, and L. Galzigna, Toxicol. Lett. **48** (1), 3 (1989).
23. F. Marques, R. O. Duarte, J. J. Moura, and M. P. Bicho, Biol. Signals **5**, 275 (1996).
24. Т. В. Сирота, Биомед. химия **58** (1), 77 (2012).
25. T. V. Sirota, N. V. Lange, N. K. Kosjakova, et al., Curr. Topics Biophys. **24**, 185 (2000).

Antioxidant Properties of *para*-Aminobenzoic Acid and Its Sodium Salt

T.V. Sirota*, N.E. Lyamina*, and L.I. Weisfeld**

*Institute of Theoretical and Experimental Biophysics, Russian Academy of Sciences,
ul. Institutskaya 3, Pushchino, Moscow Region, 142290 Russia

**Emanuel Institute of Biochemical Physics, Russian Academy of Sciences, ul. Kosygina 4, Moscow, 119334 Russia

With the use of a superoxide-generating model system (the reaction of adrenaline autoxidation in an alkaline medium) it has been found that *para*-aminobenzoic acid, a substance from the group of vitamins, and its sodium salt possess antioxidant properties. These compounds inhibited the accumulation of adrenochrome, a product of adrenaline oxidation, and the formation of superoxide anions, detected by their reaction with nitro blue tetrazolium. We developed approaches to produce a true solution of *para*-aminobenzoic acid and established conditions to measure antioxidant activity of *para*-aminobenzoic acid and its sodium salt. The antioxidant properties of these compounds point to the possible participation of these compounds in redox reactions in the cell and can also be a contributor to their essentiality.

Keywords: *para*-aminobenzoic acid, sodium salt of *para*-aminobenzoic acid, adrenaline, adrenochrome, superoxide, nitro blue tetrazolium