

Г. С. Шаповал, Т. Ю. Кузнецова, В. В. Соловьев, О. С. Кругляк

**Электрохимическое исследование антиоксидантных свойств мелатонина***(Представлено академиком НАН Украины В. П. Кухарем)*

*Методами імпульсної вольтамперометрії та імпедансометрії досліджено властивості нейрого르몬у мелатоніну. Встановлено зниження висоти хвиль гідроксильних радикалів і пероксиду водню, а також негативний зсув потенціалу хвилі кисню під впливом мелатоніну. Аналіз отриманих даних дозволяє зробити припущення щодо механізму антирадикальної та антиокиснювальної активності мелатоніну, а також щодо можливості утворення комплексу останнього з молекулярним киснем.*

Существенно возросший интерес исследователей к мелатонину — нейрого르몬у шишковидной железы в значительной степени определяется его участием в системе защиты организма от агрессивного действия свободных радикалов в качестве эндогенного антиоксиданта, легкопроникающего сквозь клеточные мембраны [1]. Эффективность мелатонина при этом обычно сравнивают с такими жирорастворимыми антиоксидантами, как  $\beta$ -каротины и витамин Е. В то же время, благодаря некоторой растворимости в воде, мелатонин принимает участие в редокс-процессах, протекающих в водной физиологической среде клетки и межклеточном пространстве, взаимодействуя с активными продуктами восстановления кислорода [2].

Ранее с помощью квантово-химических расчетов было проведено теоретическое изучение антиоксидантной активности мелатонина по отношению к гидроксильному радикалу и супероксид-иону без учета влияния среды [3]. Однако эти данные с результатами экспериментальных исследований не сопоставлялись. Наиболее достоверным подтверждением правильности сделанных в работе [3] выводов могли быть данные, полученные *in vivo*. Тем не менее изучение механизма таких процессов *in vivo* сопряжено с большими экспериментальными трудностями, поскольку, во-первых, сложно вызвать образование в организме определенной концентрации активных форм кислорода (АФК), во-вторых, концентрацию сложно контролировать, так как при оксидативном стрессе организм защищает ферментативная система, представленная оксидазами и другими ферментами [4]. Только после истощения пула ферментов в действие вступают эндогенные низкомолекулярные антиоксиданты, к которым отнесен мелатонин. Поэтому относительно механизма его взаимодействия с АФК нет единой точки зрения.

Исходя из изложенного, мы попытались определить эффективность и изучить механизм антиоксидантного действия мелатонина *in vitro* в водном физиологическом растворе путем электрохимического генерирования гидроксильных радикалов и перекиси водорода в присутствии этого гормона. Исследования проводили с использованием разработанного ранее метода моделирования взаимодействия АФК с биологически активными веществами [5].

Это позволило подтвердить показанную с помощью квантово-химических расчетов антирадикальную активность мелатонина по его непосредственному влиянию на волны восстановления гидроксильных радикалов и установить антиокислительную активность по его влиянию на волны перекиси водорода.

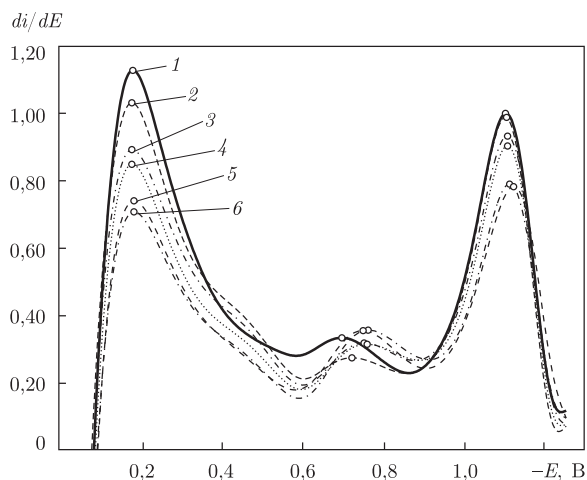
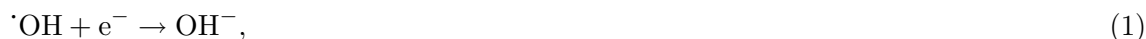


Рис. 1. Дифференциальные вольтамперограммы восстановления кислорода на медном электроде при разных концентрациях мелатонина: 1 — фон 0,1 моль/л NaCl;  $C$ ,  $10^{-3}$  моль/л: 0,39 (2); 0,74 (3); 1,07 (4); 1,67 (5); 2,19 (6)

**Материалы и методы исследований.** В качестве объекта изучения использовали мелатонин фирмы Merck (Германия) без дополнительной очистки. Раствор мелатонина в 0,1 моль/л водном NaCl готовили непосредственно перед измерениями. Фоновый электролит (0,1 моль/л NaCl — физиологический раствор) готовили из дважды перекристаллизованного NaCl квалификации “х. ч.” в бидистиллированной воде. Концентрация кислорода в растворе соответствовала равновесной при атмосферном давлении и температуре 20 °С.

Вольт-амперные исследования мелатонина проводили с помощью сопряженного с компьютером полярографа ПУ-1 в 3-электродной ячейке по разработанной нами методике [6]. Способность мелатонина к адсорбции на отрицательно заряженной поверхности электрода изучали методом спектроскопии электрического импеданса с помощью универсальной системы ACM Instruments Auto по 3-электродной схеме на фоне 0,1 моль/л NaCl по методике, описанной в статье [7]. В качестве рабочего использовали медный торцевой электрод, вспомогательным электродом служила платиновая пластина, потенциал (−0,2–−1,2 В) задавали относительно хлоросеребряного электрода сравнения.

**Результаты и их обсуждение.** При поляризации медного катода в импульсном режиме на вольт-амперной кривой (рис. 1) удается выделить волну самого молекулярного кислорода (2) при  $E = -0,6$  В, перекиси водорода (3) при  $E = -1,1$  В и гидроксильных радикалов (1) при  $E = -0,2$  В, образующихся в процессе одноэлектронного восстановления перекиси (3а). Последний процесс может служить электрохимической моделью реакции Фентона в организме:



Изменения в морфологии и количественных показателях вольт-амперной кривой при добавлении в фоновый раствор мелатонина позволяют оценить характер и степень взаимо-

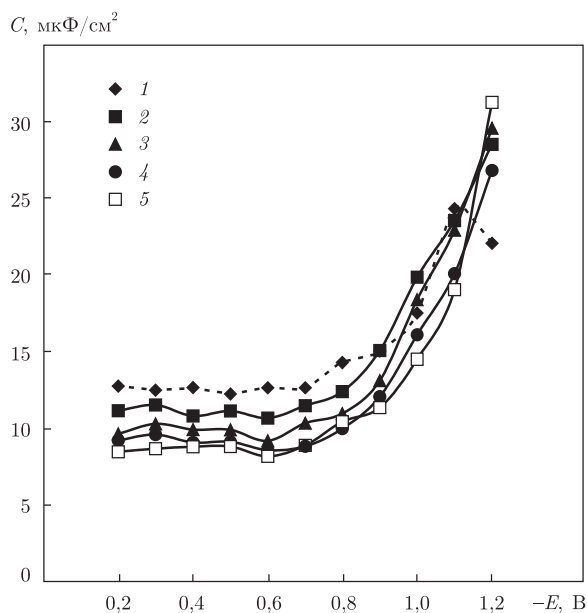


Рис. 2. Зависимость дифференциальной емкости ДЭС от потенциала медного электрода в продутом аргоном 0,1 моль/л растворе NaCl (1) при разных концентрациях мелатонина,  $10^{-3}$  моль/л: 0,2 (2); 0,39 (3); 0,57 (4); 1,53 (5)

действия последнего с кислородом и интермедиатами его восстановления. Так, в присутствии мелатонина на вольт-амперной кривой (см. рис. 1) наблюдается существенное снижение предельного тока первой волны, которое свидетельствует о достаточно интенсивном взаимодействии этого гормона с гидроксильными радикалами. В меньшей степени, чем для первой волны, с увеличением концентрации мелатонина снижается предельный ток третьей волны. Это, в свою очередь, свидетельствует о том, что мелатонин взаимодействует с образующейся на первой стадии восстановления кислорода перекисью водорода, однако менее интенсивно, чем с гидроксильными радикалами. Кроме того, на вольтамперограмме четко прослеживается растущий с увеличением концентрации мелатонина катодный сдвиг потенциала восстановления кислорода, характерный для комплексообразования [8].

Анализ наблюдающихся под влиянием мелатонина изменений вольт-амперных кривых позволяет полагать, что мелатонин взаимодействует с гидроксильными радикалами и с перекисью водорода непосредственно в процессе их образования в двойном электрическом слое (ДЭС). Эти предположения подтверждаются результатами исследования адсорбции мелатонина на поверхности катода в присутствии и в отсутствие кислорода.

Добавление мелатонина в раствор фона, предварительно продутого аргоном, вызывает значительное снижение емкости ДЭС, особенно при потенциале восстановления молекулярного кислорода (рис. 2). В том случае, когда мелатонин добавляли в присутствии кислорода, емкость ДЭС почти не изменялась. Мелатонин практически не вытесняет с поверхности электрода адсорбированный кислород, а адсорбируется вместе с ним. При этом степень заполнения мелатонином ( $\theta$ ) поверхности катода, как свидетельствуют рассчитанные по уравнению Ленгмюра и представленные на рис. 3 изотермы адсорбции, в отсутствие кислорода значительно выше, чем в присутствии последнего. По-видимому, с молекулой мелатонина координируются не одна, а две или больше молекул кислорода, и образовавшийся на поверхности электрода комплекс имеет не горизонтальную, а вертикальную ори-

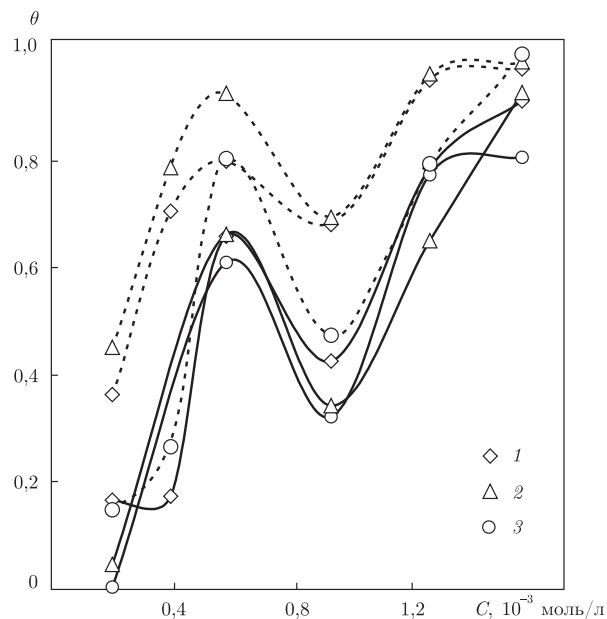


Рис. 3. Зависимость степени заполнения медного электрода мелатонином от его концентрации при потенциалах медного электрода:  $-0,2$  В (1);  $-0,6$  В (2);  $-1,1$  В (3) в присутствии кислорода (сплошная линия) и при продувке аргоном (штриховая линия)

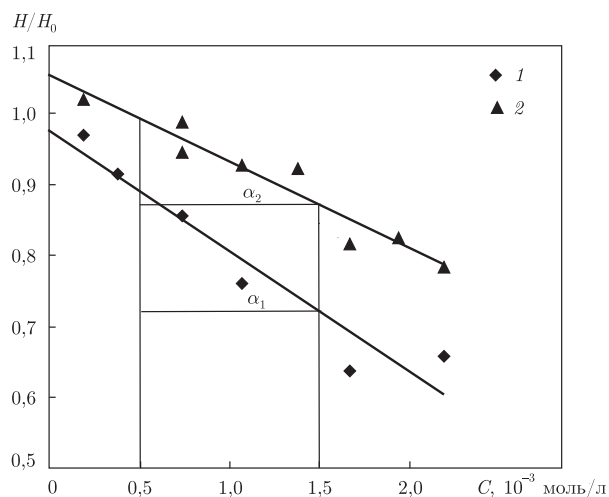


Рис. 4. Зависимость относительного изменения высоты волн восстановления кислорода на медном электроде от концентрации мелатонина: 1 — первая волна; 2 — третья волна

ентацию, что приводит к уменьшению площади, занимаемой одной молекулой мелатонина на поверхности электрода.

Таким образом, авторами данного сообщения обнаружено более интенсивное взаимодействие мелатонина с гидроксильными радикалами, чем с перекисью водорода, что может быть в определенном приближении количественно охарактеризовано величиной тангенса угла наклона кривой зависимости относительного изменения высоты волны гидроксильных радикалов ( $\text{tg } \alpha_1 = 0,68$ ) и перекиси водорода ( $\text{tg } \alpha_2 = 0,45$ ) от концентрации мелатонина (рис. 4). Полученные результаты хорошо согласуются с данными квантово-химических расчетов [3] молекулы мелатонина.

Кроме того, обнаруженный нами катодный сдвиг потенциала волны молекулярного кислорода в присутствии мелатонина и результаты емкостных измерений позволяют считать очевидным образование его комплекса с кислородом, что может служить простым и достаточно обоснованным объяснением участия мелатонина в транспорте кислорода в организме.

1. Беленичев И. Ф., Губский Ю. И., Левицкий Е. Л. и др. Регуляция антиоксидантного гомеостаза и системы детоксикации организма гормоном мелатонином. Роль мелатонин-зависимых рецепторов в реализации этой функции // Соврем. пробл. токсикологии. – 2003. – № 2. – С. 2–16.
2. Левин Я. И. Мелатонин и неврология // Рус. мед. журн. – 2007. – № 24. – С. 1851–1855.
3. Соловьев В. В., Кузнецова Т. Ю. Квантово-химическое обоснование процессов влияния биологического поля гормона мелатонина на свободные радикалы  $\cdot\text{OH}$ ,  $\text{O}_2^-$  // Вісн. Кременчуц. держ. політехн. ун-ту ім. М. Остроградського. – 2007. – Вип. 6, ч. 1. – С. 129–131.
4. Чеснокова Н. П., Понукалина Е. В., Бизенкова М. Н. Молекулярно-клеточные механизмы инактивации свободных радикалов в биологических системах // Успехи соврем. естествознания. – 2006. – № 7. – С. 29–36; С. 37–41.
5. Громова В. Ф., Шаповал Г. С., Кухарь В. П., Пивень В. И. Электрохимическое моделирование элементарных стадий окислительно-восстановительных реакций в биосистемах // Доп. НАН України. – 1995. – № 3. – С. 92–94.
6. Громова В. Ф., Шаповал Г. С., Миронюк И. Е. Исследование антирадикальной и антиокислительной активности биологически активных карбоновых кислот // Журн. общ. химии. – 2002. – 72, вып. 5. – С. 828–831.
7. Миронюк И. Е., Шаповал Г. С., Громова В. Ф. и др. Влияние строения на адсорбцию аминокислот на медном электроде // Теорет. и эксперим. химия. – 2004. – № 2. – С. 105–109.
8. Делимарский Ю. К., Грищенко В. Ф., Городыский А. В. Сдвиг полярограмм при комплексообразовании // Укр. хим. журн. – 1963. – 29, № 5. – С. 497–502.

Институт биоорганической химии  
и нефтехимии НАН Украины, Киев

Поступило в редакцию 15.01.2009

**G. S. Shapoval, T. Yu. Kuznetsova, V. V. Soloviev, O. S. Kruglyak**

### **Electrochemical investigation of melatonin antioxidant properties**

*Properties of a neurohormone, melatonin, have been studied by the methods of pulse voltammetry and impedancemetry. A decrease in the current of hydroxyl radicals and hydrogen peroxide waves and a negative shift in the oxygen wave potential under the influence of melatonin have been observed. The analysis of the obtained results gives the opportunity of getting the concept of the antiradical and antioxidant activity of melatonin. The same results indicate the possibility of the formation of a complex between melatonin and molecular oxygen.*