

□ Оригинальные научные публикации

Н. А. Бизунок¹, О. С. Рашкевич¹, Б. В. Дубовик¹, О. И. Шадыро²

АНТИОКСИДАНТНЫЕ СВОЙСТВА ПРОИЗВОДНЫХ БЕНЗОЙНОЙ КИСЛОТЫ И КУМАРИНА НА МОДЕЛИ NOX2-ЗАВИСИМОЙ ГЕНЕРАЦИИ АКТИВНЫХ ФОРМ КИСЛОРОДА В МАКРОФАГАХ

¹УО «Белорусский государственный медицинский университет»,

²УО «Белорусский государственный университет»

На модели Nox2-зависимой генерации активных форм кислорода (АФК) показана высокая антиоксидантная активность бензойной кислоты ($IC_{30} = 7,0$); 2,3-дигидроксибензальдегида ($IC_{30} = 6,24$); куркумина ($IC_{30} = 6,35$). Основными структурными детерминантами, определяющими антиоксидантный потенциал являются сопряжение бензольного кольца с гидроксигруппой (-OH) и метоксигруппой (-OCH₃), их количество и взаиморасположение.

Ключевые слова: антиоксиданты, активные формы кислорода, макрофаги, респираторный взрыв, производные кумарина, производные бензойной кислоты.

N. A. Bizunok, O. S. Rashkevich, B. V. Dubovik, O. I. Shadyr

ANTIOXIDATIVE PROPERTIES OF BENZOIC ACID AND COUMARIN DERIVATIVES ON THE MODEL OF NOX2-DEPENDENT REACTIVE OXYGEN SPECIES GENERATION IN MACROPHAGES

On the model of enzymatic Nox2-dependent generation of reactive oxygen species (ROS) has been shown a high antioxidant activity of benzoic acid ($IC_{30} = 7,0$); 2,3-dihydroxybenzaldehyde ($IC_{30} = 6,24$); curcumin ($IC_{30} = 6,35$). Antioxidant capacity is determined by the intensity of the structural determinants of the studied substances: bridging a benzene ring with HO- and CH₃-O-groups, their number and location.

Key words: antioxidants, reactive oxygen species, macrophages, respiratory burst, derivatives of coumarin, derivatives of benzoic acid.

Полифенолы, обладающие не только антирадикальными свойствами, но и разнообразной фармакологической активностью, относятся к числу наиболее востребованных в медицинской практике антиоксидантов [0]. С позиции изыскания модификаторов редокс-ассоциированных патологических состояний, таких как ишемическо-реперфузионные повреждения, особое внимание среди них привлекают производные бензойной кислоты и кумарина, обладающие антиагрегантной и антикоагулянтной активностью. Сочетание этих эффектов с антирадикальными свойствами значительно расширяет спектр фармакологической активности подобных соединений. Более того, структурные особенности производных бензойной кислоты и кумарина создают предпосылки для проявления не только прямой реакционной способности в отношении биогенных активных форм кислорода (АФК), но и позволяют прогнозировать их активность в отношении ферментов-генераторов АФК, таких как НАДФН-оксидазы (Nox), ксантинооксидазы, миелопероксидазы. Наличие такой активности может обеспечить высокую надежность и устойчивость редокс-регуляции в биосистемах и *in vivo* [0]. В этой связи актуальным представляется изучение механизмов и структурных детерминант антиоксидантного действия производных бензойной кислоты и кумарина на биологически ревалентных моделях.

Целью настоящего исследования было изучить характер действия и структурные детерминанты антиоксидантной активности производных кумарина и бензойной кислоты на модели Nox2-зависимой генерации АФК в макрофагах.

Материал и методы

Среды и реагенты. В работе использовали: люминесцентный зонд люминол (5-амино-2,3-дигидро-1,4-фталазинол) – «Sigma-Aldrich» (Германия); среду Хенкса без индикатора, сыворотку крови крупного рогатого скота – ФГУП «ИПВЭ», Россия; гепарин – РУП «Белмедпрепараты», Беларусь; зимозан (сухие пекарские дрожжи). Изучены производные кумарина и бензойной кислоты («Sigma-Aldrich»,

Германия): кумарин (С1), 6,7-дигидроксикумарин (С2), 7,8-дигидрокси-6-метоксикумарин (С3), дикумарол (С4), вербенон (С6), цис-вербенон (С7), бензойная кислота (В1), 2,3-дигидрокси-бензальдегид (В2), кониферилловый альдегид (В3), синаповый альдегид (В4), куркумин (В5).

Выделение клеток. Исследования выполнены на изолированных перитонеальных макрофагах крыс-самцов линии Wistar, массой 180–220 г. Клетки получали промыванием брюшной полости 20 мл средой Хенкса с гепарином (10 Ед /мл), отмывали и ресуспендировали в бесцветной среде Хенкса. По результатам теста с трипановым синим (0,1%), полученная суспензия содержала более 98% жизнеспособных клеток, при дифференцированном подсчете которых в окрашенных мазках макрофаги составляли около 90%. В максимальной испытанной концентрации (10^{-4} М) производные кумарина и бензойной кислоты не влияли на жизнеспособность клеток.

Изучение макрофагальной генерации АФК выполняли методом люминолзависимой хемолюминесценции (ХЛ) в условиях взрывной (ИХЛ) генерации АФК на люминометре LKB-Wallak 1251-002 (Финляндия). Генерацию АФК оценивали после 10-минутной инкубации клеток с изучаемым агентом в интервале концентраций 10^{-8} – 10^{-4} М при температуре 20–25 °С. Каждый опыт выполнялся на клетках одного животного и включал весь изучаемый диапазон концентраций. При исследовании ИХЛ проба содержала в 1 мл бесцветной среды Хенкса: 10^6 жизнеспособных макрофагов, люминол ($7 \cdot 10^{-5}$ М), опсонизированный зимозан ($5 \cdot 10^7$ частиц), который вносили непосредственно перед регистрацией свечения, изучаемое вещество (10^{-8} – 10^{-4} М), в контрольные пробы добавляли эквивалентное количество среды.

Люминесценцию регистрировали поочередно в пробах содержащих изучаемый агент и контрольных, при постоянной температуре (37 °С), в дискретном режиме с интервалом 2–3 минуты, на протяжении 30 минут. Продукцию АФК

оценивали по площади под кривой хемилюминесценции (AUC ХЛ).

Обработка и статистический анализ результатов исследования. Показатели ХЛ проб, содержащих изучаемые агенты, выражали в процентах по отношению к контрольным значениям. Статистическую обработку первичных результатов внутри серии проводили с использованием парного t-критерия, межсерийные сравнения выполняли по t-критерию Стьюдента, различия считали достоверными при вероятности ошибки < 5% ($p < 0,05$). Антиоксидантную активность соединений оценивали по степени подавления ХЛ, вычисляя эффективные ингибирующие концентрации ($IC_{16}-IC_{84}$) методом регрессионного анализа с использованием программного пакета «Statistica 6.1» и математических преобразований по Chou [0] при помощи специально разработанного интерактивного алгоритма.

Результаты и обсуждение

Как видно из таблицы, большей эффективностью по критерию E_{max} (>65%) обладали бензойная кислота В1 (72,4%) и её производные В4 (90%), В2 (80,9%), В3 (78,5%), В5 (68,3%), а также отдельные производные кумарина С4 (88,4%), С7 (77,8%). Большинство производных кумарина (С3 (58,4%); С6 (56,7%); С2 (53,5%), С1 (48,7%)) уступали по эффективности производным бензойной кислоты.

Анализ активности по показателям IC_{30} и IC_{50} (представлен в виде $-\log [C, M]$) позволил разделить испытанные соединения на менее активные ($IC_{30} > 5,5$; $IC_{50} > 4,5$), среди которых доминировали производные кумарина – С1 (4,88; 3,98), С3 (5,41; 4,28), С6 (4,96; 4,32) и более активные ($IC_{30} < 5,5$; $IC_{50} < 4,5$), включавшие производное кумарина С4 (5,99; 5,36) и большинство производных бензойной кислоты – В1 (7,00; 5,41), В2 (6,24; 5,34), В3 (5,80; 4,83), В5 (6,35; 5,26). Промежуточное положение заняли соединения В4 (5,00; 4,61), С2 (6,40; 4,53) и С7 (5,46; 4,80) из-за существенного изменения крутизны зависимости «концентрация-эффект» в сравнении со структурными аналогами.

Сопоставление этих данных свидетельствует о том, что в целом антиоксидантная активность испытанных соединений положительно коррелирует с их максимальной эффективностью. На модели Nox2-зависимой генерации АФК производные кумарина (С1-С7) уступают по совокупному антиоксидантному потенциалу производным бензойной кислоты (В1-В5).

Анализ структура-действие в группе производных бензойной кислоты. При изучении бензойной кислоты (В1) и ее производных было установлено, что соединения В2 и В3 имеют приблизительно одинаковую крутизну зависимости «концентрация-эффект», различаются по активности и эффективности с прототипом и между собой. Соединение В4, обладая большей крутизной зависимости «концентрация-эффект», превосходит соединения В2 и В3 в максимальной эффективности, но уступает им в активности (таблица).

Анализ структуры бензойной кислоты (В1) и ее производных (В2, В3, В4) показал, что наличие и местоположение гидрокси- (ОН-) и метокси- (CH_3O -) групп в бензольном кольце молекулы имеет решающее значение для формирования антиоксидантного профиля. Наибольшую активность показала бензойная кислота (В1). Соединение В2 – пирокатехиновый альдегид, содержащий гидроксилы в орто- и мета- положении по отношению к карбонильной группе, имел несколько большую крутизну зависимости «концентрация-эффект», что определяло его отличие в профиле активности от прототипа (рисунок 1).

Соединение В3, отличающееся от соединения В2 наличием в структуре винилового фрагмента, ОН- заместителем

Таблица – Эффективные ингибирующие концентрации (IC_{16-84}) производных кумарина и бензойной кислоты на модели Nox2-зависимой генерации АФК в макрофагах

Шифр	$E_{max}^1, \%$ ($M \pm m$)	ИД ² , (-Log [C, M])	IC ³ (-Log [C, M])				Коэффициенты регрессии	
			16	30	50	84	a	b
С1	-48,7±8,8	6,00–4,00	5,51	4,88	3,98	–	-38,8	-22,3
С2	-53,5±1,9	7,00–4,00	7,71	6,40	4,53	–	1,53	-10,7
С3	-58,4±9,2	7,00–4,00	6,20	5,41	4,28	–	-25,68	-17,68
С4	-87,4±3,1	6,00–4,00	6,44	5,99	5,36	4,28	-118,81	-31,5
С6	-56,7±8,5	6,00–4,00	5,42	4,96	4,32	–	-83,62	-30,95
С7	-77,8±4,6	6,00–4,00	5,92	5,46	4,80	–	-94,62	-30,15
В1	-72,4±3,7	8,00–4,00	8,11	7,00	5,41	–	-18,17	-12,60
В2	-80,9±1,9	7,00–4,00	6,87	6,24	5,34	3,80	-67,92	-22,10
В3	-78,5±0,4	7,00–4,00	6,43	5,80	4,89	–	-57,88	-22,06
В4	-90±2,3	5,00–4,00	5,28	5,00	4,61	3,94	-183,49	-50,68
В5	-68,3±1,1	7,00–4,00	7,12	6,35	5,26	–	-45,88	-18,24

Примечание к таблице. ¹ E_{max} – максимальный эффект, в % подавления ХЛ, указано среднее значение и ошибка среднего; ²ИД – исследованный диапазон концентраций; ³IC – ингибирующие концентрации в диапазоне E_{16-84} . Значения ИД, IC представлена в виде отрицательного десятичного логарифма молярных концентраций (-Log [C, M]). Уравнение регрессии: $y = a \pm b * \lg [C]$. Приведены статистически достоверные данные регрессионного анализа ($P < 0,05$).

тител в пара-положении и CH_3O - заместителя в мета-положении, имело аналогичную крутизну зависимости «концентрация-эффект», но уступало ему в активности. В свою очередь соединение В4, структурно отличающееся от соединения В3 наличием дополнительной CH_3O - группы в мета- положении демонстрировало увеличение угла наклона зависимости «концентрация-эффект» и ассоциированное с этим изменение диапазона эффективных концентраций. В свою очередь димеризация соединения В3 с образованием соединения В5 (куркумина) приводило

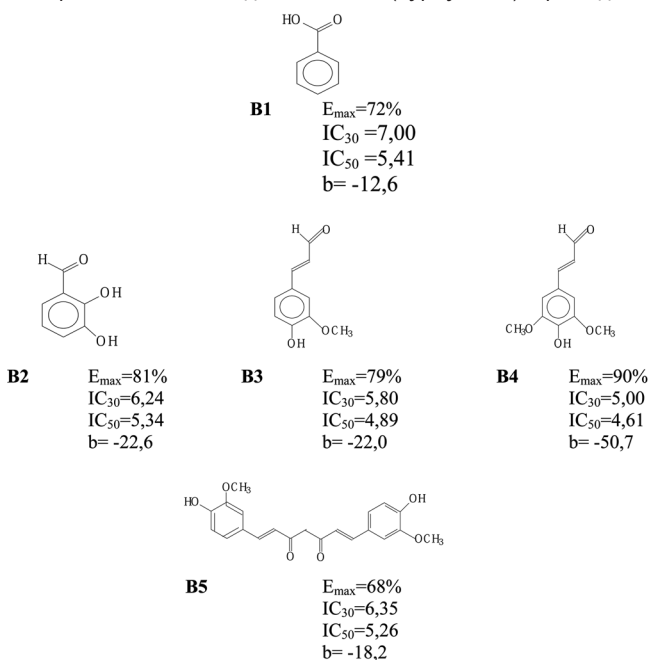


Рисунок 1 – Структура, активность (IC_{30-50}) и максимальная эффективность (E_{max}) производных бензойной кислоты (В1-В5)

Пояснения к рис. 1. В1 – бензойная кислота, В2 – 2,3-дигидроксибензальдегид (пирокатехиновый альдегид), В3 – киниферилый альдегид, В4 – синаповый альдегид, В5 – куркумин. Здесь и далее b – коэффициент наклона зависимости «концентрация-эффект», рассчитанный по уравнению линейной регрессии $y = a \pm b * \lg [C]$.

Оригинальные научные публикации

к уменьшению угла наклона зависимости «концентрация-эффект» со снижением E_{max} .

Анализ структура-действие обнаруживает две разнонаправленные тенденции – вне зависимости от иных структурных детерминант с увеличением количества свободных гидроси- групп в бензольном кольце растет антиоксидантная активность производных бензойной кислоты; с увеличением количества экранирующих гидроксил метокси- групп – нарастает крутизна зависимости «концентрация-эффект» и увеличивается максимальная эффективность производных. Противоположную тенденцию демонстрирует димеризация.

В этой связи выбор антиоксиданта будет зависеть от того, какой конечный результат необходимо достичь. Если востребован наиболее эффективный антиоксидант, то выбирать следует среди таких соединений, как В4 (синаповый альдегид), в случае предпочтительности полумаксимальных эффектов, наиболее подходящими являются соединения В2 (пирокатехиновый альдегид) и его несимметричный димер куркумин (В5).

Анализ структура-действие в группе производных кумарина. На модели Nox2-зависимой генерации АФК в макрофагах большую максимальную эффективность обнаружили соединения С4 (88,4%) и С7 (77,8%), меньшую – С3 (58,4%); С6 (56,7%); С2 (53,5%), С1 (48,7%), что в значительной степени коррелирует с их активностью. Наиболее активным по показателям IC_{30} и IC_{50} оказалось соединение С4 (5,99; 5,36), несколько меньшую активность демонстрировали соединения С2 (6,40; 4,53) и С7 (5,46; 4,80), уступали им соединения С1 (4,88; 3,98), С3 (5,41; 4,28), С6 (4,96; 4,32) (таблица).

Анализ структуры изученных соединений показывает, что наличие в молекуле хотя бы одного гидроксильного заместителя играет решающую роль в проявлении их антиоксидантного потенциала. Так, кумарин (С1), не имеющий в своей структуре гидроси- групп проявил низкую антиоксидантную активность. В свою очередь, соединение С2,

структурно отличающееся от соединения С1 наличием двух гидроксильных заместителей, оказалось на несколько порядков активней (рисунок 2).

Аналогичная особенность наблюдалась в отношении соединений С6 и С7. Соединение С6, не имеющее в своей структуре НО- групп, так же как и кумарин (соединение С1) обладало относительно низким антиоксидантным потенциалом. В свою очередь, соединение С7, структурно отличающееся от соединения С6 наличием одного гидроксильного заместителя, проявило гораздо более высокую антиоксидантную активность (рисунок 2).

Как и в группе производных бензойной кислоты, антиоксидантный профиль кумаринов зависит от наличия в молекуле метоксильных заместителей и их расположения по отношению к гидросилам (пара С2-С3). Соединение С3 (7,8-дигидрокси-6-метоксикумарин) обладает большей крутизной зависимости «концентрация-эффект» в сравнении с прототипом (соединение С2) и большей эффективностью в максимальной испытанной концентрации. Димеризация соединения С2 в С4 (дикумарол) ведет к снижению максимальной эффективности и уменьшению крутизны зависимости «концентрация-эффект».

Выводы

1. На модели Nox2-зависимой генерации АФК в макрофагах-резидентах бензойная кислота (В1) и её производные (соединения В2-В5) обладают выраженной антиоксидантной активностью в диапазоне концентраций, не проявляющих острой цитотоксичности (10^{-8} – 10^{-4} М).

2. По совокупному антиоксидантному потенциалу, учитываемому антиоксидантную активность на уровне E_{16-50} и максимальную эффективность (E_{max}), производные кумарина (соединения С1-С7) уступают производным бензойной кислоты (соединения В1-В5) в отношении АФК, генерируемых Nox2 макрофагов.

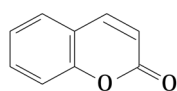
3. Полученные результаты дают основание выделить следующие детерминанты антиоксидантного профиля производных бензойной кислоты (соединения В1-В5) и кумарина (соединения С1-С7). Антиоксидантная активность положительно коррелирует с количеством свободных гидроксильных групп в молекуле, димеризация ведет к уменьшению крутизны зависимости «концентрация-эффект» и снижению E_{max} . Появление метоксильной группы в орто- положении по отношению к гидросилам демонстрирует противоположную тенденцию.

4. Выбор антиоксиданта определяется предпочтительностью максимальных или полумаксимальных эффектов. В последнем случае димеры (дикумарол и куркумин) имеют преимущество, обусловленное не только их антиоксидантным профилем, но и более низкой токсичностью *in vivo*.

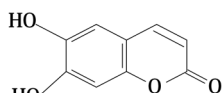
Литература

1. Едимечева, И. П. Взаимодействие пространственно экранированных фенолов и хинонов с органическими радикалами // И. П. Едимечева, Н. И. Островская, Г. И. Полозов, О. И. Шадыро // Журнал общей химии. 2005. Т. 75. Вып. 4. С. 632–635.
2. Bir SC Redox balance dynamically regulates vascular growth and remodeling / SC. Bir, GK. Kolluru, K Fang, CG. Kevil // Semin Cell Dev Biol. 2012. V. 23 (7). P. 745–757.
3. Chou T-Ch. Theoretical basis, experimental design, and computerized simulation of synergism and antagonism in drug combination studies / T-Ch Chou // Pharmacological reviews. 2006. V. 58. P. 621–681.

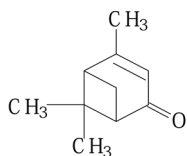
Поступила 28.09.2012 г.



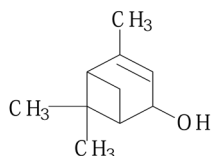
C1 $E_{max}=49\%$
 $IC_{30}=4,88$
 $IC_{50}=3,98$
 $b=-22,3$



C2 $E_{max}=54\%$
 $IC_{30}=6,40$
 $IC_{50}=4,53$
 $b=-10,7$



C6 $E_{max}=57\%$
 $IC_{30}=4,96$
 $IC_{50}=4,32$
 $b=-30,9$



C7 $E_{max}=78\%$
 $IC_{30}=5,46$
 $IC_{50}=4,80$
 $b=-30,2$

Рисунок 2 – Структура, антиоксидантная активность (IC_{30-50}) и максимальная эффективность (E_{max}) производных кумарина

Пояснения к рис. 2. С1 – кумарин, С2 – 6,7-дигидроксикумарин, С6 – вербенон, С7 – цис-вербенон.