

УДК 547-31/-39+542.978+542.87+547.56+547.814.5

АКТИВНОСТЬ ГИДРОКСИПРОИЗВОДНЫХ ХАЛКОНОВ В ОТНОШЕНИИ СУПЕРОКСИД АНИОН-РАДИКАЛА

© 2021 г. М. А. Половинкина¹, В. П. Осипова^{1,*}, А. Д. Осипова², Н. Т. Берберова²,
А. В. Великородов³, академик РАН Г. Г. Матишов¹

Поступило 29.05.2021 г.

После доработки 23.08.2021 г.

Принято к публикации 26.08.2021 г.

Проведено исследование поглощающей активности новых гидроксипроизводных халконов в отношении супероксид анион-радикала ($O_2^{\bullet-}$), генерированного электрохимически, в ферментативной системе ксантин/ксантиноксидаза при восстановлении нитросинего тетразолия, а также в процессе неферментативного хиноидного окисления адреналина в щелочной среде. Впервые установлена антирадикальная активность новых гидроксипроизводных халконов в отношении $O_2^{\bullet-}$. Взаимодействие с электрохимически генерированным $O_2^{\bullet-}$ и высокая антирадикальная активность в условиях аутоокисления адреналина в щелочной среде установлены для халкона, содержащего 2,6-ди-*трет*-бутилфенольный фрагмент. Наибольшую поглощающую активность в ферментативной системе ксантин/ксантиноксидаза и СОД-протекторную активность проявил халкон с двумя незэкранированными ОН-группами. Ингибирующая активность гидроксипроизводных халконов в отношении $O_2^{\bullet-}$ согласуется с результатами прогноза *in silico* и свидетельствует об их способности снижать вероятность развития окислительного стресса. Установлена корреляция между способностью исследованных халконов утилизировать супероксид анион-радикал и ингибирующей активностью в модельных системах пероксидного окисления олеиновой кислоты и липидов печени тилапии.

Ключевые слова: гидроксипроизводные хроменов, пространственно-затрудненный фенольный фрагмент, антиоксидантная активность, супероксид анион-радикал

DOI: 10.31857/S2686953521050150

Несбалансированные биохимические нарушения, возникающие в биологических системах, приводят к образованию активных форм кислорода (АФК), которые провоцируют развитие многих патологических состояний [1]. Одной из активных форм кислорода в живых организмах является супероксид анион-радикал (надпероксид-анион, $O_2^{\bullet-}$), образующийся в процессе одно-электронного восстановления O_2 [2]. Роль $O_2^{\bullet-}$ в организме двойственна: в нормальных условиях он участвует в клеточной активности контроли-

руемым образом, в избытке же он способен повреждать биологические молекулы, в том числе нуклеиновые кислоты, липиды, белки, вызывая острые и хронические нарушения метаболических путей [3].

Существует естественная эндогенная защитная антиоксидантная система, например: супероксиддисмутаза (СОД), супероксидредуктаза, — которая эффективно удаляет $O_2^{\bullet-}$ и другие АФК. При сбое обмена веществ или под воздействием внешних факторов эндогенная клеточная защита не справляется с последствиями окислительного стресса [4]. Природные и синтетически полученные соединения, которые могут быстро утилизировать $O_2^{\bullet-}$, являются перспективными антиоксидантами, поскольку могут снижать токсическое действие АФК за счет обрыва свободно-радикальных процессов, что является важным при профилактике и лечении патологических состояний.

С целью снижения риска проявления нежелательных побочных эффектов предпочтение отда-

¹ Федеральный исследовательский центр
Южный научный центр Российской академии наук,
344006 Ростов-на-Дону, Россия

² Астраханский государственный технический
университет, 414056 Астрахань, Россия

³ Астраханский государственный университет,
414056 Астрахань, Россия

*E-mail: osipova_vp@mail.ru

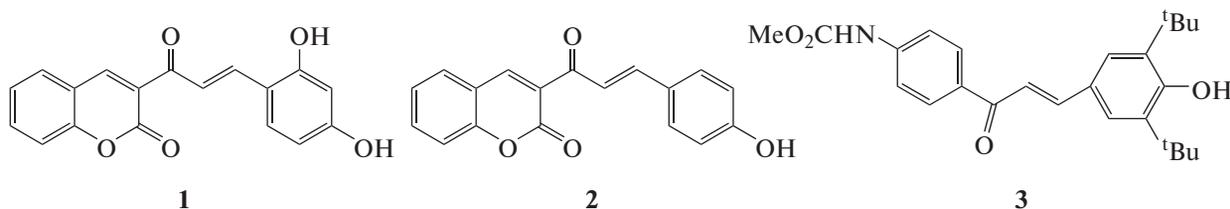


Рис. 1. Структурные формулы соединений: **1** – 3-[(*E*)-3-(2,4-дигидроксифенил)-2-пропеноил]-2*H*-хромен-2-он, **2** – 3-[(*E*)-3-(4-гидроксифенил)-2-пропеноил]-2*H*-хромен-2-он, **3** – метил-*N*-(4-[(*E*)-3-[3,5-ди(*tert*-бутил)-4-гидроксифенил]-2-пропеноил]фенил)карбамат.

ются соединениям, которые встречаются в продуктах растительного происхождения, например, флавоноидам, и обладают широким спектром биологической активности, в том числе антиоксидантными свойствами [5, 6]. В то же время многие антиоксиданты природного происхождения, флавоноиды в том числе, имеют ряд недостатков, таких как малая растворимость, недостаточная биодоступность при пероральном приеме, низкая системная абсорбция, высокая скорость их выведения из организма, а также образование токсичных метаболитов [7, 8]. Кроме того, ранее было установлено, что флавоноиды могут проявлять прооксидантные свойства при применении их в высоких концентрациях [9]. Все вышеперечисленное ограничивает применение антиоксидантов растительного происхождения в терапевтических целях и способствует созданию новых высокоэффективных и безопасных фармакологически активных соединений, содержащих различные биомиметические редокс-активные и фармакофорные группы, различающиеся по механизму антиоксидантного действия.

Ранее были синтезированы новые гидроксипроизводные халконов **1–3** (рис. 1), для которых с высокой вероятностью была предсказана *in silico* способность выступать в качестве антиоксидантов, ловушек свободных радикалов, кислорода и оксида азота [10].

В работе исследована поглощающая активность данных халконов **1–3** в отношении $O_2^{\cdot-}$, генерированного электрохимически, в ферментативной системе ксантин/ксантинооксидаза, а также в процессе неферментативного хиноидного окисления адреналина в щелочной среде.

Антиоксидантное действие потенциальных ингибиторов окислительных процессов во многом обусловлено активностью по отношению к различным видам АФК. Супероксид анион-радикал $O_2^{\cdot-}$ образуется в процессе одноэлектронного восстановления кислорода, поэтому для исследования возможности взаимодействия потенциальных антиоксидантов с данной АФК удобно применять электрохимические методы исследования. Преимуществами электрохимического метода яв-

ляются высокая чувствительность, скорость и воспроизводимость показателей, но прежде всего отсутствие побочных продуктов, так как апротонный растворитель способствует стабилизации радикала и препятствует дисмутации $O_2^{\cdot-}$, что обеспечивает гораздо более точное измерение способности улавливания активных радикалов [11].

Электровосстановление кислорода на Pt-электроде в ацетонитриле приводит к образованию $O_2^{\cdot-}$, фиксируемого на циклической вольтамперограмме (ЦВА) (CH_3CN , Pt, 0.1 М nBu_4NClO_4 , $C = 5$ мМ, Ag/AgCl, $v = 0.2$ В c^{-1}) [12]. В присутствии гидроксипроизводных халконов **1** и **2** не отмечено изменений на ЦВА, что свидетельствует об отсутствии их активности в отношении электрохимически генерированного $O_2^{\cdot-}$, несмотря на наличие в структурах систем переноса атомов водорода и электронов – OH-групп.

Взаимодействие соединения **3** с $O_2^{\cdot-}$ приводит к исчезновению обратимости стадии восстановления O_2 (рис. 2).

Уменьшение высоты анодного пика окисления супероксид анион-радикала и увеличение высоты катодного пика указывают на необратимое взаимодействие соединения **3** с $O_2^{\cdot-}$. На обратной ветви ЦВА появляется новый анодный пик при потенциале +0.05 В, что, предположительно, объясняется образованием соответствующего фенолят-аниона при отрыве $O_2^{\cdot-}$ атома водорода от OH-группы халкона **3**, как показано на схеме 1.

Полученные результаты свидетельствуют об активности соединения **3** в отношении $O_2^{\cdot-}$, генерированного электрохимически, что объясняется наличием пространственно-затрудненного фенольного фрагмента, способствующего образованию стабильного интермедиата.

Изучена ингибирующая активность соединений **1–3** в отношении $O_2^{\cdot-}$, генерированного в ферментативной системе ксантин/ксантинооксидаза при восстановлении нитросинего тетразолия

(НСТ-тест) до формазана синего цвета, с максимальным поглощением при 560 нм. Количество восстановленного нитросинего тетразолия прямо пропорционально количеству $O_2^{\cdot-}$, продуцируемого в модельной системе, поэтому снижение концентрации восстановленного формазана свидетельствует об антирадикальной активности соединения.

Установлена незначительная ингибирующая активность халконов **1–3** в отношении $O_2^{\cdot-}$, образующегося в ферментативной системе. Высокая способность утилизировать $O_2^{\cdot-}$ в НСТ-тесте выявлена для соединения **1** ($41.3 \pm 0.09\%$ ингибирования), отличительной особенностью которого является наличие двух гидроксильных групп, в отличие от соединений **2** и **3**, активность которых составила 28.4 ± 0.04 и $29.5 \pm 0.06\%$ соответственно (рис. 3).

Учитывая то, что в данной модельной системе, в зависимости от pH среды, возможно автоокисление флавоноидов, а также то, что образующийся формазан плохо растворим в воде [13], полученные показатели не дают правильного представления о способности исследуемых соединений утилизировать $O_2^{\cdot-}$. Поэтому в работе исследована активность гидроксипроизводных халконов в отношении $O_2^{\cdot-}$, полученного в модельной системе аутоокисления адреналина в щелочной среде (pH 10.65) до адренохрома, регистрируемого при $\lambda = 347$ нм [14]. Особенностью этого метода является то, что продуктами хиноидного окисления адреналина являются не только $O_2^{\cdot-}$, но и радикалы карбонат-бикарбонатных анионов и CO_2 , следовательно, в целом можно судить об антирадикальной активности халконов. Кроме того, модельная система хиноидного окисления адреналина позволяет оценить способность биопрепаратов (супернатант гомогената печени русского осетра) ингибировать генерацию $O_2^{\cdot-}$, т.е. определить протекторную активность соединений в отношении супероксиддисмутазы (СОД).

В условиях аутоокисления адреналина все халконы ингибируют образование $O_2^{\cdot-}$, соединения **1** и **3** — на 33.9 и 38.8% соответственно. Наимень-

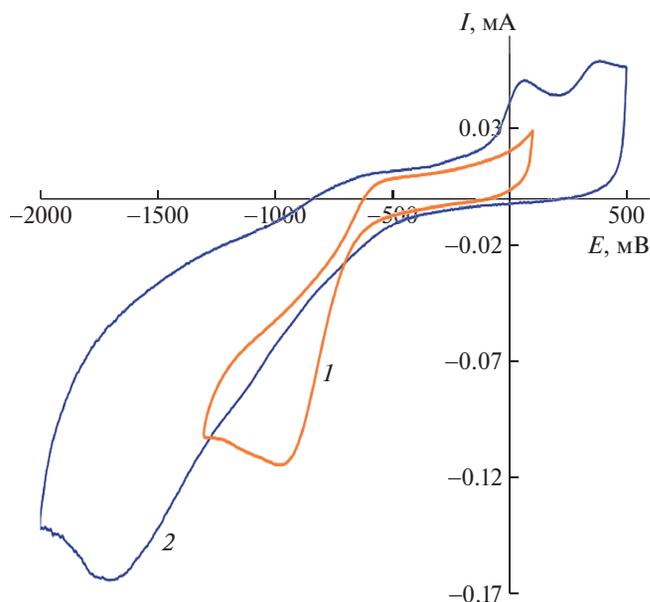


Рис. 2. ЦВА восстановления $O_2^{\cdot-}$ без (кривая 1) и в присутствии соединения **3** (кривая 2) (CH_3CN , Pt, 0.1 M tBu_4NClO_4 , $C = 5$ mM, Ag/AgCl, $v = 0.2$ В s^{-1}).

шей активностью в неферментативной системе обладает соединение **2** (13.0% ингибирования), что, возможно, объясняется наличием одной неэкранированной OH-группы в структуре халкона. Добавление супернатанта гомогената печени русского осетра в щелочной бикарбонатный буфер приводит к снижению скорости аутоокисления адреналина, что свидетельствует об утилизации $O_2^{\cdot-}$ цитозольной СОД. Наибольшая СОД-протекторная активность биопрепарата установлена для производного халкона **1** ($76.4 \pm 0.01\%$ ингибирования), соединения **2** и **3** ингибируют процесс образования адренохрома на 38.6 ± 0.01 и $49.9 \pm 0.03\%$ соответственно.

Полученные результаты по способности гидроксипроизводных халконов **1–3** утилизировать супероксид анион-радикал коррелируют с данными о наибольшем ингибирующем действии халкона **1** в модельной системе неферментативного пероксидного окисления олеиновой кислоты и соединения **3** в модельной системе длитель-

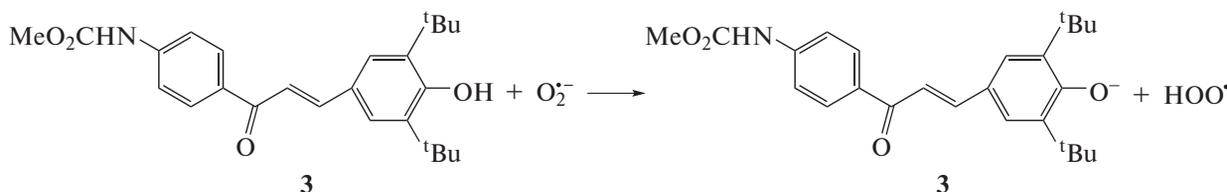


Схема 1

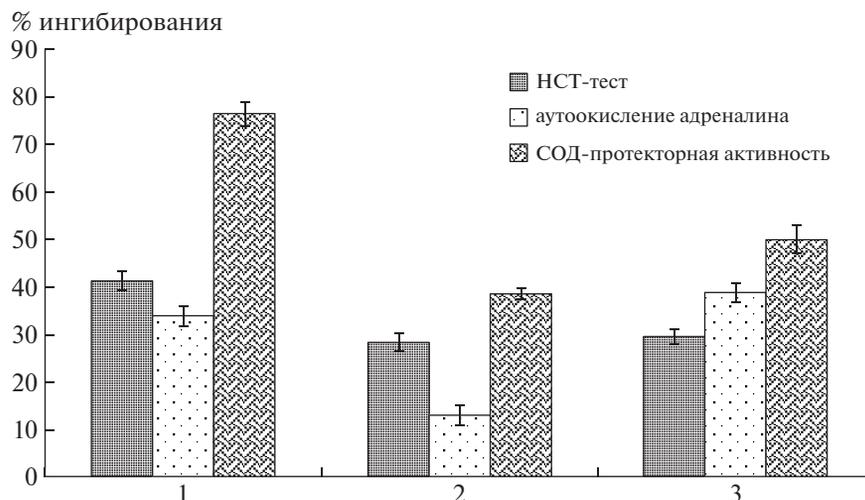


Рис. 3. Поглощающая активность соединений 1–3 в отношении $O_2^{\bullet-}$, генерированного в ферментативной системе ксантин/ксантиноксидаза, в процессе хиноидного окисления адреналина в щелочной среде в присутствии гомогената печени русского осетра (СОД-протекторная активность) и без биопрепарата (аутоокисление адреналина). Представлены средние значения, полученные в независимых опытах при 5 параллельных измерениях в каждом эксперименте, относительно контроля; отличия от контрольной экспериментальной группы $p < 0.05$.

но протекающего процесса окисления липидов печени тилляпии [10].

Таким образом, в опытах *in vitro* показано, что производные халконов 1–3 проявляют свойства первичных антиоксидантов, антирадикальные свойства которых объясняются возможностью выступать донорами электронов и/или атомов водорода. Поглощающая активность соединений в отношении $O_2^{\bullet-}$, генерированного в различных модельных системах, согласуется с данными прогноза *in silico* [10]. Наибольшая ингибирующая активность в ферментативной системе ксантин/ксантиноксидаза и СОД-протекторная активность выявлена для халкона 1, в структуре которого содержатся две неэкранированные ОН-группы. Взаимодействие с электрохимически генерированным $O_2^{\bullet-}$ установлено только для халкона 3, который демонстрирует высокую антирадикальную активность и в условиях аутоокисления адреналина в щелочной среде, что объясняется присутствием 2,6-ди-*трет*-бутилфенольного фрагмента, способствующего образованию стабильного ароксильного радикала. Учитывая, что соединения 1–3 хорошо растворимы в этаноле и ДМСО, а также то, что для них *in silico* спрогнозирована низкая потенциальная токсичность (4 класс), дальнейшие экспериментальные исследования по изучению биологической активности и острой токсичности данных халконов *in vivo* позволят выявить эффективные и безопасные фармакологически активные соединения.

ИСТОЧНИКИ ФИНАНСИРОВАНИЯ

Работа выполнена при поддержке гранта РФФИ № 19-03-00006а (электрохимические исследования, НСТ-тест, аутоокисление адреналина); в рамках госзадания, рег. № 01201354245 (СОД-протекторная активность биопрепарата).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Lambeth J.D. // Free Radic. Biol. Med. 2007. V. 43. P. 332–347. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2007.03.027>
- Zabik N.L., Anwar S., Ziu I., Martic-Milne S. // Electrochim. Acta. 2019. V. 296. № 10. P. 174–180. <https://doi.org/10.1016/j.electacta.2018.11.051>
- Phaniendra A., Jestadi D.B., Periyasamy L. // Indian J. Clin. Biochem. 2015. V. 30. № 1. P. 11–26. <https://doi.org/10.1007/s12291-014-0446-0>
- Hayyan M., Hashim M.A., Al Nashef I.M. // Chem. Rev. 2016. V. 116. № 5. P. 3029–3085. <https://doi.org/10.1021/acs.chemrev.5b00407>
- Adelusi T.I., Akinbolaji G.R., Yin X., Ayinde K.S., Oloaba O.T. // Eur. J. Pharmacol. 2021. V. 891. № 15. P. 173695. <https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2020.173695>
- Janković T., Turković N., Kotur-Stevuljević J., Vujić Z., Ivković B. // Chem.-Biol. Interactions. 2020. V. 324. P. 109084. <https://doi.org/10.1016/j.cbi.2020.109084>
- Zengin G., Aktumsek A., Guler G.O., Cakmak Y.S., Yildizugay E. // Rec. Nat. Prod. 2011. V. 5. P. 123–132.
- Zhao Zh., Cui X., Ma X., Wang Z. // Acta Biochim. Biophys. Sin. 2020. V. 52. № 11. P. 1265–1273. <https://doi.org/10.1093/abbs/gmaa124>

9. Procházková D., Boušová I., Wilhelmová N. // Fitoterapia. 2011. V. 82. № 4. P. 513–523.
<https://doi.org/10.1093/abbs/gmaa124>
10. Osipova V.P., Polovinkina M.A., Telekova L.R., Velikorodov A.V., Stepkina N.N., Berberova N.T. // Russ. Chem. Bull. International Edition. 2020. V. 69. № 3. P. 504–509.
<https://doi.org/10.1007/s11172-020-2790-y>
11. Magalhães L.M., Segundo M.A., Reis S., Lima J. // Anal. Chim. Acta. 2008. V. 613. № 1. P. 1–19.
<https://doi.org/10.1016/j.aca.2008.02.047>
12. Osipova V., Polovinkina M., Osipova A., Gracheva Yu., Okhlobystin A. // Turk. J. Chem. 2019. V. 43. P. 1336–1349.
<https://doi.org/10.3906/kim-1904-40>
13. Zagrean-Tuza C., Dorneanu S., Mot A.C. // Free Radical Biol. Med. 2020. V. 146. P. 189–197.
<https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2019.11.006>
14. Polovinkina M.A., Kolyada M.N., Osipova V.P., Berberova N.T., Chukicheva I.Y., Shumova O.A., Kutchin A.V. // Dokl. Chem. 2019. V. 484. № 5. P. 568–571.
<https://doi.org/10.31857/S0869-56524845568-571>

ACTIVITY OF NEW HYDROXY DERIVATIVES OF CHALCONES IN RELATION OF SUPEROXIDE ANION RADICAL

**M. A. Polovinkina^a, V. P. Osipova^{a,#}, A. D. Osipova^b, N. T. Berberova^b,
A. V. Velikorodov^c, and Academician of the RAS G. G. Matishov^a**

^a Federal Research Centre the Southern Scientific Centre of the Russian Academy of the Sciences,
344006 Rostov-on-Don, Russian Federation

^b Astrakhan State Technical University, 414056 Astrakhan, Russian Federation

^c Astrakhan State University, 414056 Astrakhan, Russian Federation

[#]E-mail: osipova_vp@mail.ru

The study of the absorbing activity of new hydroxy derivatives of chalcones with respect to the generated electrochemically superoxide anion radical ($O_2^{\bullet-}$) in the xanthine/xanthine oxidase enzymatic system during the reduction of nitro blue tetrazolium, as well as in the process of nonenzymatic quinoid oxidation of adrenaline in an alkaline medium has been carried out. The antiradical activity of new hydroxy derivatives of chalcones with respect to $O_2^{\bullet-}$ was established for the first time. Interaction with electrochemically generated $O_2^{\bullet-}$ and high antiradical activity under conditions of autooxidation of adrenaline in an alkaline medium was established for chalcone with 2,6-di-*tert*-butylphenol fragment. The highest absorbing activity in the xanthine/xanthine oxidase enzymatic system and SOD-protective activity is exhibited by chalcone with two unscreened OH groups. The inhibitory activity of hydroxy derivatives of chalcones with respect to $O_2^{\bullet-}$ is consistent with the results of *in silico* prediction and indicates their ability to reduce the likelihood of oxidative stress. A correlation has been established between the ability of the studied chalcones to utilize the superoxide anion radical and the inhibitory activity in model systems of peroxidation of oleic acid and tilapia liver lipids.

Keywords: hydroxy-derivatives of chromens, sterically-hindered phenolic fragment, antioxidant activity, superoxide anion radical