

О. М. Фігурка, О. П. Ратушна, С. В. Хом'як, О. С. Яремкевич
 Національний університет "Львівська політехніка",
 кафедра технології біологічно активних сполук, фармації та біотехнології

ДОСЛІДЖЕННЯ АНТИОКСИДАНТНОЇ АКТИВНОСТІ 3-АМІНОКИСЛОТНОЗАМІЩЕНИХ-2-(3,5-ДИ-ТРЕТ-БУТИЛ-4- ГІДРОКСИФЕНІЛ)-1,4-НАФТОХІНОНІВ

© Фігурка О. М., Ратушна О. П., Хом'як С. В., Яремкевич О. С, 2015

Досліджено інтенсивність процесів пероксидного окиснення ліпідів (ПОЛ) та окисної модифікації білків (ОМБ) новосинтезованих біологічно активних речовин – 3-амінокислотно-заміщених-2-(3,5-ди-*трет*-бутил-4-гідроксифеніл)-1,4-нафтохінонів (3а-д) та 3-хлоро-2-(3,5-ди-*трет*-бутил-4-гідроксифеніл)-1,4-нафтохінону (4). Порівняно їх активності з відомим антиоксидантом хіноїдної структури – кверцетином. Встановлено, що серед досліджуваних речовин [3-(3,5-ди-*трет*-бутил-4-гідроксифеніл)-1,4-діоксо-1,4-дигідронафтален-2-аміноіл]-бутиратна кислота (3б) проявила антиоксидантну активність у процесах ПОЛ та ОМБ. І навпаки, 1-[3-(3,5-ди-*трет*-бутил-4-гідроксифеніл)-1,4-діоксо-1,4-дигідронафтален-2-іл]-піролідин-2-карбонова кислота (3в) виявила сильні прооксидантні властивості за обома показниками оксидативного стресу.

Ключові слова: антиоксидантна активність, 1,4-нафтохінон, просторово екранований фенол, амінокислоти.

The intensity of lipid peroxidation (LPO) and oxidative modification of proteins (OMB) by newly synthesized biologically active 3-aminoacid-2-(3,5-di-*tert*-buthyl-4-hydroxyphenil)-1,4-naphthoquinones (3a-d) and 3-chloro-2-(3,5-di-*tert*-buthyl-4-hydroxyphenil)-1,4-naphthoquinones (4) is studied. The comparison of their activities with known antioxidant – quercetin is made. It is established that among the test substances [3-(3,5-Di-*tert*-butyl-4-hydroxyphenyl)-1,4-dioxo-1,4-dihydronaphtalen-2-aminoyl]-bytyric acid (3b) showed the most significant result of antioxidant activity in LPO and OMB. Instead, 1-[3-(3,5-Di-*tert*-butyl-4-hydroxyphenyl)-1,4-dioxo-1,4-dihydronaphtalen-2-yl]-pyrrolidine-2-carboxyc acid (3в) revealed strong prooxidative properties for both indicators of oxidative stress.

Key words: antioxidant activity, 1,4-naphthoquinone, hindered phenol, amino acids.

Аналіз попередніх досліджень і публікацій. Як відомо, важливою ланкою патогенезу багатьох захворювань є оксидативний стрес [1 – 2], в результаті якого активізується пероксидного окиснення ліпідів (ПОЛ) та накопичення вільних радикалів, що спричиняє значні зміни в обмінних процесах клітини та структурно-функціональної цілісності (мікров'язкості) клітинних мембран та білкових структур, супроводжується дисбалансом ферментативних і неферментативних компонентів системи антиоксидантного захисту [3].

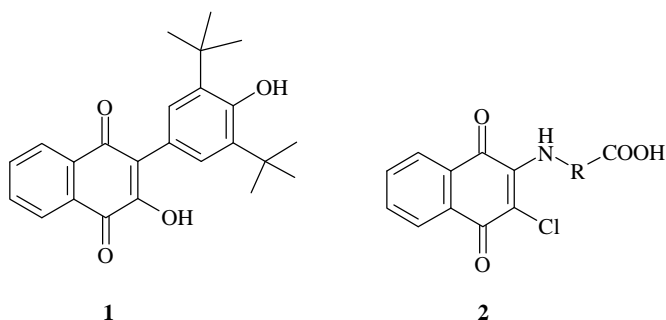
Похідні 1,4-нафтохінону відіграють дуже важливу біологічну роль в організмі людини завдяки своїм окисно-відновним властивостям, що робить їх цікавими для пошуку нових лікарських препаратів [4]. Похідні нафтохінонів здатні регулювати потік електронів у дихальному ланцюгу і, тим самим, впливати на молекулярні механізми обміну кисню в тканинах, а, отже, на функціонування усього організму [5].

Просторово екрановані феноли посідають перше місце серед промислових антиоксидантів [6] і за своєю будовою та властивостями подібні до вітаміну Е.

Відомо, що 2,6-ди-*трет*-4-метилфенол (іонол, дибунол) – синтетичний просторово екранований фенол, похідне 2,6-ди-*трет*-бутилфенолу. Іонол – класичний синтетичний фенольний жиророзчинний антиоксидант – має яскраво виражену антирадикальну активність, що пов’язано з екрануванням ароматичної ОН-групи *трет*-бутиловими заступниками в орто-положенні. При підвищених температурах і в системах міцел іонол перевершує α -токоферол за антиоксидантними властивостями, є малотоксичним та не має мутагенних властивостей [7].

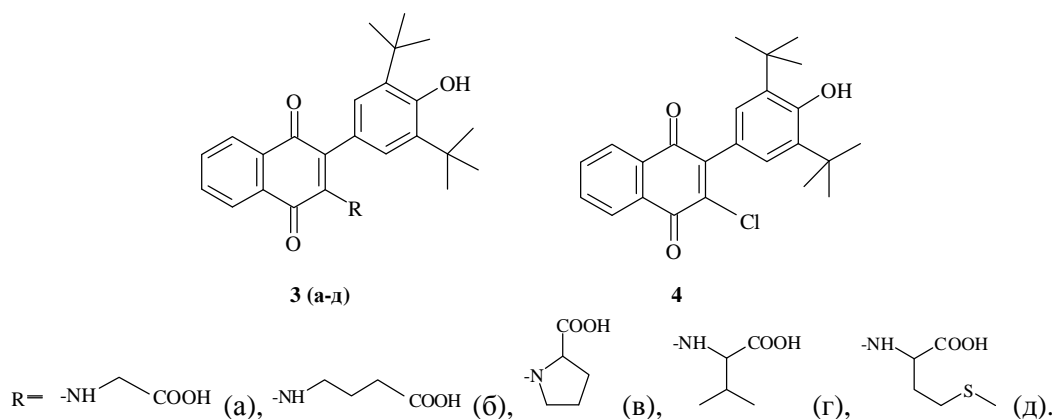
Ферменти циклооксигеназа-2(COX-2) і 5-ліпоксигеназа (5-LOX) мають важливе значення у сприянні росту ракових клітин. Встановлено, що сполуки з 2,6-ди-*трет*-бутил-фенолом виступають селективними інгібіторами як COX-2, так і 5-LOX ферментів і є ефективними в пригніченні росту ракових пухлин [8].

Наприклад, сполука 3-гідрокси-2-(3,5-ди-*трет*-бутил-4-гідроксифеніл)-1,4-нафтохінон **1** поєднує позитивні властивості нафтохінонового фрагмента та екранованого фенолу, це інгібітор росту ракових клітин, а також високоактивний антиоксидант [9].

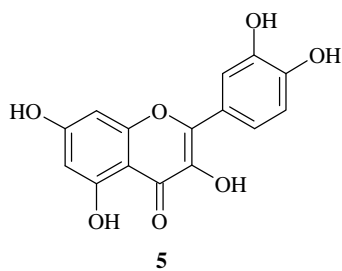


Також широкий спектр біологічної активності проявляють амінокислотні похідні 1,4-нафтохінону **2**. Відомо, що вони проявляють високу бактерицидну, фунгіцидну [10], протипухлинну [11], антисудомну [12] дію. Деякі амінокислотні похідні 1,4-нафтохінону проявляють антигіпоксичну, редуктазну, антиангінальну та протиішемичну активність і можуть застосовуватись у медицині [13].

Предметом дослідження були новосинтезовані амінокислотні похідні 2-(3,5-ди-*трет*-бутил-4-гідроксифеніл)-3-хлоро-1,4-нафтохінону **3(а-д)**, зокрема похідні α -гліцину **3а**, γ -аміномасляної кислоти **3б**, α -проліну **3в**, α -валіну **3г** та α -метіоніну **3д**, а також вихідна сполука - 3-хлор-2-(3,5-Ди-*трет*-бутил-4-гідроксифеніл)-1,4-нафтохінон **4** [14].



Для порівняння антиоксидантних властивостей новосинтезованих БАР, окрім контролю, були додатково проведені дослідження з відомим антиоксидантом кверцетином (2-(3,4-дигідроксифеніл)-3,5,7-тригідрокси-4Н-хромен-4-он) **5**.



Наведено результати дослідження впливу 3-амінокислотозаміщених-2-(3,5-ди-*трет*-бутил-4-гідроксифеніл)-1,4-нафтохінону на процеси пероксидного окиснення ліпідів (ПОЛ) та оксидної модифікації білків (ОМБ), що може наблизити до розуміння механізмів біологічної дії цих речовин, покращення їх лікувальних властивостей і матиме вагоме значення для фармакології та медицини.

Мета. Дослідження антиоксидантних властивостей 3-амінокислотозаміщених-2-(3,5-ди-*трет*-бутил-4-гідроксифеніл)-1,4-нафтохінонів в умовах ініціювання вільно-радикального окиснення *in vitro*.

Матеріали та методи дослідження. Дослідження проводили на гомогенаті курячої печінки. Для досліджень ПОЛ та ОМБ амінокислотних похідних нафтохінону використовували їх спиртові розчини (етанол:вода, 1:3) у концентрації 10^{-6} М. Визначали обидва показники оксидативного стресу в одній пробі [15]. У відібраних зразках реакцією малонового діальдегіду (МДА) з тіобарбітуровою кислотою (ТБК) визначали вміст вторинних продуктів ліпопероксидації (ТБК-активних продуктів). Принцип методу ґрунтується на активації ПОЛ іонами двовалентного заліза до рівня, який реєструється спектрофотометрично. При високій температурі в кислому середовищі МДА реагує з ТБК, утворюючи забарвлений триметиновий комплекс з максимумом поглинання при 532 нм [16]. Кількість білка у пробах визначали за методом Лоурі [17]. Ступінь ОМБ визначали за кількістю утворених додаткових карбонільних груп (КГ) у бічних ланцюгах амінокислот, вміст яких визначали в реакції з 2,4-динітрофенілгідразином [18]. Вміст КГ білків визначали на спектрофотометрі “Specord M-40” при довжині хвилі 370 нм.

Обговорення результатів. Відомо, що процеси біологічного окиснення займають центральне місце в метаболізмі клітин. Якщо за дії зовнішніх впливів чи в результаті захворювань рівновага між потужністю прооксидантної і антиоксидантної систем зміщується в бік першої, то виникає оксидативний стрес. Для оцінки напрямку таких змін використовують показники оксидативного стресу: вміст пероксидів ліпідів та продуктів їхнього метаболізму (ТБК-активні продукти), а також вміст КГ білків.

Результати досліджень показали (рис. 1), що за дії речовини **3в** відбулося значне зростання вмісту ТБК-активних продуктів – на 47 % відносно контролю. Це свідчить про те, що дана речовина проявляє сильні прооксидантні властивості в процесах ПОЛ. За дії речовин **3д** і **3а** відбулося підвищення вмісту вторинних продуктів ліпопероксидації відносно контролю на 5 % і 9 % відповідно, тобто вони чинять незначну прооксидантну дію. Антиоксидантну активність у процесах ПОЛ проявили БАР **3б** і **3г**, оскільки, за їх дії відбулося зниження вмісту ТБК-активних продуктів на 3 % і 11 % відповідно.

Результати досліджень впливу амінокислотних похідних на процеси ОМБ показали (рис. 2), що за дії речовини **3в** відбулося значне підвищення вмісту КГ на 54 % порівняно з контролем. Це означає, що ця БАР проявила високу прооксидантну активність. На відміну від цього, значну антиоксидантну активність проявила речовина **3д**, оскільки за її дії речовини вміст КГ знизився відносно контролю на 31 %. Менш виражену антиоксидантну активність в процесах ОМБ проявили речовини **3б** і **3а**, оскільки вміст КГ знизився відносно контролю на 9 % і 8 % відповідно.

Серед досліджуваних амінокислотних похідних нафтохінону речовина **3в** виявила сильні прооксидантні властивості за обома показниками оксидативного стресу. БАР **3б** проявила антиоксидантну активність у процесах ПОЛ та ОМБ.

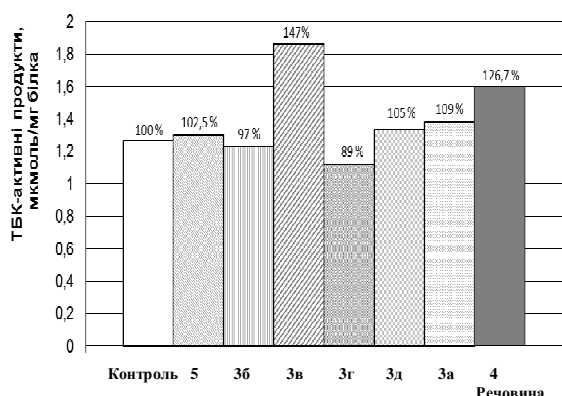


Рис. 1. Вміст ТБК-АП у гомогенаті курячої печінки за дії БАР **3(а-д)** порівняно з контролем, кверцетином (**5**) та вихідною сполукою (**4**)

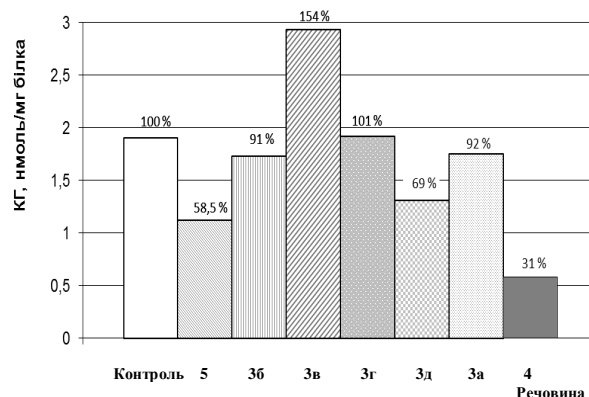


Рис. 2. Вміст КГ у гомогенаті курячої печінки за дії БАР **3(а-д)** порівняно з контролем, кверцетином (**5**) та вихідною сполукою (**4**)

Також, для порівняння, окрім контролю, були проведені дослідження з вихідною сполукою **4** та відомим антиоксидантом – кверцетином **5**. Результати досліджень показали, що за дії речовини **4** порівняно з контролем відбулося підвищення вмісту ТБК-активних продуктів на 26,7 %. Це свідчить про те, що ця сполука проявила значну прооксидантну активність у процесах ПОЛ. На противагу цьому, вміст КГ за дії сполуки **4** знизився відносно контролю на 69 %, що свідчить про те, що ця сполука активно перешкоджає виникненню вільнорадикальних процесів у білках. За дії кверцетину вміст ТБК-активних продуктів підвищився на 2,5 %, а у процесах ОМБ вміст КГ знизився на 41,5 %, що підтвердило його антиоксидантні властивості.

Під час аналізу отриманих даних встановили, що за дії одних досліджуваних амінокислотних похідних заданої хіноїдної сполуки відбувається інтенсифікація процесів ПОЛ та ОМБ, тобто зростає вміст продуктів вільнорадикального окиснення ліпідів та білків, що, ймовірно, може викликати істотні порушення клітинного метаболізму. А за дії інших речовин, навпаки, спостерігається достовірне зменшення рівня ТБК-активних продуктів та утворення КГ порівняно з контролем, що свідчить про зниження інтенсивності процесів ПОЛ та ОМБ і відображає антиоксидантну активність цих сполук.

Висновки. Виявлено вплив ряду амінокислотних похідних 2-(3,5-ди-*трет*-бутил-4-гідроксифеніл)-1,4-нафтохінону на процеси пероксидного окислення ліпідів та окисної модифікації білків. З ряду досліджуваних сполук [3-(3,5-ди-*трет*-бутил-4-гідроксифеніл)-1,4-діоксо-1,4-дигідронафтаден-2-аміноіл]-бутиратна кислота **3б** проявила антиоксидантну активність за обома показниками оксидативного стресу, що робить її цікавою для подальших досліджень.

1. Гончарук Є. Г. Вільнорадикальне окиснення як універсальний неспецифічний механізм пошкоджуючої дії шкідливих чинників довкілля (огляд літератури та власних досліджень) / Є. Г. Гончарук, М. М. Коршун // Ж. Акад. мед. наук України. – 2004. – Т.10, №1. – С. 131–150.
2. Полянська О. С. Активність процесів ліпопероксидації при нестабільній стенокардії та інфаркті міокарда / О. С. Полянська // Бук. мед. вісник. – 2002. – Т.6, №2. – С. 77–79.
3. Michiels, C. Cytotoxicity of linoleic acid peroxide, malondialdehyde and 4-hydroxynonenal towards human fibroblast / С. Michiels, J. Remacle // Toxicology. – 2004. – 66, N 2. – P. 225–234.
4. Федуров В. В. Роль убихінону в регуляції окислювальних процесів при гіпоксії. – К.: Наукова думка, 1978.
5. Pat. 2055097 GB // Quinone derivatives. Takeda Chemical Industries Ltd. – Опубл. 25.02.1981.
6. Єршов В. В. /

Пространственно-затрудненные фенолы // В. В. Єршов, Г. А. Никифоров, А. А. Володькин // *Химия*, М. 1972, 257с. 7. Колесников А. В. / Синтетический прямой антиоксидант іонол как перспективное антикатаральное средство // *Российский медико-биологический вестник имени академика И. П. Павлова*. – 2012. – №3. – С. 158 – 165. 8. C. Charlier. Dual inhibition of cyclooxygenase-2 (COX-2) and 5-lipoxygenase (5-LOX) as a new strategy to provide safer non-steroidal anti-inflammatory drugs / C. Charlier, C. Michaux. // *Eur. J. Med. Chem.* – 2003. – 38. – P. 645–659. 9. G. Wurm / 2-(3,5-Di-tert-butyl-4-hydroxyphenyl)-1,4-naphthoquinone as 5-lipoxygenase inhibitor / G. Wurm // *Arch. Pharm.*, Vol. 324, №8. – 1991. – P. 491–495. 10. А.С. N1774617 (СССР). Производные 3-хлор-1,4-нафтохинона, обладающие бактерицидными и фунгицидными свойствами А. П. Картофлицкая, В. Т. Колесников, В. Н. Солонин, Л. А. Кучеренко, А. А. Гузова, В. М. Шелевий, М. К. Хмельюк, В. Л. Беляев. – 1983. 11. Ragazze E., De Biasi M., Pandolfo L., Chinellato A., Caparrotta L. In vitro effects of naphthoquinones isolated from *Drosera* species. *Chem. Abst.* – 1993. – V.119. – P. 58. 12. Пат. на корисну модель №19337. Застосування калієвої солі N154 (1,4-діоксо-3-хлор-1,4-дигідронафт-2-іл) аланіну як сполуки, що проявляє протисудомну дію. – 2006. 13. А.С. N1690339. N-(3-хлоро-1,4-нафтохинонил-2-)-2-D,L-аспараги-новая кислота, проявляющая кардиостимулирующие свойства. Картофлицкая А. П., Колесников В. Т., Зыбин В. С., Митрохин Н. М., Буров Ю. В., Диогенова Н. С., Гузова А. А. – 1990. 14. Фігурка О. М. / Синтез і властивості 3-амінокислотозаміщених-2-(3,5-дитрет-бутил-4-гідроксифеніл)-1,4-нафтохінонів / О. М. Фігурка, М. С. Курка, І. В. Драпак, З. В. Губрій, С. В. Хом'як // *Вісник Нац. ун-ту "Львівська політехніка"* №787 – 224 – 230с. – 2014. 15. Луцак В. І. / Показники оксидативного стресу. 1. Тіобарбітурат-активні продукти і карбонільні групи білків / В. І. Луцак, Т. В. Багнюкова, О. В. Луцак // *Укр. біохім. журн.* – 2004. – № 3. – С. 136-141. 16. Тимирбулатов, Р. Р. Методы повышения интенсивности свободнорадикального окисления липидосодержащих компонентов крови и его диагностическое значение / Р. Р. Тимирбулатов, Е. И. Селезнев // *Лаб. дело.* – 1981. – №4. – С. 209–211. 17. Protein measurement with the Folin phenol reagent / O. H. Lowry, N. G. Rosebrough, A. L. Farr, R. C. Randall // *J. Biol. Chem.* – 1951. – 193, N1. – P.265 –275. 18. Winterbourn C. C., Buss I. H., Chan T. P. et al. Protein carbonyl measurements show evidence of early oxidative stress in critically ill patients // *Crit. Care. Med.* Vol. 28 N 1, 2000. – P. 275 – 279.