

Н. А. Бизунок<sup>1</sup>, Б. В. Дубовик<sup>1</sup>, Г. И. Полозов<sup>2</sup>, О. И. Шадыро<sup>2</sup>

## УПРАВЛЕНИЕ РЕСПИРАТОРНЫМ ВЗРЫВОМ ФАГОЦИТОВ СТЕРИЧЕСКИ ЗАТРУДНЕННЫМИ ПРОИЗВОДНЫМИ ФЕНОЛА

<sup>1</sup> УО «Белорусский государственный медицинский университет»,

<sup>2</sup> УО «Белорусский государственный университет»

Установлено дозозависимое ингибирующее действие ряда хинонов и дифенолов различной структуры на генерацию активных форм кислорода (АФК) в макрофагах. Полученные результаты наряду с исследованиями других авторов позволяют предположить, что система хинон/дифенол не только нейтрализует АФК, например  $O_2^{\cdot-}$ , но и контролирует процессы свободнорадикальной фрагментации биологических молекул.

**Ключевые слова:** активные формы кислорода, макрофаги, хиноны, дифенолы.

**N.A. Bizunok, B.V. Dubovik, G.I. Polozov, O.I. Shadyro**

## SPATIO SUBSTITUTED DERIVATIVES OF PHENOLS MODULATE THE RESPIRATORY BURST OF THE PHAGOCYTES

Effects of a number of quinones and diphenols of various structures on reactive oxygen species (ROS) generation by macrophages were investigated. The test compounds have been found to inhibit ROS production by macrophages in dose dependent manner. The results obtained and literature data available allow a suggestion to be made that the system quinone/diphenol is able to not only deactivate such active species as  $O_2^{\cdot-}$  but also control the realization of free-radical processes of fragmentation in biologically important molecules.

**Key words:** reactive oxygen species, macrophages, quinones, diphenols.

Одно- и двухатомные фенолы являются активными ингибиторами свободнорадикальных реакций в простых химических системах, однако их эффективность *ex vivo*, как правило, намного ниже ожидаемой, или же практическое применение в медицине ограничено высокой токсичностью. Теоретические предпосылки и экспериментальные доказательства потенциальных преимуществ орто-замещенных стерически затрудненных одно- и двухатомных фенолов, синтезированных в БГУ, стали основанием для их всестороннего изучения.

Считается общепринятым, что блокирование фенольными соединениями окислительных процессов обусловлено их способностью восстанавливать кислород-центрированные органические радикалы, такие как  $ROO^{\cdot}$  до гидропероксидов (ROOH) с образованием стабильных и малоактивных феноксильных радикалов ( $PhO^{\cdot}$ ). Показано также, что хиноны эффективно взаимодействуют с радикалами, присоединяя их по  $-C=C-$  связи, либо окисляя до соответствующего непредельного соединения за счет отрыва атома водорода [1]. Считается при

этом, что за антиоксидантную активность хинонов в биосистемах ответственны их восстановленные формы. Основной массив данных по взаимодействию фенолов и хинонов с радикальными интермедиатами получен в химических тест-системах при изучении процессов окисления различных классов органических, прежде всего, карбоцепных соединений (углеводородов, полиолефинов, производных карбоновых кислот). Эти данные, как правило, экстраполируются на сложные биосистемы без учета структурно-функциональных особенностей последних.

В настоящей работе представлены результаты изучения антиоксидантного потенциала стерически затрудненных производных фенола на модели фагоцитарной генерации АФК и сравнительный анализ с их действием в модельных химических системах.

### Методы исследования

Исследования выполнены на изолированных перитонеальных макрофагах крыс-самцов линии Вистар массой 180–220 г. Клетки получали промыванием брюшной полости 20 мл среды Хенкса с гепарином (10 ЕД/мл), отмывали и ресуспендировали в бесцветной среде Хенкса. Полученная суспензия содержала более 98% жизнеспособных клеток по результатам теста с трипановым синим (0.1%), при дифференцированном подсчете которых в окрашенных мазках, макрофаги составляли около 90%.

Макрофагальную продукцию оксидантов исследовали методом люминолзависимой хемилюминесценции (ХЛ) в условиях взрывной генерации АФК на люминометре LKB-Wallac 1251–002 (Финляндия).

В работе использовали ионол фирмы «Aldrich». Пространственно экранированные фенолы синтезированы на кафедре радиационной химии и химико-фармацевтических технологий БГУ, перечень изученных соединений представлен в таблице 1. Строение полученных соединений подтверждалось данными масс- и ЯМР-спектроскопии, чистота субстанций составляла не менее 99%.

Таблица 1. Перечень изученных пространственно экранированных фенолов

Шифр	Название	Диапазон [С] <sup>1</sup> , М
Ионол	2,6-Ди-трет-бутил-4-метилфенол	
РС	1,3-Дигидроксибензол (резорцин)	
О1	1,4-Дигидроксибензол (гидрохинон)	10 <sup>-8</sup> -10 <sup>-3</sup>
О2	1,4-Бензохинон	10 <sup>-8</sup> -10 <sup>-3</sup>
О3	4-Метоксифенол	10 <sup>-7</sup> -10 <sup>-5</sup>

<sup>1</sup> Диапазон изученных концентраций, моль/л.

O4	1,4-Дигидрокси-2,3,5-триметилбензол	$10^{-8}-10^{-4}$
O5	2,3,5-Триметил-1,4-бензохинон	$10^{-8}-10^{-4}$
O6	2,5-Ди-трет-бутилгидрохинон	$10^{-9}-10^{-5}$
O7	2,5-Ди-трет-бутил-1,4-бензохинон	$10^{-9}-10^{-5}$
O8	4,6-Ди-трет-бутилрезорцин	$10^{-9}-10^{-5}$
O9	4-Трет-бутилпирокатехин	$10^{-9}-10^{-4}$
O10	4-Трет-бутил-1,2-бензохинон	$10^{-9}-10^{-4}$
O11	3,5-Ди-трет-бутилпирокатехин	$10^{-9}-10^{-4}$
O12	3,5-Ди-трет-бутил-1,2-бензохинон	$10^{-9}-10^{-5}$
O13	1,2,3-Тригидрокси-4,6-ди-трет-бутилбензол	$10^{-8}-10^{-3}$

Генерацию АФК оценивали после 10-минутной инкубации клеток с изучаемым агентом в интервале концентраций  $10^{-9}-10^{-4}$  М при температуре 20–25 °С; контрольные пробы агентов не содержали. Каждый опыт проводился на клетках одного животного и включал группу проб, содержащих индуктор фагоцитоза, в которых оценивали индуцированную хемилюминесценцию (ИХЛ), и группу проб, лишенных индуктора, для регистрации спонтанной хемилюминесценции (СХЛ). 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 ( $10^{-9}-10^{-4}$  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 мин, на протяжении 30 мин. Продукцию АФК оценивали по площади под кривой ХЛ (AUC) и площади под кривой ХЛ, исключая фоновое свечение клеток (DAUC). При описанном дизайне эксперимента последний показатель отражает вклад НАДФН-оксидазы фагоцитов (Nox2) в продукцию общего пула АФК.

Показатели ХЛ проб, содержащих изучаемые агенты, выражали в % к контрольным. Количество повторных опытов варьировало от 3 до 8. Статистическую обработку результатов проводили с использованием парного t-критерия, различия считали достоверными при вероятности ошибки < 5%. 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 [3].

## Результаты и обсуждение

Изучен антиоксидантный потенциал 15-и экранированных производных фенола и дифенолов, 10 из которых представляют собой гомологичные пары фенол-хинон (O1-O2, O4-O5, O6-O7, O9-O10, O11-O12) (таблица 1).

### Эффект количества и положения экранирующих заместителей

Результаты исследования представлены в таблице 2 и на рисунке 1. Прежде всего, с позиции взаимосвязи «структура-действие» привлекает внимание эффект количества и положения трет-бутильных и гидроксильных групп в молекулах производных фенола. В таблице 2А. приведен ряд фенолов и их производных, содержащих экранирующие заместители в орто-положении по отношению к гидроксигруппам, для каждого соединения указана 50% ингибирующая концентрация ( $IC_{50}$ ) в отношении совокупной (AUC) и Nox2-зависимой (DAUC) продукции АФК активированными фагоцитами.

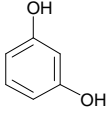
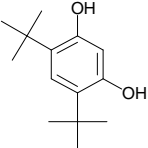
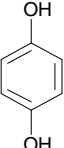
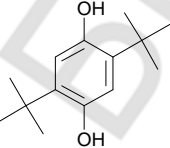
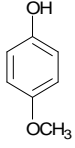
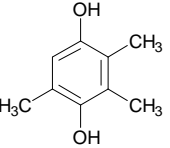
В отношении Nox2-зависимой генерации АФК активность наиболее эффективных «ловушек» кислород-центрированных радикалов (инола и соединения O1) практически не различается и на порядок превосходит активность по критерию AUC ХЛ (оба показателя представлены для соединения O1). Это свидетельствует о быстром нарастании количества кислород-центрированных радикалов при активации Nox2 фагоцитов.

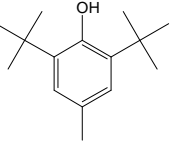
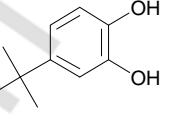
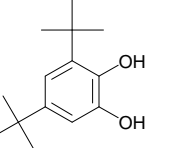
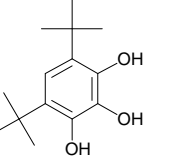
Наиболее активным соединением в ряду RC, O8, O1, O6, O3, O4 оказалось O1, содержащее гидроксилы в пара-положении, что совпадает с данными о наибольшей антиоксидантной активности пара- гидроксильных производных фенола в химических тест-системах. Действительно, перемещение одного гидроксила в мета- положение (резорцин) приводило к снижению активности в 30 раз (по DAUC ХЛ). Замещение одного из гидроксильных групп в гидроксине метоксильной группой давало быстрое «истощение» эффекта и на порядок снижало активность производного (O3).

Появление в молекулах O1 и RC двух трет-бутильных заместителей в орто-положении по отношению к гидроксилам (O6 и O8, соответственно) полностью лишает эти производные антиоксидантного потенциала. Причиной могут быть стерические затруднения, возникающие при взаимодействии этих соединений с радикалами органических молекул. Если в молекуле O1 появляются менее объемные экраны, например, метильные группы (соединение O4), антиоксидантные свойства сохраняются, но активность снижается. Что касается инола, имеющего две трет-бутильные группы в орто- положении к гидроксигруппе, то, очевидно, их взаимное стерическое отталкивание приводит в «открыванию» гидроксила.

Таблица 2. Анализ «структура-действие» в ряду экранированных производных фенола

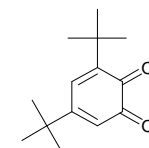
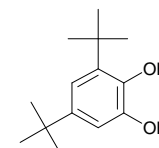
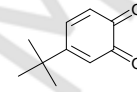
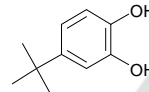
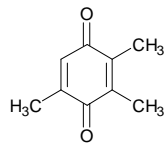
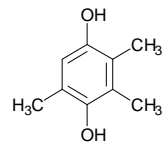
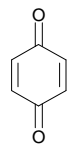
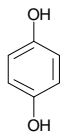
А. Эффект количества и взаиморасположения функциональных и экранирующих группировок

Соединение						
Шифр	RC	O8	O1	O6	O3	O4
AUC IC <sub>50</sub> , мкМ	14,0	—	3,2	—	5,0	19,0
DAUC IC <sub>50</sub> , мкМ	10,0	—	0,37	—	3,1	8,8

Соединение				
Шифр	Ионол	O9	O11	O13
DAUC IC <sub>50</sub> , мкМ,	0,53	0,65	0,0025	--

В. Эффект гомолитических трансформаций фенол-хинон

Соединение



Соединение	O1	O2	O4	O5	O9	O10	O11	O12
Шифр	O1	O2	O4	O5	O9	O10	O11	O12
AUC IC <sub>50</sub> , μM	3,2	4,0	19	14	1,0	0,18	0,0035	0,12
AUC IC <sub>84</sub> , μM	59	36	47	38	9,1	1,9	0,74	1,2
[m]	0,6	0,8	1,8	1,7	0,8	0,7	0,3	0,7

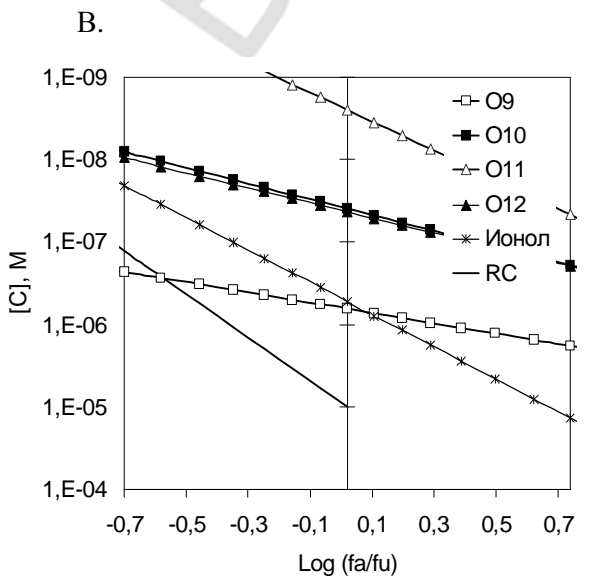
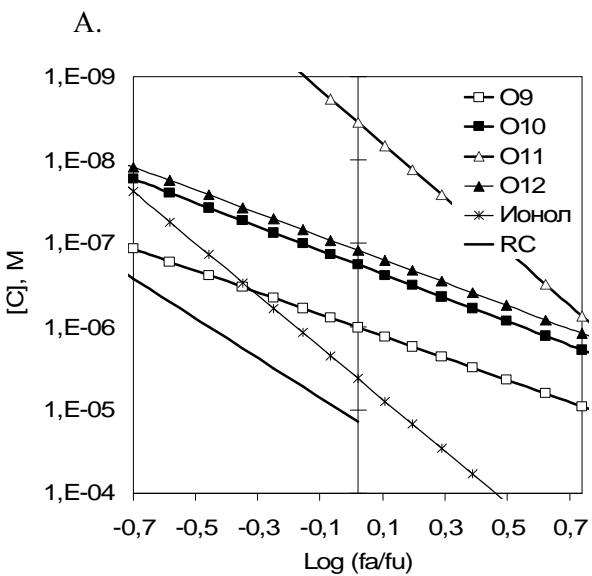
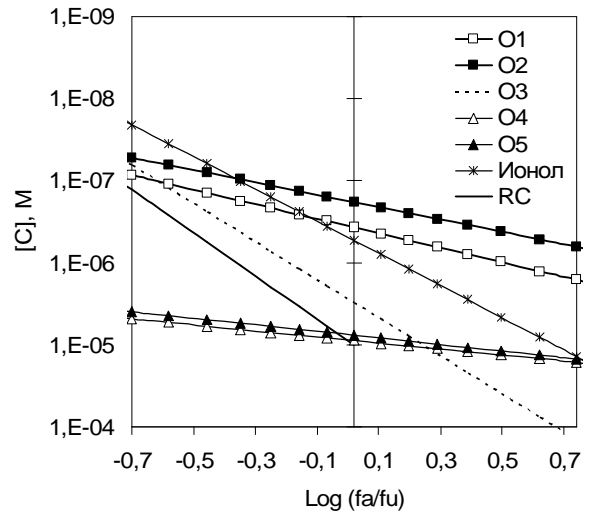
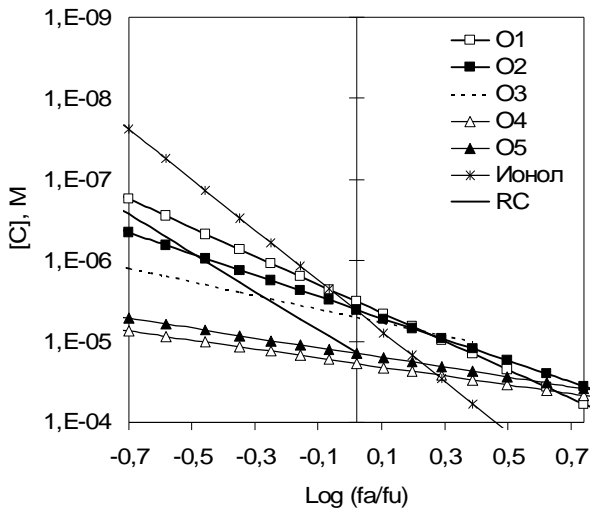
В ряду производных пирокатехина эффект трет-бутильных групп был иным (таблица 2А, соединения О9, О11, О13). Если соединение О9 по активности сравнимо с соединением О1, то появление дополнительного трет-бутильного радикала (О11) увеличивало активность на 3 порядка величин, оба соединения (О9 и О11) обладали максимальной эффективностью. Следует, однако, отметить для О11 почти троекратное снижение  $m$  – коэффициента, отражающего характер кривой «концентрация-эффект» с уменьшением угла наклона её логарифмированной производной. По этой причине в области высоких концентраций различия в активности О9 и О11 сглаживаются. В химических модельных системах О11 не проявляло столь высокой антиоксидантной эффективности [1, 2]. Появление дополнительного гидроксила и превращение О11 в О13 приводит к полной утрате антиоксидантных свойств в клеточном тесте.

### **Эффект гомолитических трансформаций фенол-хинон**

Анализ пар фенол-хинон, представленных в таблице 2В, показывает, что хиноны зачастую не уступают в активности фенолам, а в ряде случаев превосходят их. Это прослеживается в парах О1-О2, О4-О5, О9-О10. В паре О11-О12 хинон уступает в активности только в области  $IC_{50}$ , с увеличением концентрации различия нивелируются из-за большей крутизны зависимости «концентрация-эффект» для хинона.

Антирадикальный потенциал хинонов, являющихся окислителями, часто объясняют их гомолитической трансформацией в фенольные формы, но в этом случае вряд ли активность хинонов соответствовала бы активности фенолов и, тем более, превосходила её. Кроме того, распределение по активности в ряду хинонов было бы аналогичным ряду фенолов, однако, хиноны О10 и О12 идентичны во всем диапазоне действующих концентраций, тогда как их гидроксильные формы различаются в активности на порядки. Очевидно, хиноны участвуют в окислительно-восстановительных реакциях не за счет превращений в фенольные формы и реализации их восстановительного потенциала (для многих такие превращения энергетически не выгодны или не возможны в предлагаемых условиях), а за счет иных механизмов действия.

В ранее проведенных исследованиях показано, что изученные в нашем эксперименте хиноны абсолютно не активны в качестве ингибиторов радикальных реакций, инициируемых гамма-радиолизом *n*-гексана в насыщенной кислородом среде, зато такие ловушки кислород-центрированных радикалов как ионол, работали успешно [1, 5]. На этой модели ионол вдвое подавлял выход окисленных продуктов, эффективным оказалось и соединение О8, не действовавшее в клеточной системе. Соединения О6 и О11 были значительно менее эффективны, хиноны – О5, О7, О12 – не работали.



C.  
AUC ХЛ (Совокупная генерация АФК)

D.  
DAUC ХЛ (Nox2-зависимая генерация АФК)

Рис. 1. Распределение медианного эффекта при действии соединений серии «O1-O13» на модели зимозан-индуцированного респираторного взрыва макрофагов (по Chou [3])

Log (fa/fu) – логарифм отношения эффективной к неэффективной фракции; [C], М – концентрация вещества в моль/л; AUC обозначает действие в отношении совокупного пула АФК, генерируемого активированными фагоцитами; DAUC – действие в отношении Nox2-ассоциированной части АФК; RC – резорцин.



В тесте гамма-радиолиза этанола – модели для изучения селективности в отношении  $\alpha$ -гидроксилсодержащих углерод-центрированных радикалов –показано, что, наиболее активными радикальными ингибиторами являются хиноны (O12, O7, O5), соединение O11 несколько уступало O12, активность ионола и O6 была невысока, O8 практически не работал [1, 5]. Соединение O7 (пара O6-O7 в таблице 2В не представлена), которое было активно в тесте радиолиза этанола, не работает в нашей тест-системе, что, возможно, связано со стерическими затруднениями, которые должны возникать при взаимодействии таких молекул с объемными органическими углерод-центрированными радикалами, тогда как в случае гидроксиэтильного радикала стерические затруднения минимальны и соединение сохраняет эффективность.

Эти результаты в целом согласуются с нашими данными и объясняют высокую активность хинонов генерацией большого количества углерод-центрированных радикалов при активации фагоцитов. Возможность массивной генерации углерод-центрированных радикалов, инициирующих процессы распада органических молекул, при активации Nox2 фагоцитов показана ранее [4].

### **Выводы**

1. Антиоксидантная активность соединений в биосистемах может значительно отличаться от активности в химических тестах, что исключает простую взаимную экстраполяцию результатов антирадикального скрининга.

2. Эффект определяется не только структурой антиоксиданта, но и нейтрализуемого объекта, что потенциально важно для выбора фармакотерапевтической тактики при свободнорадикальной патологии.

3. Результаты исследования делают обоснованным поиск новых антирадикальных средств среди хинонов и соединений, обладающих способностью к быстрым гомолитическим трансформациям фенол-хинон *ex vivo*.

### **Литература**

1. Едимечева, И. П. Взаимодействие пространственно экранированных фенолов и хинонов с органическими радикалами / И. П. Едимечева [и др.] // Журнал общей химии. 2005. Т. 75. Вып. 4. С. 632–635.

2. Шадыро, О. И. Влияние фенольных соединений и хинонов на радиационно-индуцированные процессы окисления гексана и этанола / О. И. Шадыро [и др.] // Химия высоких энергий. 2008. Т. 42. № 2. С. 112–117.

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.

4. *Murphy, M. P.* Superoxide activates uncoupling proteins by generating carbon-centered radicals and initiating lipid peroxidation / M. P. Murphy [et al.] // The Journal of Biological Chemistry. 2008. V. 278, № 49. P. 48534–48545.

5. *Shadyro, O. I.* Quinones as free-radical fragmentation inhibitors in biologically important molecules / O. I. Shadyro [et al.] // Free radical research. 2002. V. 36, № 8. P. 859–867.

РЕПОЗИТОРИЙ БГМУ