

А.Ю. Иванова, О.С. Рашкевич
**ПРОТИВОВОСПАЛИТЕЛЬНЫЕ СВОЙСТВА РЕДОКС ТРИАДЫ
ПАРАБЕНЗОХИНОНА, СЕМИХИНОНА И ГИДРОХИНОНА**

Научный руководитель: канд. мед. наук, доц. А.В. Волчек

Кафедра фармакологии

Белорусский государственный медицинский университет

A.Y. Ivanova, O.S. Rashkevich
**ANTIINFLAMMATORY PROPERTIES OF REDOX-TRIAD
OF BENZOQUINONE, SEMIQUINONE AND HYDROQUINONE**

Tutor: PhD associate professor A.V. Vauchok

Department of Pharmacology

Belarusian State Medical University

Резюме. На модели острого каррагенинового отека лапы у мышей в редокс-паре 1,4-бензохинон / гидрохинон наибольшей противовоспалительной активностью и эффективностью обладал 1,4-бензохинон, который статистически значимо ингибировал все фазы воспаления, среднеэффективная доза 1,4-бензохинона на данной модели составила 4,5 мг/кг. Моделирование *in silico* выявило значительную аффинность 1,4-бензохинона и семихинона к участку гема ЦОГ2.

Ключевые слова: 1,4-бензохинон, гидрохинон, семихинон, редокс, каррагенин.

Resume. On experimental model of acute carrageenan paw edema in mice, from the redox pair: 1,4-benzoquinone/hydroquinone, 1,4-benzoquinone exactly had the highest anti-inflammatory activity and efficiency, which statistically significantly inhibited all phases of inflammation, the average effective dose of 1,4-benzoquinone in this model was 4.5 mg/kg. Modelling of interaction between COX2 and components of quinone redox-triade *in silico* reveals affinity of benzoquinone and semiquinone to hem of COX2.

Keywords: 1,4-benzoquinone, hydroquinone, semiquinone, redox, carrageenan

Актуальность. Хиноны являются важным компонентом многих окислительно-восстановительных систем клетки, выполняя функцию транспорта электронов через мембраны. В субстратах и тканях хиноны, как правило, свободно переносятся, равномерно распределены и могут существовать в биохимических процессах в трёх формах: окисленной (в частности, 1,4-бензохинон), семихинон и восстановленной (гидрохинон). Известно, что превращения в системах бензохинон-семихинон-гидрохинон и бензохинон-гидрохинон протекают как с участием ферментов, так и неферментативно [2, 5]. Хиноны могут подвергаться биоредуктивной активации двумя путями – восстановлением одним, или двумя электронами. Восстановление одним электроном дает семихинон, а восстановление двумя электронами дает соответствующий гидрохинон. Семихиноны способны реагировать с молекулярным кислородом с образованием бензохинона, в процессе чего O_2 восстанавливается, приводя к образованию супероксидных анион-радикалов (O_2^-). Показано, что бензохинон проявляет свойства сильного окислителя (+286 мВ) окисляя НАДФН (+320 мВ) [4].

Таким образом, 1,4-бензохинон и его производное семихинон являются акцепторами электронов, а семихинон дополнительно может служить источником актив-

ных форм кислорода. Перечисленные выше свойства редокс-триад хинон/семихинон/гидрохинон позволяет рассматривать их в качестве возможных регуляторов процессов генерации энергии в клетке.

Цель: изучить противовоспалительную активность и эффективность редокс-пары 1,4-бензохинон / гидрохинон *in vivo*, посредством моделирования *in silico* определить возможный механизм действия редокс-триады 1,4-бензохинон / семихинон / гидрохинон на воспаление.

Задачи:

1. На модели острого каррагенинового отека лапы у мышей определить противовоспалительные свойства гидрохинона и 1,4-бензохинона при внутривнутрибрюшинном введении в сравнении с препаратом сравнения диклофенаком.

2. Рассчитать показатели эффективности (индексы ингибирования) и активности (ED_{50}) соединений.

3. Провести молекулярный докинг взаимодействия 1,4-бензохинона, семихинона и гидрохинона с потенциальными белками-мишенями: ЦОГ1, ЦОГ2 и ЛОГ.

Материалы и методы. Противовоспалительную активность субстанций исследовали в опытах на 78 рандомбредных мышках-самцах массой 26-35 г на модели острого каррагенинового отека лапы, воспроизводящего экссудативно-клеточную фазу воспаления. Лямбда-каррагенин – ионогенный полисахарид, модельный флогогенный агент, широко используемый в экспериментальной медицине для скрининга и изучения противовоспалительных средств. Субплантарное введение каррагенина вызывает у мышей выраженную воспалительную реакцию, характеризующуюся 3-фазной динамикой течения. Первая фаза (нарастания отека) – занимает около 2 часов после инъекции флогогена, 2-я фаза (плато) продолжается примерно 2 последующих часа и 3-я фаза (регрессии отека) занимает последующие от 4-го до 12 часов, завершаясь обычно восстановлением исходных параметров конечности. Молекулярный механизм воспаления после введения в ткани геля каррагенина включает: индукцию ИЛ-8; активацию NFκB посредством толл-подобных рецепторов типов 4 и 6 и активных форм кислорода; экспрессию эластазы нейтрофилов, миелопероксидазы и НАДФН-оксидазы; наработку активных форм кислорода и простагландина E2 [1, 3]. Цитокины ИЛ-6 и ФНО-α не принимают участия в инициации каррагенинового воспаления.

Исследованные вещества вводили внутривнутрибрюшинно в виде растворов в объеме 0,4 мл / 10 г массы тела за 40 минут до индукции воспаления. В качестве препарата сравнения применяли диклофенак, обладающий стандартной для НПВС противовоспалительной эффективностью. Контрольные животные получали эквивалентный объем растворителя. Острое воспаление вызывали путем введения 1% водного раствора лямбда-каррагенина по 0,03 мл под плантарный апоневроз задней левой лапы. Воспалительную реакцию оценивали в динамике по величине отека стопы через 1, 2, 3, 4, 5 и 24 ч после инъекции флогогена. Толщину стопы измеряли с помощью микрометрического устройства с точностью до 0,01 мм в условиях постоянного давления. Противовоспалительный эффект соединений определяли по индексам ингибирования различных фаз воспалительной реакции в сравнении с плацебо и рассчитывали по формуле: $100 \times (S_d - S_p) / S_p$, где S_d и S_p – средние значения отека лапы соответственно

для групп, получавших испытуемые препараты или плацебо. Значения S_d и S_p находили методом суммирования площадей трапеций под кривыми в координатах «время-эффект». Полученные данные обрабатывали с использованием параметрического и непараметрического анализа по критериям U Уилкоксона-Манна-Уитни и Дункана. Различия между группами признавали достоверными при $p < 0,05$. Эффективные дозы (ED_{16} - ED_{84}) субстанций определяли методом регрессионного анализа, уравнение регрессии считали качественным при ошибке аппроксимации данных менее 15%.

Ирритант лямбда-каррагенин приобретен в Sigma Aldrich, США. Субстанции гидрохинона и 1,4-бензохинона были предоставлены кафедрой радиационной медицины и химико-фармацевтических технологий химического факультета Белорусского государственного университета; использован диклофенак производства Берлин-Хеми АГ, Германия.

Моделирование и анализ *in silico* взаимодействия 1,4-бензохинона, семихинона и гидрохинона с потенциальными белками-мишенями: ЦОГ1 (1CX2, 6Y3C), ЦОГ2 (4OTY, 4RRW, 4RRX, 4RRY, 5COX, 6BL4, 6COX) и ЛОГ (3D3L) проводили посредством программного продукта FYTdock, использующего Autodock Vina в полуавтоматическом режиме.

Результаты и их обсуждение. Эталонное противовоспалительное средство диклофенак в дозе 10 мг/кг статистически значимо ($p=0,014$ по критерию Дункана) подавляло все фазы отека лапы у мышей, индекс ингибирования острой фазы воспаления составил - $28,7 \pm 7,8$ (табл. 1), эффект препарата сохранялся на одном уровне на протяжении всего эксперимента. Дозы диклофенака 2,5 и 5 мг/кг показали, в целом, меньший эффект. Рассчитанная ED_{50} диклофенака – 14,2 мг/кг; ED_{16} – 6,0 мг/кг, а ED_{84} – 33,4 мг/кг (Рис.1). Гидрохинон в широком диапазоне доз 5 – 50 мг/кг не оказывал противовоспалительного действия.

Табл. 1. Индексы ингибирования различных фаз каррагенинового воспаления лапы (в %) у мышей диклофенака, гидрохинона и 1,4-бензохинона ($M \pm m$)

Субстанции	Доза, мг/кг	Фазы воспалительного отека			
		0-2 ч	2-5 ч	0-5 ч	0-24 ч
Диклофенак	2,5	-16,6±10,8	-14,1±8,1	-14,9±8,7	-14,1±8,5
	5	-8,1±8,4	-13,6±8,2	-11,7±7,3	-11,7±7,6
	10	-25,3±8,0*	-30,4±7,9*	-28,7±7,8*	-29,7±7,2*
1,4-бензохинон	1	+3,9±6,5	+5,6±3,7	+5,0±3,2	+4,4±3,0
	1,25	+2,4±6,6	+13,1±11,0	+9,4±7,4	+9,9±7,6
	2	-8,5±7,5	-3,1±5,8	-4,9±5,9	-4,7±4,9
	2,5	-20,5±8,2	-19,2±4,0*	-19,6±5,0*	-20,1±4,6*
	5	-32,2±7,8*	-27,7±8,6*	-29,2±8,2*	-28,5±8,0*
Гидрохинон	5	+12,7±10,4	+7,4±6,2	+9,2±7,3	+11,9±7,3
	50	-0,1±10,4	+9,7±9,9	+6,3±10,0	+7,8±10,8

Примечание. * - $p < 0,05$ в сравнении с плацебо по критерию Дункана; $n=6$

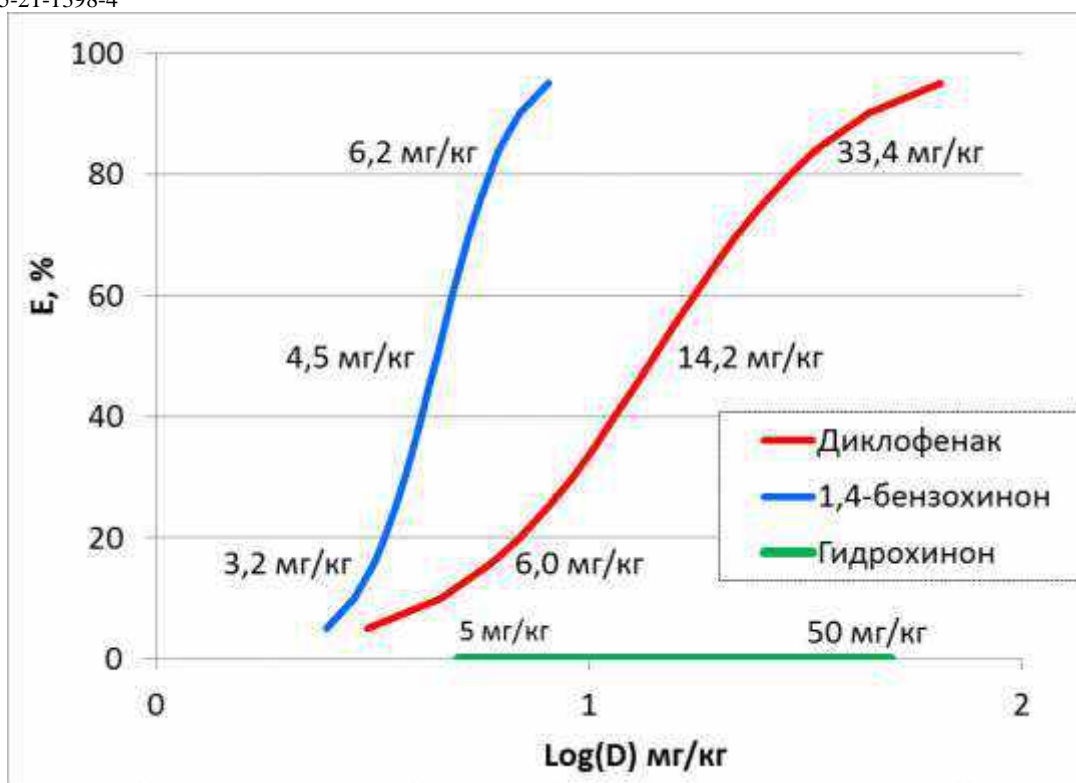


Рис. 1 – Кривые доза-противовоспалительный эффект 1,4-бензохинона, гидрохинона и диклофенака на модели острого каррагенинового воспаления лапы у мышей; обозначены ED₁₆, ED₅₀, ED₈₄

В результате исследования установлено, что 1,4-бензохинон дозозависимо ингибировал все стадии каррагенинового воспаления. Так, в дозах 1, 1.25 и 2 мг/кг препарат не оказывал существенного влияния на величину экссудативного отека лапы у мышей, а в дозах 2,5 и 5 мг/кг обладал значительным противовоспалительным действием, приближаясь к эффекту диклофенака в дозе 10 мг/кг. По выраженности действия на каждую фазу воспалительного отека в отдельности, продолжительности действия и по интегральному индексу ингибирования 1,4-бензохинон в дозе 5 мг/кг полностью соответствовал препарату сравнения. Регрессионный анализ показал стойкую корреляцию доза-противовоспалительный эффект в изученном диапазоне доз, данная закономерность сохранялась на протяжении всего периода наблюдений. При высоком уровне качества аппроксимации данных (точность более 95%), рассчитанная средне-эффективная доза 1,4-бензохинона (ED₅₀) на данной модели – 4,47 мг/кг; ED₁₆ и ED₈₄ составили, соответственно, 3,2 мг/кг и 6,2 мг/кг.

В условиях окислительного стресса и гиперпродукции активных форм кислорода при каррагениновом воспалении [1, 3], можно было ожидать смещения баланса в системе бензохинон / семихинон / гидрохинон влево, а 1,4-бензохинон, образующийся из гидрохинона, должен придавать последнему противовоспалительные свойства. Однако, в нашем исследовании на модели острого каррагенинового отека лапы, воспроизводящего экссудативно-клеточную фазу воспаления в редокс-паре 1,4-бензохинон / гидрохинон наибольшей противовоспалительной активностью и эффективностью обладал 1,4-бензохинон, который статистически значимо ингибировал все

фазы воспаления. Восстановленное соединение 1,4-бензохинона – гидрохинон в широком диапазоне доз при однократном применении не оказывал противовоспалительного действия, а по показателям динамики фаз каррагенинового отека животные этой экспериментальной группы принадлежали к единой генеральной совокупности с группой плацебо с вероятностью 73-98%. Установлено, что на данной экспериментальной модели противовоспалительным эффектом обладает именно окисленная форма бензохинона, различия величины отека стопы групп, получавших эквивалентные дозы гидрохинона и 1,4-бензохинона достоверны, $p=0,0003 - 0,0005$.

Моделирование *in silico* взаимодействия хинонов с потенциальными мишенями выявило значительную аффинность 1,4-бензохинона и семихинона к участку гема ЦОГ2. Гидрохинон не взаимодействовал с известными активными центрами ЦОГ. Выявленное при моделировании *in silico* взаимодействие 1,4-бензохинона с гемом ЦОГ2, обладающим пероксидазной активностью, вероятно, может привести к ингибированию превращения простагландина G2 в простагландин H2.

Выводы:

1. 1,4-бензохинон обладает значительным противовоспалительным эффектом на модели острого каррагенинового отека у мышей. ED₅₀ 1,4-бензохинона на данной модели – 4,47 мг/кг.
2. Восстановленное соединение 1,4-бензохинона – гидрохинон в широком диапазоне доз при таких же условиях не оказывает противовоспалительного действия.
3. Семихинон 1,4-бензохинон *in silico* продемонстрировали аффинность к гемму ЦОГ2, обладающему пероксидазной активностью.

Литература

1. Barth C.R. Carrageenan-induced inflammation promotes ROS generation and neutrophil extracellular trap formation in a mouse model of peritonitis / C.R. Barth, G.A. Funchal, C. Luft, R. Jarbas et al. // *European Journal of Immunology*, – 2016. – №46(4). – P.964–970.
2. Kelly, R. A. Modelling changes in glutathione homeostasis as a function of quinone redox metabolism / R. A. Kelly, J. Leedale, D. Calleja, et al. // *Sci Rep*. – 2019. – № 9. – P. 6333.
3. Myers M.J. Molecular mechanism of action responsible for carrageenan-induced inflammatory response / M.J.Myers, C.M. Deaver, A.J. Lewandowski // *Mol Immunol*. – 2019. – № 109. – P.38-42.
4. Song, Y. Thermodynamic and kinetic considerations for the reaction of semiquinone radicals to form superoxide and hydrogen peroxide / Y. Song, G. R. Buettner. // *Free Radical Biology & Medicine*. - 2010. - №49(6). – P. 919–962.
5. Wellington, K. W. Understanding cancer and the anticancer activities of naphthoquinones / K. W. Wellington // *RSC Adv*. – 2015. – № 5. – P. 20309-20338.