

ФАРМАЦІЯ

Н. В. Поліш¹, Н. Г. Марінцова¹, А. І. Кархут¹, О. С. Яремкевич¹, О. В. Карпенко²¹ Національний університет “Львівська політехніка”,

кафедра технології біологічно активних сполук, фармації та біотехнології

² Інститут фізико-органічної хімії і вуглехімії ім. Л. М. Литвиненка НАН України,

відділення фізико-хімії горючих копалин

polishn@ukr.net

АНТИОКСИДАНТНА АКТИВНІСТЬ ГЕТЕРОЦИКЛІЧНИХ
АМІНОВІСНИХ ПОХІДНИХ НАФТОХІНОНУ ТА ЇХ КОМПОЗИЦІЙ
З ПОВЕРХНЕВО-АКТИВНИМИ РАМНОЛІПІДАМИ<https://doi.org/10.23939/ctas2021.01.109>

Отримано композиційні препарати на основі гетероциклічних аміновмісних похідних нафтохінону і поверхнево-активних рамноліпідів. Досліджено інтенсивність процесів пероксидного окиснення ліпідів (ПОЛ), окисної модифікації білків (ОМБ) та радикалпоглинальної активності щодо 1,1-дифеніл-2-пікрілгідразилу (ДФПГ). Визначено, що сполука 2-[(6-(4-фторофеніл-5-оксо-2,5дигідро-1,2,4-триазин-3-іл)феніл)аміно]нафтален-1,4-діон 1d та її композиційний препарат з рамноліпідом 1d+РЛ проявили високу антиоксидантну активність щодо процесів ПОЛ й ОМБ. Встановлено, що усі синтезовані сполуки виявляють антиоксидантну активність у процесах ПОЛ.

Ключові слова: антиоксидантна активність; 1,4-нафтохінони; поверхнево-активні рамноліпіди; *Pseudomonas aeruginosa*.

Вступ

Основа метаболічних процесів людини – окиснювально-відновні реакції, в результаті яких постійно утворюються активні форми кисню (АФК), такі як: супероксид-аніон ($O_2^{\cdot-}$), синглетний кисень (1O_2), пероксид водню (H_2O_2), гідропероксильний радикал (HO_2^{\cdot}), пероксинітрит ($ONOO^-$), оксид нітрогену (NO) та найактивніший – гідроксильний радикал (HO^{\cdot}). АФК у надлишкових кількостях пошкоджують біомолекули, а також білки, ліпіди, РНК і ДНК. Хоча супероксид-аніон не є найреактивнішим, проте, через його здатність ініціювати генерацію найактивніших АФК (HO^{\cdot} і $ONOO^-$), може викликати в організмі людини окиснювальний стрес (ОС) [1], який, своєю чергою, спричиняє значні пошкодження клітин. Передувати такому порушенню окисно-відновної рівноваги в організмі можуть багато факторів, як-от: умови життя, екологія, психоемоційне напруження, генетичні фактори.

Сьогодні відомий взаємозв'язок між вільнорадикальним окисненням та розвитком багатьох важких захворювань, таких як атеросклероз, гіпертензія, хвороба Альцгеймера, хвороба Паркінсона [2], рак, артрит, нейродегенеративні розлади, діабет тощо [3]. Основна група препаратів, здатних протистояти оксидативному стресу, – антиоксиданти (АО), котрі гальмують розвиток вільнорадикальних реакцій, запобігаючи утворенню пероксидів, які пошкоджують клітинні та субклітинні мембрани, що важливо для розвитку організму, нормального функціонування нервової та м'язової систем [4, 5].

Саме тому актуальним завданням дослідників сьогодні є пошук нових антиоксидантів, які могли б підвищити стійкість організму людини до дій активних форм кисню чи нітрогену та перешкоджати процесам окиснювального стресу, а також були б ефективними в боротьбі із низкою захворювань.

Як відомо з літературних джерел, похідні 1,4-нафтохінону, завдяки їхнім окисно-відновним властивостям, тобто здатності регулювати потік електронів у дихальному ланцюзі, діючи на молекулярні механізми обміну кисню в тканинах, впливаючи на функціонування організму людини загалом [6], можна використовувати як антиоксиданти.

Саме тому ми вибрали для дослідження антиоксидантної активності гетероциклічні аміновмісні похідні нафтохінону та їх комплекси з біогенними поверхнево-активними рамноліпідами (біоПАР). Основна мета сумісного використання синтетичних похідних нафтохінону та біогенних ПАР – покращення розчинності у воді та зменшення терапевтичної дози (інгібуючої концентрації) препарату.

Відомо, що біогенні поверхнево-активні речовини здатні збільшувати проникність клітинних мембран та підсилювати дію інших речовин у разі сумісного використання, а також низькотоксичні, екологічно безпечні, що є надзвичайно важливим аспектом.

Рамноліпіди синтезують представники роду *Pseudomonas*, вони найпоширеніші серед біоПАР. Вони складаються із гідрофільної “голови”, яка представлена однією або двома молекулами рамнози, і гідрофобного “хвоста” – одного або двох ланцюгів жирних кислот, що визначає її поверхнево-активні властивості: емульгування жирів та вуглеводнів, змочування різних поверхонь, зниження поверхневого і міжфазного натягу, підвищення проникності клітинних мембран [7, 8].

Мета роботи – дослідження антиоксидантної активності нових гетероциклічних аміновмісних похідних нафтохінону та їх композиційних препаратів із біоПАР *in vitro* та радикалпоглинальної активності щодо 1,1-дифеніл-2-пікрілгідразилу (DPPH) в досліджуваних препаратах.

Матеріали та методи досліджень

У роботі використано продукт мікробного синтезу штаму *Pseudomonas sp.* PS-17, що містить поверхнево-активний рамноліпід, отриманий у Відділенні фізико-хімії горючих копалин ІнФОВ ім. Л. М. Литвиненка НАН України.

Гетероциклічні амінопохідні нафтохінону (**1a-c**): етил-4-((3-хлоро-1,4-діоксо-1,4-дигідро-нафтален-2-іл)аміно)-1-феніл-1Н-піразол-3-карбоксилат (**1a**), 2-хлоро-3-((3-(*p*-толіл)-1Н-піразол-5-іл)аміно)нафтален-1,4-діон (**1b**), 2-хлоро-3-((1-(дифторометил)-1-Н-піразол-3-іл)-аміно)-нафтален-1,4-діон (**1c**) були синтезовані реакцією нуклеофільного заміщення атома хлору 2,3-дихлоро-1,4-нафтохінону відповідним аміном, 2-[(6-(4-фторофеніл-5-оксо-2,5дигідро-1,2,4-триазин-3-іл)феніл)аміно]нафтален-1,4-діон (**1d**) одержаний реакцією приєднання 2-(6-арил-5-оксо-2,5-дигідро-1,2,4-триазин-3-іл)аніліну за Міхаелем до 1,4-нафтохінону. Методики одержання гетероциклічних амінопохідних нафтохінону ми описували у попередніх працях [9–11].

Поверхневий натяг композицій вимірювали методом, оснований на визначенні максимального тиску в бульбашці на приладі ППНЛ-1 [12]. Для статистичного аналізу достовірності експериментальних даних використовували загальноприйняті методи варіаційної статистики [13].

Вимірювання поверхневого натягу здійснювали таким способом: готували водні розчини гетероциклічних аміновмісних похідних нафтохінону в діапазоні концентрацій 10^{-4} – 10^{-2} г/мл та витримували їх 24 години за кімнатної температури. Значення максимального тиску в середині бульбашки фіксували в часовій точці 5 ± 1 с від утворення бульбашки.

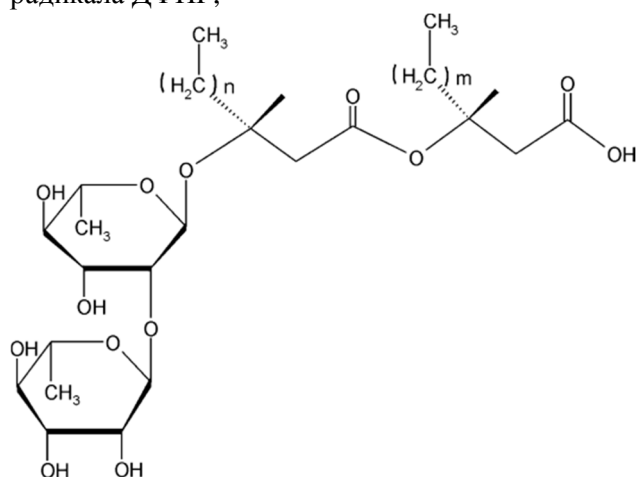
Біологічна активність

Антиоксидантну активність досліджували *in vitro*, визначаючи зміну концентрації вільного радикала [14] методом поглинання радикала 1,1-дифеніл-2-пікрілгідразилу (ДФПГ). Початкова концентрація ДФПГ у розчині становила $1,5 \cdot 10^{-4}$ моль/л. Розчини досліджуваних речовин готували в концентрації $1 \cdot 10^{-3}$ моль/л. Всі речовини розчиняли в етанолі. Для проведення досліджень змішували 2,7 мл розчину ДФПГ вихідної концентрації та 0,3 мл розчину досліджуваної сполуки. Реакцію проводили за кімнатної температури протягом 30 хв, після чого вимірювали оптичну густину за 517 нм на фотоколориметрі ULAB 108UV. Вимірювання виконували тричі з незалежними аліквотами.

Для контролю змішували 2,7 мл розчину ДФПГ та 0,3 мл етанолу. Як стандарт використовували іонол у концентрації $1 \cdot 10^{-3}$ моль/л. Радикалпоглинальну активність обчислювали за формулою:

$$RPA = \frac{A_{DPPH} - A_s}{A_{DPPH}} \cdot 100\%$$

де A_{DPPH} – оптична густина розчину вільного радикала ДФПГ,



A_s – оптична густина розчину ДФПГ із досліджуваною речовиною.

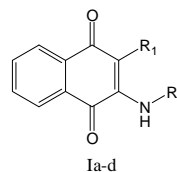
Для досліджень впливу гетероциклічних аміновмісних похідних нафтохінону та їх композицій на процеси пероксидного окиснення ліпідів (ПОЛ) та окисної модифікації білків (ОМБ) використовували їх спиртові розчини (етанол : вода, 1 : 3) у концентрації 10^{-6} М. Дослідження проводили на гомогенаті печінки щура. Визначали обидва показники оксидативного стресу в одній пробі. 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. За високої температури в кислому середовищі МДА реагує із ТБК, утворюючи забарвлений триметиновий комплекс з максимумом поглинання за 532 нм [14]. Кількість білка у пробах визначали за методом Лоурі [15]. Ступінь ОМБ визначали за кількістю утворених додаткових карбонільних груп (КГ) у бічних ланцюгах амінокислот, вміст яких визначали в реакції з 2,4-динітрофенілгідразином [16]. Вміст КГ білків визначали на спектрофотометрі ULAB 108UV за довжини хвилі 370 нм.

Результати досліджень та їх обговорення

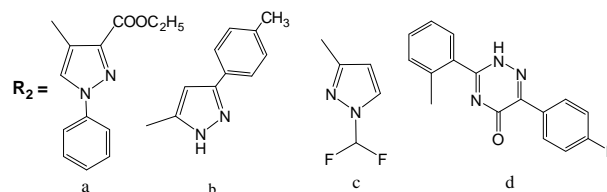
Загальна методика приготування композицій на основі рамноліпідів та гетероциклічних амінопохідних нафтохінону

Для приготування композицій відповідного гетероциклічного аміновмісного похідного нафтохінону (НХ) з рамноліпідами (РЛ) брали 0,01 г гетероциклічного аміновмісного похідного нафтохінону (**1a-d**), розчиняли у 1 мл диметилсульфоксиду (ДМСО). Окремо готували розчин рамноліпідів: 0,01 г РЛ розчиняли в 48,8 мл дистильованої води за рН 7, температури 20–25 °С, постійно перемішуючи та контролюючи рН, невеликими порціями додавали розчин відповідного аміновмісного похідного нафтохінону. Отримали стабільні за кімнатної температури комплекси.

2 – рамноліпід, $n, m = 6$



$R_1 = -Cl$

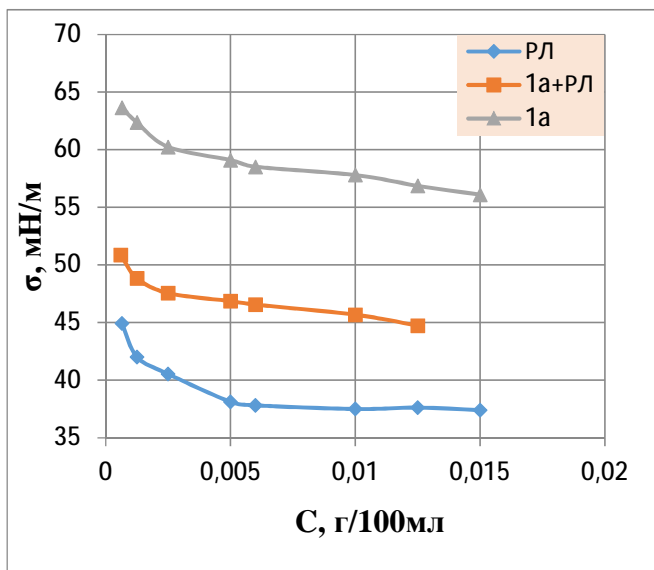


де **1a** – етил-4-((3-хлоро-1,4-діоксо-1,4-дигідронафтален-2-іл)аміно)-1-феніл-1Н-піразол-3-карбоксілат, 2-хлоро-3-((3-(*p*-толіл)-1Н-піразол-5-іл)аміно)нафтален-1,4-діон (**1b**), 2-хлоро-3-((1-(дифторометил)-1-Н-піразол-3-іл)-аміно)-нафтален-1,4-діон (**1c**), 2-[(6-(4-фторофеніл-5-оксо-2,5дигідро-1,2,4-триазин-3-іл)феніл)аміно]нафтален-1,4-діон (**1d**).

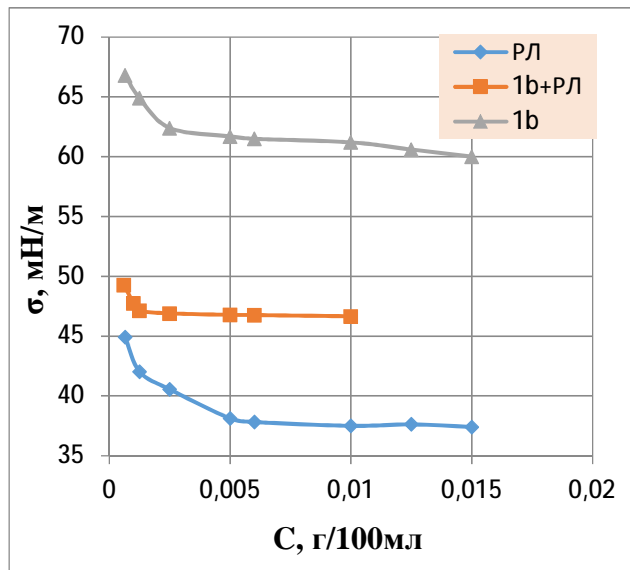
Фізико-хімічні характеристики композицій

Утворення композицій на основі рамноліпідів та гетероциклічних амінопохідних нафтохінону підтверджується зміною поверхневого натягу композицій порівняно з розчинами їх компонентів у тій самій концентрації.

Як видно з рис. 1 і 2, у композиціях гетероциклічних амінопохідних нафтохінону з рамноліпідами **1a-d**+РЛ, порівняно з розчинами сполук **1a-d**, спостерігається зниження поверхневого натягу від 59–62 мН/м до 40–47 мН/м відповідно, що свідчить про утворення поверхнево-активних комплексів між сполуками **1a-d** та рамноліпідом.

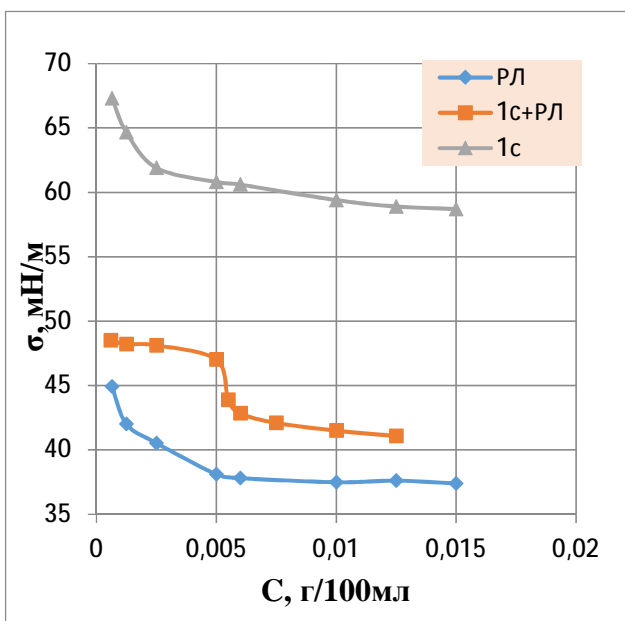


а

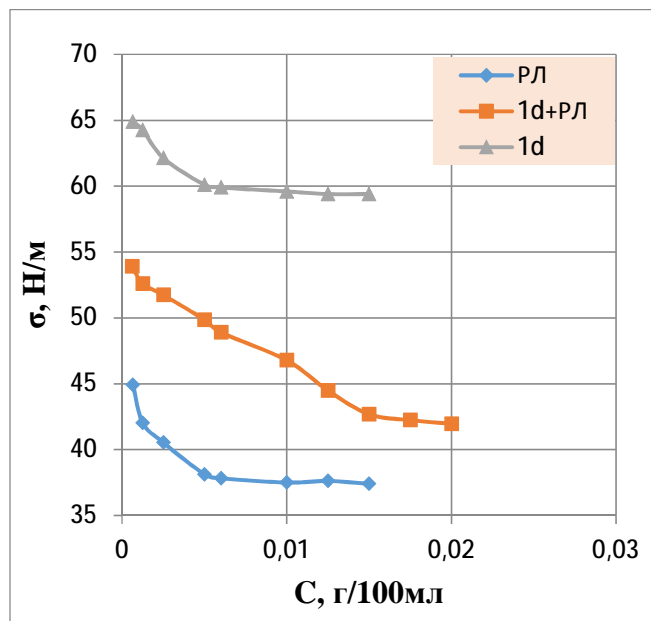


б

Рис. 1. Ізотерми поверхневого натягу гетероциклічних амінопохідних нафтохінону **1a, b** (а), рамноліпиду **PL** та комплексних препаратів на їх основі **1a,b+PL** (б)



а



б

Рис. 2. Ізотерми поверхневого натягу гетероциклічних амінопохідних нафтохінону **1c, d** (а), рамноліпиду **PL** та комплексних препаратів на їх основі **1c, d+PL** (б)

На основі побудованих ізотерм поверхневого натягу комплексних препаратів ми визначили точки ККМ – критичні концентрації міцелутворення, вимірюючи поверхневий натяг розчинів композицій за зміни їх концентрації. ККМ визначено за характерною точкою зламу кривої, правіше від якої (тобто із подальшим збільшенням концентрації ПАР) відбувається утворення міцел в об'ємі розчину, а поверхневий натяг розчину практично не змінюється.

Порівнявши дані, отримані у ході нашого дослідження, з відповідними даними для еталонної речовини – аскорбінової кислоти (РПА = 21,5 %), можна зробити висновок, що синтезовані речовини виявляють невелику радикалпоглинальну активність. Із табл. 2 видно, що з досліджуваних сполук та їх комплексів проявляють найвищу радикалпоглинальну активність 2-[(6-(4-фторофеніл-5-оксо-2,5-дигідро-1,2,4-триазин-3-іл)феніл)аміно] нафтален-1,4-діон (**1d**) та його комплекс із

рамноліпідом (**1d+РЛ**). Так, 2-[(6-(4-Фторофеніл-5-оксо-2,5дигідро-1,2,4-триазин-3-іл)феніл) аміно] нафтален-1,4-діон (**1d**), взаємодіючи з ДФПГ, нейтралізує вільнорадикальний центр ДФПГ на 14,6 %, у комплексі з рамноліпідами (**1d+РЛ**) цей показник зменшується вдвічі та становить 7,7 %. Як бачимо, у комплексі з рамноліпідами у сполуки **1a** зростає здатність до інгібування приблизно вдвічі (**1a** – 3,6 %, **1a+РЛ** – 5,6 %).

Таблиця 1

Критична концентрація міцелоутворення

ККМ, г/100 мл			
1a	1b	1c	1d
0,00168	0,0013	0,0059	0,0165

Таблиця 2

Результати визначення радикалпоглинальної активності гетероциклічних похідних нафтохінону (1a-1d)

№ сполуки	РПА, %
RL	0,7
1a	3,6
1a+RL	5,6
1b	3,0
1b+RL	1,2
1c	5,1
1c+RL	4,1
1d	14,6
1d+RL	7,7

Для оцінювання впливу досліджуваних речовин на процеси пероксидного окиснення ліпідів (ПОЛ) та окисної модифікації білків (ОМБ) використано показники оксидативного стресу: вміст пероксидів ліпідів та продуктів їхнього метаболізму (ТБК-активні продукти), а також вміст КГ білків. Результати досліджень показали (рис. 3), що антиоксидантну активність у процесах ПОЛ проявляють усі досліджувані сполуки, оскільки за їх дії відбулося зниження вмісту ТБК-активних продуктів: на 30 ± 35 % для сполуки **1a-c** та її композиції з рамноліпідом, сполук **1d** на 16 %, **1d+РЛ** близько 50 % відповідно. Як видно з рис. 3, найкращий результат у композиції **1d+РЛ**. Це можна пояснити тим, що рамноліпіди підвищують біодоступність сполуки та її проникність у клітинні мембрани печінки щура.

Результати досліджень впливу аміновмісних похідних на процеси ОМБ показали (рис. 4), що значну антиоксидантну активність проявила речовина **1d** та її комплекс з рамноліпідами, оскільки за їх дії вміст КГ знизився щодо контролю на 36 % і 40 % відповідно. Менш виражену антиоксидантну активність у процесах ОМБ проявили речовини **1a-c** і їх композиції з рамноліпідами, оскільки вміст КГ знизився відносно контролю на 25 % і 20 % відповідно. Серед досліджуваних гетероциклічних амінопохідних нафтохінону композиція **1d+РЛ** з рамноліпідами проявила високу антиоксидантну активність у процесах ПОЛ та ОМБ.

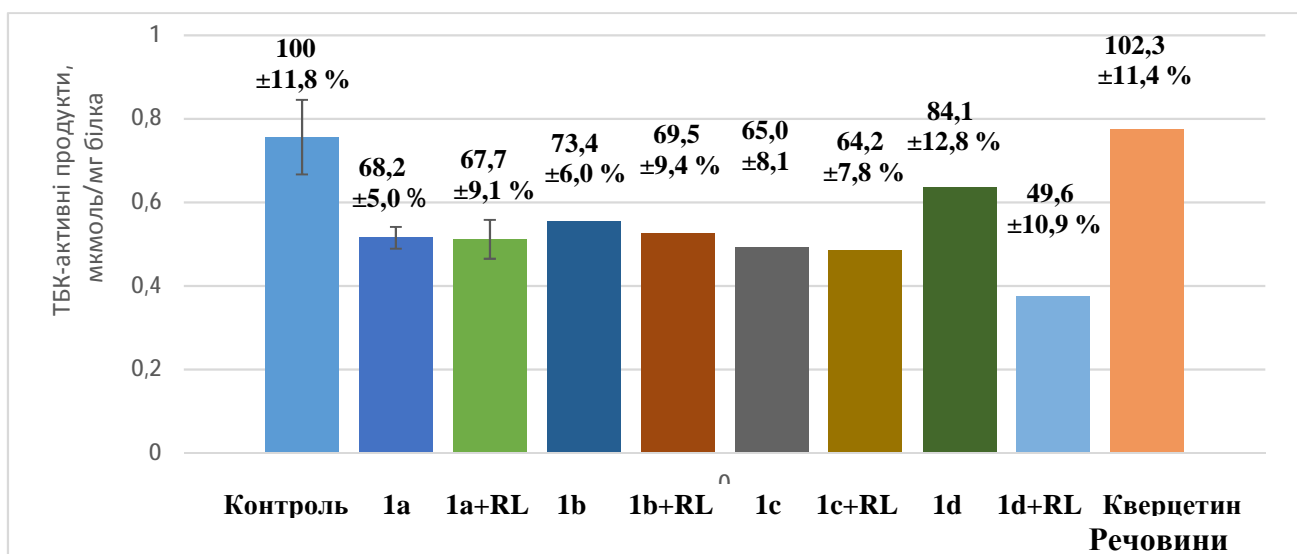


Рис. 3. Вміст ТБК-активних продуктів у гомогенаті печінки щура за умови дії 1a-d та 1a-d+РЛ

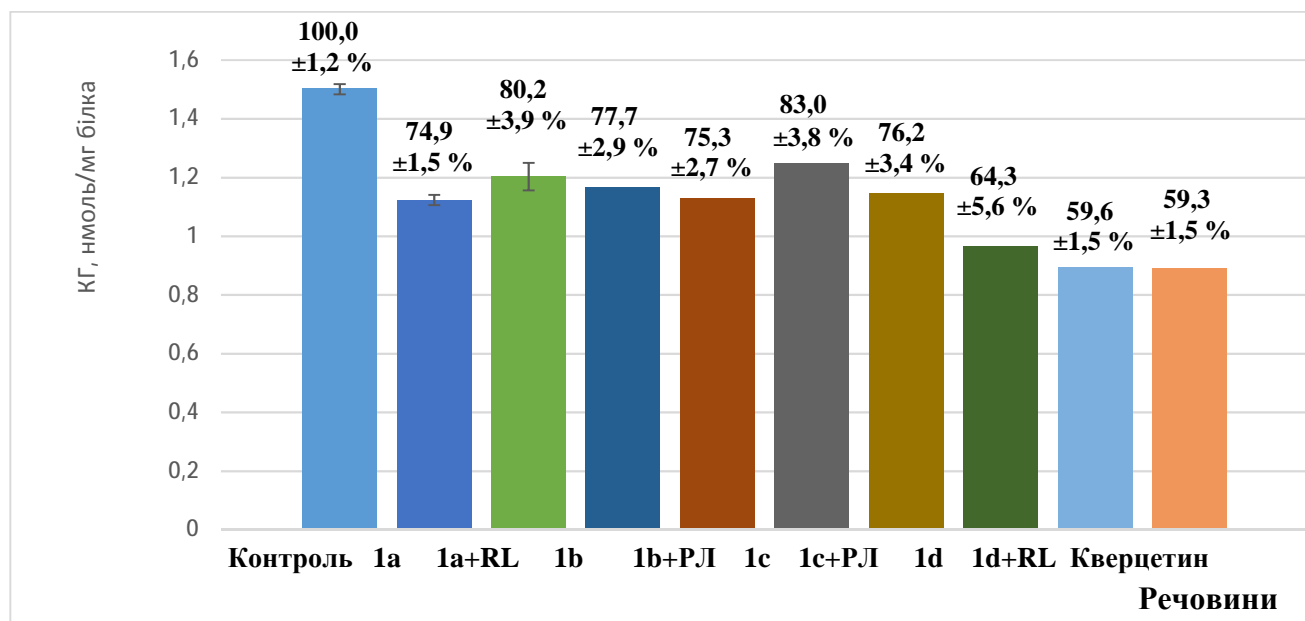


Рис. 4. Вміст КГ у гомогенаті печінки щура за умови дії 1a-d та 1a-d+PL

Для порівняння проведено дослідження також із відомим антиоксидантом – кверцетином. За дії кверцетину вміст ТБК-активних продуктів підвищився на 2,3 %, а у процесах ОМБ вміст КГ знизився на 40,7 %, рамноліпідний комплекс **1d+PL** проявив аналогічну антиоксидантну активність у процесах ОМБ, що підтвердило його антиоксидантні властивості. Встановлено, що за дії одних аміновмісних похідних нафтохінону інтенсифікуються процеси ПОЛ та ОМБ, тобто зростає вміст продуктів вільнорадикального окиснення ліпідів та білків, що, ймовірно, може спричинити 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. Це можна пояснити впливом біоПАР на проникність клітинних мембран мікроорганізмів, здатністю до сольобілізації малорозчинних у воді речовин.

Висновки

Досліджено вплив гетероциклічних аміновмісних похідних нафтохінону та їх композицій на процеси пероксидного окиснення ліпідів та окисної модифікації білків. Серед досліджуваних сполук найвищу антиоксидантну активність проявили 2-[(6-(4-фторофеніл-5-оксо-2,5дигідро-

1,2,4-триазин-3-іл)феніл)аміно]нафтален-1,4-діон **1d** та його композиція з рамноліпідом **1d+PL**, що робить їх перспективними для подальших досліджень. Вплив рамноліпиду на проникність клітинних мембран та на сольобілізацію речовин підтверджується збільшенням антиоксидантної активності композиції **1d+PL** порівняно з сполукою **1d**.

References

1. Kasote, D. M., Katyare, S. S., Hegde, M. V., & Bae, H. (2015). Significance of antioxidant potential of plants and its relevance to therapeutic applications. *International journal of biological sciences*, 11(8), 982. doi:10.7150/ijbs.12096
2. Zhu, X., Raina, A. K., Lee, H. G., Casadesus, G., Smith, M. A., & Perry, G. (2004). Oxidative stress signalling in Alzheimer's disease. *Brain research*, 1000(1-2), 32–39. doi:10.1016/j.brainres.2004.01.012
3. Peterhans, E. (1997). Oxidants and antioxidants in viral diseases; disease mechanisms and metabolic regulation. *J. Nutr*, 127, 962. doi:10.1093/jn/127.5.962S
4. Devasagayam, T. P. A., & Kesavan, P. C. (1996). Radioprotective and antioxidant action of caffeine : mechanistic considerations. *Indj exp boil*, 34(4), 291–297.
5. Carcho, M., & Ferreira, I. C. (2013). A review on antioxidants, prooxidants and related controversy: natural and synthetic compounds, screening and analysis methodologies and future perspectives. *Food and chemical toxicology*, 51, 15–25. doi:10.1016/j.fct.2012.09.021
6. Silakari, P., & Piplani, P. (2020). p-Benzoquinone as a Privileged Scaffold of Pharmacological Significance:

A Review. *Mini reviews in medicinal chemistry*, 20(16), 1586–1609. doi:10.2174/1389557520666200429101451

7. Gudiña, E. J., Rangarajan, V., Sen, R., & Rodrigues, L. R. (2013). Potential therapeutic applications of biosurfactants. *Trends in pharmacological sciences*, 34(12), 667–675. doi:10.1016/j.tips.2013.10.002

8. Müller, M. M., Kügler, J. H., Henkel, M., Gerlitzki, M., Hörmann, B., Pöhnlein, M., ... & Hausmann, R. (2012). Rhamnolipids –next generation surfactants? *Journal of biotechnology*, 162(4), 366–380. doi:10.1016/j.jbiotec.2012.05.022

9. Polish, N., Nesterkina, M., Marintsova, N., Karkhut, A., Kravchenko, I., Novikov, V., & Khairulin, A. (2020). Synthesis and Evaluation on Anticonvulsant and Antidepressant Activities of Naphthoquinone Derivatives Containing Pyrazole and Pyrimidine Fragments. *Acta Chimica Slovenica*. doi:10.17344/acsi.2020.5938

10. Polish, N. V., Marintsova, N. G., Zhurakhivska, L. R., Novikov, V. P., Vovk, M. V. (2019). Synthesis and prediction of the biological activity of heterocyclic n-derivatives naphthoquinone. *Chemistry, Technology and Application of Substances*, 2 (1), 69–75. doi:http://doi.org/10.23939/ctas2019.01.069

11. Polish, N. V., Marintsova, N. G., Karkhut, A. I., Kovalenko, S. I., Novikov, V. P. (2020). Synthesis of new 1,2,4-triazine- And 1,2,4-triazole-containing 1,4-naphthoquinone derivatives and the study of their biological activity. *Voprosy Khimii i Khimicheskoi Tekhnologii*, 5, 73–80. doi: 10.32434/0321-4095-2020-132-5-73-80

12. Fainerman, V. B., & Miller, R. (2011). Maximum bubble pressure tensiometry: theory, analysis of experimental constrains and applications. *Bubble and drop interfaces*, 75–118. Brill.

13. Lakin, A. N. (1990). *Kurs variatsionnoy statistiki*. K.: Vishcha shkola.

14. Molyneux, P. (2004). The use of the stable free radical diphenylpicrylhydrazyl (DPPH) for estimating antioxidant activity. *Songklanakarin. J. sci. technol*, 26(2), 211–219.

15. Michiels, C., & Remacle, J. (1991). Cytotoxicity of linoleic acid peroxide, malondialdehyde and 4-hydroxynonenal towards human fibroblasts. *Toxicology*, 66(2), 225–234. doi:10.1016/0300-483X(91)90221-L

16. Blois, M. S. (1958). Antioxidant determinations by the use of a stable free radical. *Nature*, 181(4617), 1199–1200.

N. V. Polish¹, N. G. Marintsova¹, A. I. Karkhut¹, O. S. Yaremkevych¹, O. V. Karpenko²

¹ Lviv Polytechnic National University,

Department of Technology Biologically Compounds, Pharmacy and Biotechnology

² National Academy of Sciences,

Lytvynenko Institute of Physicoorganic and Coal Chemistry Ukrainian,

Department of Fossil Fuels

polishn@ukr.net

ANTIOXIDANT ACTIVITY OF HETEROCYCLIC AMINO CONTAINING DERIVATIVES OF NAPHTHOQUINONE AND THEIR COMPOSITIONS WITH SURFACE-ACTIVE RHAMNOLIPIDS

Composite preparations based on heterocyclic amine-containing naphthoquinone derivatives and surfactant rhamnolipids were obtained. The intensity of the processes of lipid peroxidation (LPO), oxidative modification of proteins (OMB) and radical-absorbing activity against 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DFPG) was studied. Compounds exhibiting high antioxidant activity against LPO and OMB processes were identified, namely: 2-[(6-(4-fluorophenyl-5-oxo-2,5-dihydro-1,2,4-triazin-3-yl) phenyl)amino]naphthalene-1,4-dione **1d** and its composite preparation with rhamnolipid **1d + RL**. It was found that all synthesized compounds show antioxidant activity in LPO processes.

Key words: antioxidant activity; 1,4-naphthoquinones; surface-active rhamnolipid; *Pseudomonas aeruginosa*.