

Ю. Н. Олудина¹, М. А. Сазыкина², Е. В. Празднова², И. С. Сазыкин²,
Л. Е. Хмелевцова², С. В. Бухаров¹, Т. А. Барсукова¹, Р. Г. Тагашева¹,
Г. Н. Нузуманова¹

СИНТЕЗ МОДИФИЦИРОВАННЫХ ПРОСТРАНСТВЕННО-ЗАТРУДНЕННЫХ ФЕНОЛОВ И ИССЛЕДОВАНИЕ ИХ СПОСОБНОСТИ ЗАЩИЩАТЬ ДНК БАКТЕРИЙ ОТ ПОВРЕЖДЕНИЯ УЛЬТРАФИОЛЕТОМ В

¹ ФГБОУ ВПО "Казанский национальный исследовательский технологический университет", Казань, Россия

² Южный федеральный университет, Научно-исследовательский институт биологии, Ростов-на-Дону, Россия

Получены новые производные пространственно-затрудненных фенолов и изучена их ДНК-протекторная активность при действии УФ-света. Исходя из полученных экспериментальных данных, исследованные соединения защищают генетический материал как от прямого воздействия УФ-В, так и от АФК, возникающих в клетке под его воздействием, и могут быть перспективными компонентами препаратов, защищающих от ультрафиолетового излучения.

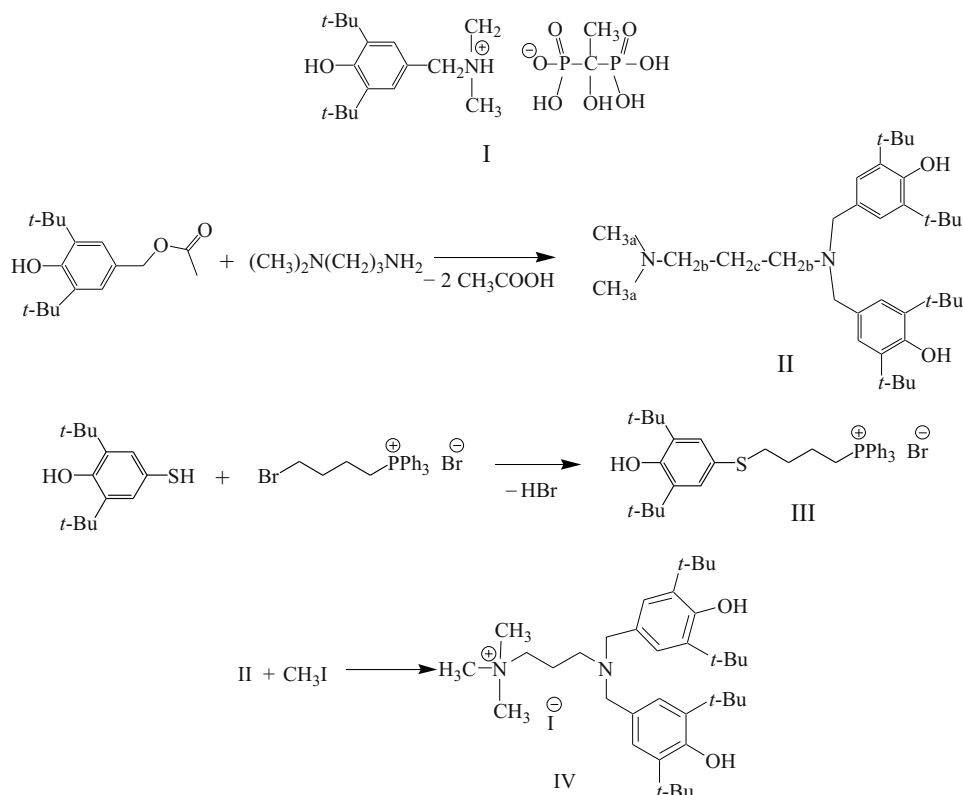
Ключевые слова: пространственно-затрудненные фенолы; УФ-излучение; протекторная активность.

В литературе имеются данные о том, что все 3 вида УФ-излучения (УФ А, В и С) обладают мутагенной и канцерогенной активностью. Известно, что избыточное облучение УФ играет значительную роль в развитии основных форм рака кожи (меланома, плоскоклеточная и базальноклеточная карцинома) [1, 2].

В отличие от эффектов более жесткого излучения, мутагенез, вызываемый характерным для земной поверхности УФ В, имеет окислительную природу. При облучении им в клетках происходит повышение со-

держания активных форм кислорода (АФК). Мишенью этих частиц может оказаться наследственный аппарат [3, 4]. Это обуславливает необходимость поиска природных и синтетических веществ, способных осуществлять эффективную защиту генетического аппарата от окислительного повреждения, индуцированного УФ-излучением [5].

Пространственно-затрудненные фенолы широко используются в качестве антиоксидантов в фармакологии, пищевой промышленности и технике. В настоя-



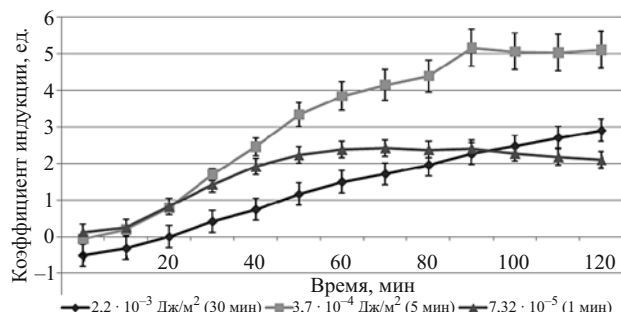


Рис. 1. Индукция биолюминесценции штамма *E. coli* MG1655 (pKatG-lux) под влиянием УФ-излучения с длиной волны 311 нм.

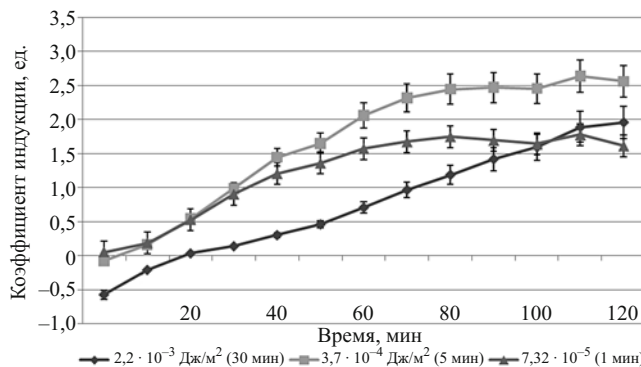


Рис. 2. Индукция биолюминесценции штамма *E. coli* MG1655 (pRecA-lux) под влиянием УФ-излучения с длиной волны 311 нм.

щей работе осуществлен синтез и проведено сравнительное исследование протекторных свойств ряда соединений этой группы I – IV, существенно различающихся по липофильным и гидрофильным свойствам. Синтез соединения (I) описан в работе [6], схемы синтеза соединений II – IV приведены ниже.

Экспериментальная химическая часть

ИК-спектры сняты в вазелиновом масле на Фурье-спектрометре “Tensor-27” (Bruker). Спектры ЯМР ¹H зарегистрированы на спектрометре Bruker Avance-600 с рабочей частотой 600 МГц.

4,4'-[3-(Диметиламино)пропил]имино}ди(метилена)бис(2,6-ди-*трет*-бутилфенол) (II). К раствору 5 г (0,1 моль) 3,5-ди-*трет*-бутил-4-гидроксибензил-ацетата в 40 мл метанола добавляют раствор 2,25 мл (0,1 моль) 3-аминопропилдиметиламина в 15 мл метанола и перемешивают при комнатной температуре в течение 0,5 ч. Затем реакционную массу обрабатывают 10 % водным раствором NaCl. Выпавший осадок отфильтровывают, промывают водой, сушат. Выход

соединения II 2,8 г (58 %), порошок белого цвета. Т. пл. 140 – 142 °С. Спектр ЯМР ¹H (CDCl₃), δ, м.д.: 1,45 (с, 36 H, CMe₃), 1,70 (м, 2H, CH₂c), 2,22 (с, 6H, CH₃a), 2,43 (т, 4H, CH₂b), 3,46 (с, 4H, CH₂Ar), 5,06 (с, 2H, OH), 7,14 (с, 4H, ArH). ИК-спектр, ν, см⁻¹: 3624 (OH), 1588 (C=C_{аром.}), 3062 (C_{Ar}-H).

4-[(3,5-Ди-*трет*-бутил-4-гидроксифенил)тио]бутил}{трифенил}-фосфоний бромид (III).

К раствору 0,2 г (0,01 ммоль) 4-бромбутилтрифенилфосфоний бромида и 0,15 г (0,015 ммоль) 3,5-ди-*трет*-бутил-4-гидроксифенилмеркаптана в 10 мл метанола в атмосфере аргона добавляют 0,1 мл триэтиламина. Реакционную смесь перемешивают при температуре 40 °С в течение 4 ч. Растворитель удаляют. Продукт промывают гексаном, ацетоном. Выход соединения III 0,21 г (79 %). Т. пл. 88 – 89 °С. Спектр ЯМР ¹H, (CDCl₃), δ, м.д.: 1,38 (с, 18H, CMe₃), 1,83 (м, 2H, CH₂CH₂P⁺), 2,03 (м, 2H, CH₂CH₂S), 2,94 (т, 2H, CH₂S), 3,86 (т, 2H, CH₂P⁺), 5,18 (с, 1H, OH), 7,09 (с, 2H, ArH), 7,63 – 7,93 (м, 15H, ArH). Спектр ЯМР ³¹P

Сравнение ДНК протекторной и антиоксидантной активности экранированных фенолов

Биосенсорный штамм	Концентрация, М	Протекторная активность, %				
		I	II	III	IV	Ионол
<i>E. coli</i> AB1157 (pRecA-lux)	10 ⁻⁴	36,6 ± 1,7
	10 ⁻⁵	52 ± 2,1	5,71 ± 0,3
	10 ⁻⁶	60,6 ± 2,8	24,39 ± 1,1
	10 ⁻⁷	52,6 ± 1,9	...	50,1 ± 2,3	33,1 ± 1,8	29,33 ± 1,3
	10 ⁻⁸	55,9 ± 2,2	1,1 ± 0,08	46,5 ± 2,1	54,7 ± 2,2	16,14 ± 0,9
	10 ⁻⁹	66,5 ± 3,1	40,4 ± 1,5	45,9 ± 2,0	41,1 ± 1,7	18,36 ± 1,2
	10 ⁻¹⁰	68,7 ± 3,5	13,6 ± 1,2	48,2 ± 2,2	48,7 ± 2,0	16,68 ± 1,3
	10 ⁻¹¹	65,2 ± 3,4	-14,8 ± 1,4	35,7 ± 1,7	45,4 ± 1,6	21,73 ± 0,9
	10 ⁻¹²	61,0 ± 3,0	-0,2 ± 0,01	42,8 ± 2,5	38,9 ± 1,5	11,81 ± 0,7
	<i>E. coli</i> MG165 (pKatG-lux)	10 ⁻³	42,8 ± 1,7
10 ⁻⁴		60,3 ± 1,9	19,75 ± 1,5
10 ⁻⁵		51,2 ± 2,3	27,36 ± 1,4
10 ⁻⁶		51,2 ± 2,2	21,13 ± 1,1
10 ⁻⁷		49,7 ± 1,9*	38,3 ± 1,4	24,7 ± 0,9	40,7 ± 1,1	46,27 ± 2,1
10 ⁻⁸		53,5 ± 2,7	24,9 ± 1,1	38,8 ± 2,0	46,1 ± 1,8	60,83 ± 2,6
10 ⁻⁹		60,9 ± 3,1	26,7 ± 1,3	51,2 ± 3,0	61 ± 3,2	11,7 ± 1,1
10 ⁻¹⁰		57,4 ± 2,6	32,3 ± 1,2	55,8 ± 2,6	37,6 ± 1,9	44,26 ± 1,8
10 ⁻¹¹		53,5 ± 2,8*	70,2 ± 3,9	40,7 ± 2,1	37,8 ± 1,8	50,38 ± 2,0
10 ⁻¹²		74,3 ± 4,1	32,1 ± 1,1*	35,3 ± 1,7*	32,9 ± 1,7*	34,41 ± 1,6

Отличия от ионола достоверны по t-критерию для p < 0,05, кроме значений, отмеченных знаком *.

(CHCl₃), δ, м.д.: 25,17 с. ИК-спектр, ν, см⁻¹: 3630 (ОН), 1603 (C=C_{аром.}).

3-[Бис(3,5-ди-*трет*-бутил-4-гидроксибензил)амино]-N,N,N-триметилпропан-1-аминиум иодид (IV). Раствор 0,2 г (0,1 моль) амина II и 1 мл (1 моль) йодистого метила в 5 мл метанола перемешивают при комнатной температуре в течение 2 ч. Растворитель удаляют. Продукт промывают эфиром. Выход соединения IV 0,17 г (70 %), кристаллический порошок бледно-желтого цвета. Т. пл. 161 – 163 °С. Спектр ЯМР ¹H (CDCl₃), δ, м.д.: 1,44 (с, 36 H, CMe₃), 1,89 (м, 2 H, CH_{2с}), 2,63 (т, 2H, CH_{2d}), 3,27 (т, 11 H, CH_{2b}, CH_{3a}), 3,53 (с, 4 H, CH₂Ar), 5,16 (с, 2 H, ОН), 7,09 (с, 4 H, ArH). ИК-спектр, ν, см⁻¹: 3637 (ОН), 2720 (N⁺), 1603 (C=C_{аром.}).

Экспериментальная биологическая часть

Регистрацию биологических эффектов исследуемых соединений проводили при помощи бактериальных люминесцирующих биосенсоров. В опытах использовали биосенсорные штаммы *E. coli* MG1655 (pXen7), *E. coli* MG1655 (pRecA-lux) и *E. coli* MG 1655 (pKatG-lux). *E. coli* MG1655 (pXen7) — конститутивный биосенсор, с помощью которого можно определить токсичность веществ. Биосенсор с промотором RecA фиксирует наличие в клетке факторов, вызывающих повреждение ДНК, а биосенсор с промотором KatG фиксирует образование в клетке гидроперекисей [7, 8].

Культуры клеток *E. coli* выращивали на полноценной среде Лурия-Бертани (LB) [9] с добавлением ампициллина (100 мкг/мл).

В качестве позитивного контроля для активации промотора KatG использовали пероксид водорода в концентрации 10⁻³ М, для активации промотора RecA использовали диоксидин ([2,3-бис-(гидроксиметил)хиноксалин-N,N'-диоксид]) в концентрации 2,25 · 10⁻⁵ М.

Культуры штаммов выращивали в течение 18 – 20 ч при температуре 37 °С. Затем часть суточной культуры разводили культуральной средой до заранее определенной плотности, обеспечивающей оптимальный люминесцентный ответ клеток биосенсора (KatG до 1,0; RecA — до 0,1 ед. Мак Фарланда) при помощи денситометра (DEN-1B, Biosan, Латвия) и помещали в термостат при температуре 37 °С на 2 ч.

Концентрацию 10⁻² М исследуемых веществ получали путем растворения в ДМСО, дальнейшее разведение для получения концентрации 10⁻³ М делали в смеси ДМСО и ацетона (1:1), дальнейшие разведения получали путем добавления деионизированной воды. В качестве контрольных растворов использовались аналогичные разведения смеси ДМСО — ацетон в деионизированной воде.

Для опытов по 45 мкл культуры переносили в ячейки 96-луночного микропланшета. Растворы экранированных фенолов добавляли до необходимой конечной концентрации за 30 мин до облучения.

В позитивный контроль добавляли 5 мкл пероксида водорода в концентрации 10⁻² М (для биосенсора *E.*

coli MG1655 (pKatG-lux) или диоксидин в концентрации 2,25 · 10⁻⁴ М (для биосенсора *E. coli* MG1655 (pRecA-lux)).

Измерение уровня биоломинесценции проводили в течение 2 ч с помощью микропланшетного термостабируемого люминометра LM-01T (Immunotech, Чехия, регистрируемый диапазон волн — 400 – 650 нм). Максимум излучения использованных бактериальных lux-биосенсоров — 490 нм. Исследуемые соединения при данной длине волны не поглощают.

Для оценки влияния изучаемых факторов на экспрессию оперонов вычисляли фактор индукции (*I*^S) по формуле (1):

$$I^S = \frac{L_e}{L_k} - 1, \quad (1)$$

где *L*_к — интенсивность люминесценции контрольной пробы; *L*_е — интенсивность люминесценции опытной пробы.

Признаком статистической значимости эффекта индукции считали статистически достоверное превышение *L*_е над *L*_к, оцениваемое по *t*-критерию [10].

Показатель протекторной активности (*A*, %) вычисляли по формуле:

$$A = \left(1 - \frac{I_a}{I_p} \right) \cdot 100\%,$$

где *I*_а — фактор индукции биоломинесцентного ответа исследуемым воздействием в присутствии протектора; *I*_р — фактор индукции исследуемым воздействием.

Все эксперименты проводили в 3 независимых повторностях. Средние величины и показатели варьирования (ошибки репрезентативности средних) протекторных эффектов рассчитывали по данным 3 независимых опытов.

В качестве источника ультрафиолетового излучения с длиной волны 311 нм использовали лампу модели PL-S 9W/01/2P (Phillips). Охлаждение лампы осуществляли с помощью микровентилятора. Планшет с обрабатываемыми культурами располагали таким образом, чтобы расстояние между поверхностью лампы и поверхностью слоя облучаемой культуры составляло 1 см. Интенсивность излучения на данном расстоянии составляла 12,2 мВт/см².

Толщина слоя обрабатываемой суспензии клеток биосенсора составляла 1,3 мм. Приведенные в работе значения доз облучения клеточной суспензии представляют собой дозы, получаемые поверхностью суспензии бактерий при облучении.

Статистическую обработку проводили по стандартным биометрическим формулам. Величины доверительных интервалов рассчитывали для *p* < 0,05 [10].

Результаты и их обсуждение

Для оценки влияния ультрафиолетового излучения средних длин волн (УФ В) на продукцию активных

форм кислорода и повреждения ДНК был проведен эксперимент по облучению клеток бактериальных биосенсоров *E. coli* MG1655 (pKatG-lux) и *E. coli* MG1655 (pRecA-lux) ультрафиолетовым излучением с длиной волны 311 нм. Такое облучение вызывает максимальную индукцию свечения штамма *E. coli* MG1655 (pKatG-lux) в дозе $3,7 \cdot 10^{-6}$ Дж/м² (коэффициент индукции составляет 5,15) (рис. 1). Таким образом, можно сделать вывод, что под действием УФ-излучения с длиной волны 311 нм в клетках происходит образование перекиси водорода и органических перекисей, которые, как известно, являются источником гидроксильных радикалов.

В клетках бактериального биосенсора *E. coli* MG1655 (pRecA-lux) излучение с длиной волны 311 нм вызывает максимальную Rec-индукцию в дозе $3,7 \cdot 10^{-4}$ Дж/м² (коэффициент индукции составляет 2,6) (рис. 2). Соответственно можно сделать вывод, что в результате окислительных процессов, запускаемых УФ В, происходит повреждение ДНК.

Для оценки антиоксидантной и ДНК-протекторной активности экранированных фенолов был проведен ряд опытов с соединениями I–IV. Исследованы концентрации данных веществ в диапазоне от 10^{-12} до 10^{-4} М. Вещество I в концентрации выше 10^{-4} М оказывало токсическое действие на конститутивный биосенсор *E. coli* MG1655 (pXen7) (данные не приводятся), поэтому эти концентрации не исследовались на антиоксидантную и ДНК-протекторную активность. Вещества II–IV токсичны в концентрациях 10^{-6} и выше. Данные по антиоксидантной и ДНК-протекторной активности исследованных соединений представлены в таблице.

Как можно видеть из данных, приведенных в таблице, наиболее эффективным, с точки зрения защиты ДНК, является соединение I, наименее активным — II. Это может быть связано с различной липофильностью данных соединений. Вещество II является единственным не ионным соединением среди исследованных, как следствие, может обладать повышенной липофильностью, и, вероятно, адсорбируется на плазматических мембранах, с чем и может быть связана его низкая активность. Вещество же I, напротив, является

гидрофильным и в клетке должно легко взаимодействовать с другими гидрофильными веществами (например, пероксидом водорода).

ДНК-протекторная активность соединений I, II, III и IV (таблица) выше ДНК-протекторной активности антиоксиданта ионола (2,6-*tert*-бутил-4-метилфенола).

Что касается антиоксидантной активности, I превосходит (в концентрациях 10^{-3} – 10^{-6} , 10^{-8} – 10^{-10} и 10^{-12} М), а II – IV приближаются к активности ионола. В целом, по величине ДНК-протекторной и антиоксидантной активности, лидирует соединение I.

Опираясь на полученные экспериментальные данные, можно сделать вывод о том, что исследованные нами экранированные фенолы обладают выраженными протекторными свойствами. Они с разной степенью эффективности снижают внутриклеточный уровень генерации гидроперекисей, защищают генетический материал бактерий при облучении УФ В, и могут быть перспективными компонентами препаратов, защищающих кожу от ультрафиолетового канцерогенеза и ультрафиолетового старения.

ЛИТЕРАТУРА

1. H. Soehnge, A. Ouhtit, H. N. Ananthaswamy, *Front. Biosci.*, **2**, 538 – 551 (1997).
2. B. K. Armstrong and A. Krickler, *J. Photochem. Photobiol. B*, **63**, 8 – 18 (2001).
3. I. Fridovich, *Ann. N. Y., Acad. Sci.*, **893**, 1 – 18 (1999).
4. Y. Jiang, C. Ke, A. Piotr, et al., *Biophys. J.*, **93**, 1758 – 1767 (2007).
5. E. A. Chugunova, M. A. Sazykina, E. M. Gibadullina, et al., *Let. Drug Design & Discov.*, **10**(2), 145 – 154 (2013).
6. P. Г. Тагашева, С. В. Бухаров, Р. Э. Тимашева и др., *Вестник КГТУ*, № 16, 48 – 51 (2011).
7. G. B. Zavilgelsky, V. Y. Kotova, I. V. Manukhov, *Mutat. Res.*, **634**, 172 – 176 (2007).
8. A. C. Vollmer, S. Belkin, D. R. Smulski, et al., *Appl. Environ. Microbiol.*, **63**, 2566 – 2571 (1997).
9. T. Maniatis, E. F. Fritsch, and J. Sambrook, *Molecular Cloning: a Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory, New York (1982).
10. Г. Ф. Лакин, *Биометрия*, Высшая школа, Москва (1990).

Поступила 15.07.13

SYNTHESIS OF MODIFIED STERICALLY HINDERED PHENOLS AND INVESTIGATION OF THEIR ABILITY TO PROTECT BACTERIAL DNA AGAINST UV-B DAMAGE

Yu. N. Oludina¹, M. A. Sazykina², E. V. Prazdnova², I. S. Sazykin², L. E. Khmelevtsova², S. V. Bukharov¹, T. A. Barsukova¹, R. G. Tagasheva¹, and G. N. Nugumanova¹

¹ Kazan National Research Technological University, Kazan, Tatarstan, 420015 Russia

² Research Institute of Biology, Southern Federal University, Rostov-on-Don, 344006 Russia

A series of new derivatives of sterically hindered phenols have been obtained and their DNA-protective activity under UV irradiation has been studied. According to experimental data, the investigated compounds protect the genetic material both from direct UV-B irradiation and from reactive oxygen species that appear under the action of UV-B radiation. New compounds are promising components for preparations which protect DNA from UV-radiation-induced damage.

Keywords: sterically hindered phenols; UV radiation; protector activity