

*В. С. Роговский¹, Т. М. Арзамасова¹, М. А. Розенфельд², М. Л. Константинова²,
В. Б. Леонова², С. Д. Разумовский², А. И. Матюшин¹, Н. Л. Шимановский¹,
А. М. Коротеев³, С. Е. Мосюров³, М. П. Коротеев³, Т. С. Кухарева³,
Э. Е. Нифантьев³*

ВЛИЯНИЕ КОМПЛЕКСА ВКЛЮЧЕНИЯ АМИНОМЕТИЛИРОВАННОГО ПРОИЗВОДНОГО ДИГИДРОКВЕРЦЕТИНА В ЦИКЛОДЕКСТРИН НА ОКИСЛЕНИЕ ФИБРИНОГЕНА ОЗОНОМ

¹ ГБОУ ВПО РНИМУ им. Н. И. Пирогова, Москва, Россия;

² Институт биохимической физики им. Н. М. Эмануэля РАН, Москва, Россия;

³ ГБОУ ВПО МПГУ, Москва, Россия

Оценивается влияние водорастворимого комплекса включения нового аминометилированного производного дигидрокверцетина в циклодекстрин (КН-14-ЦД) на окисление фибриногена. Соединение КН-14-ЦД предотвращает окислительную деструкцию фибриногена, вызванную озоновым окислением, сохраняя способность фибриногена формировать фибриновый сгусток после добавления тромбина. КН-14-ЦД более эффективно предохраняет фибриноген от окислительной деструкции, чем нативный дигидрокверцетин.

Ключевые слова: КН-14-ЦД; таксифолин; циклодекстрин; дигидрокверцетин; окислительное повреждение фибриногена; окисление озоном.

Дигидрокверцетин (ДГК, таксифолин) — природный флавоноид, обладающий выраженной антиоксидантной активностью, а также мембраностабилизирующим, противовоспалительным, нейропротекторным, антиатеросклеротическим и другими фармакологическими эффектами [1–3]. В последнее время синтезировано большое число производных дигидрокверцетина, а также новых лекарственных форм, содержащих дигидрокверцетин [4], фармакологическая активность которых интенсивно изучается. На кафедре органической химии МПГУ синтезировано новое производное дигидрокверцетина КН-14. Данное соединение обладает значительной антиоксидантной активностью, однако оно является гидрофобным, практически нерастворимым в воде, что в ряде случаев затрудняет его изучение, а также ограничивает его потенциальное клиническое применение, делая затруднительным внутривенное введение данного вещества. Для придания гидрофильных свойств данному соединению нами синтезирован комплекс включения КН-14 в циклодекстрин (КН-14-ЦД), обладающий высокой водорастворимостью.

В последнее время, помимо защитного действия антиоксидантов в отношении повреждения клеточных мембран, все большее внимание уделяется возможностям антиоксидантов, в том числе дигидрокверцетина, предотвращать окисление белков [5]. Многие аминокислотные остатки белков являются чувствительными к окислению различными формами активного кислорода (ROS). Свободнорадикальное окисление белков может сопровождаться расщеплением полипептидных цепей, модификацией аминокислотных остатков и превращением белков в соединения, высокочувствительные к протеолитической деградации. Белки, подвергнутые окислительной модификации, накапливаются в организме с возрастом, при окислительном

стрессе и целом ряде заболеваний, в частности, при сахарном диабете [6, 7]. Известно, что одним из важнейших белков плазмы крови является фибриноген, играющий основную роль в свертывающей системе крови. Отмечено, что при многих заболеваниях происходит усиленное окисление фибриногена, существенно уменьшающее его функциональную активность [8]. Показано, что фибриноген, по крайней мере в 20 раз более чувствителен к окислительной модификации по сравнению с другими основными плазменными белками: альбумином, иммуноглобулинами, трансферрином, церулоплазмином [9, 10]. Это позволяет фибриногену легко вступать в реакцию свободно-радикального окисления, что вызывает образование окисленных форм белка, отличающихся от нативной как по химическому составу, так и по структурной организации. Вследствие этого меняются функциональные свойства фибриногена — за счет формирования нековалентных связей он приобретает способность к образованию макромолекулярных кластеров [10]. Окисленный фибриноген теряет катализируемую тромбином способность формировать фибриновый сгусток [11], угнетает адгезию и агрегацию тромбоцитов [12], усиливает активность тканевого активатора плазминогена, негативно влияет на гемореологические параметры [13], активно вовлекается в процесс воспаления сосудистой стенки и способен в большей степени, по сравнению с нативным фибриногеном, индуцировать в первичной культуре эндотелия кровеносных сосудов человека продукцию интерлейкина-8, вызывающего хемотаксис клеток иммунной системы [14, 15]. Окисление фибриногена вызывает дисбаланс в свертывающей системе крови, с одной стороны, увеличивая время фибринообразования и угнетая адгезию и агрегацию тромбоцитов, а, с другой стороны, потенцируя формирование устойчивых агрегатов из

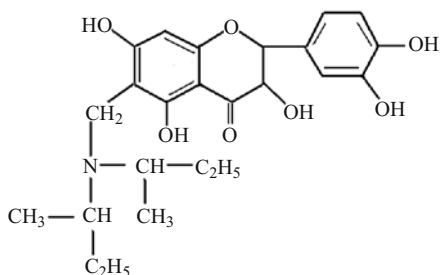


Рис. 1. Структурная формула 6-[(ди-*sec*-бутиламино)метил]-2-(3,4-дигидроксифенил)-3,7-дигидрокси-2,3-дигидро-4*H*-хромон-4-она (КН-14)

активированных тромбоцитов с нейтрофилами [16, 17]. Поэтому одной из актуальных задач современной фармакологии является поиск соединений, способных ингибировать окисление фибриногена. Согласно исследованиям, проведенным нами ранее, дигидрокверцетин обладает способностью ингибировать окисление фибриногена [5]. В связи со сказанным представляет интерес изучение способности новых перспективных производных дигидрокверцетина подавлять окислительную деструкцию белков плазмы крови. С целью реализации данной задачи в работе изучено влияние комплекса включения нового производного дигидрокверцетина КН-14 в циклодекстрин на окисление фибриногена озоном.

Экспериментальная химическая часть

Спектры ЯМР регистрировали на спектрометре “JNM-ECX 400” (100,5 МГц) (Япония), химические сдвиги приведены относительно ТМС (внутренний стандарт). Для элементного анализа использовали анализатор “Perkin-Elmer 2400” (США).

Соединение КН-14. Смесь 0,3 г (0,01 моль) формальдегида (в виде параформа), 1,29 г рацемического диизобутиламина (0,01 моль) и 50 мл 96 % этилового спирта перемешивают при 60 °С до полной гомогенизации (приблизительно 1,5 ч). Затем к полученному охлажденному до 20 °С раствору медленно прибавляют раствор, содержащий 3,5 г (0,01 моль) ДГК в 10 мл

Оптическая плотность в максимумах поглощения изучаемых соединений

Соединение	Оптическая плотность (D), отн. ед.	Длина волны, нм	Оптическая плотность, %
Фибриноген + ЦД до озонирования	0,66 ± 0,04	278,27 ± 4,24	100
Фибриноген+ЦД после озонирования	0,46 ± 0,02*	271,27 ± 3,43	70*
Фибриноген+КН-14-ЦД до озонирования	0,66 ± 0,05	278,27 ± 5,33	100
Фибриноген+КН-14-ЦД после озонирования	0,63 ± 0,07*#	277,37 ± 4,97	95*

Данные представлены в виде средних значений оптической плотности и стандартных ошибок среднего ($M \pm s.e.m.$). * — достоверные отличия от контроля ($p < 0,05$); # — достоверные отличия между эффектами ЦД и КН-14-ЦД ($p < 0,05$).

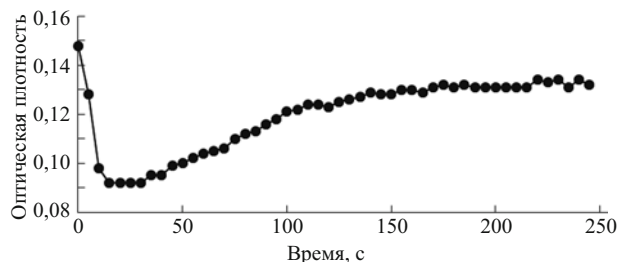


Рис. 2. Кинетика поглощения озона соединением КН-14-ЦД.

этилового спирта. По окончании прибавления реакционную массу перемешивают при 40 °С в течение 1,5 ч. Выпавший осадок отфильтровывают в вакууме, последовательно промывают этанолом, диэтиловым эфиром, гексаном и сушат в вакууме. Выход 2,49 г (56 %). Т. пл. 205 – 206 °С с разложением. $C_{24}H_{31}NO_7$. Спектр ЯМР ^{13}C (ДМСО- d_6), δ , м.д.: 83,89 (C²), 72,22 (C³), 196,98 (C⁴), 163,86 (C⁵), 101,13 (C⁶), 165,36 (C⁷), 94,87 (C⁸), 162,28 (C⁹), 101,55 (C¹⁰), 129,21 (C¹¹), 120,07 (C^{2'}), 147,12 (C^{3'}), 145,84 (C^{4'}), 119,89 (C^{6'}), 43,29 (C^{11'}), 54,23 (C^{13-13''}), 28,42 (C^{14-14''}), 9,18 (C^{15-15''}), 19,76 (C^{16-16''}).

Для образования гидрофильной формы КН-14 нами произведено инкапсулирование КН-14 в оболочку из циклического олигомера глюкозы — β -циклодекстрина (“Sigma”, США) согласно описанной методике [18]. В итоге получен водорастворимый комплекс включения КН-14 в циклодекстрин, который и использовался для дальнейшего изучения (КН-14-ЦД).

Экспериментальная биологическая часть

В работе проводилось окисление раствора фибриногена в стандартных условиях [14], а также в присутствии КН-14-ЦД. Для проведения данного исследования требуется растворить изучаемое соединение в водном растворе, так как в случае применения других растворителей наблюдается деструкция фибриногена.

В исследовании использовали бычий фибриноген, полученный из цитратной плазмы крови и дополнительно очищенный от примесей пламиногена и фибринстабилизирующего фактора, как было описано ранее [9]. Полученный фибриноген переводили методом гель-фильтрации с использованием сефадекса G-25 в 0,06 М фосфатный буфер (рН 7,4), содержащий 0,15 М NaCl.

Для оценки влияния КН-14-ЦД на окисление фибриногена проводили сравнение УФ-спектров исследуемых растворов до и после окисления. Сохранение функциональной активности фибриногена оценивали по его способности образовывать фибриновый сгусток после добавления тромбина [9].

При исследовании влияния КН-14-ЦД на окисление фибриногена в качестве окислителя использовался озон. Этот природный реагент, относящийся к представителям активных форм кислорода, является чрезвычайно удобным для проведения исследований в модельных системах. Время его полужизни в водных растворах при наличии субстрата окисления не превы-

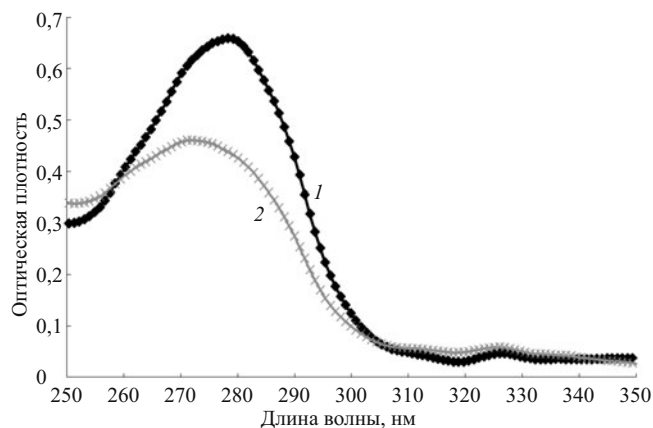


Рис. 3. УФ-спектры смеси фибриногена (1,87 мг/мл) и циклодекстрина до (1) и после (2) окисления озоном.

шает 1 – 2 мин. Степень окисления объекта строго регулируется, поскольку количество озона, реагирующего с восстановителем, точно оценивается спектрофотометрически при длине волны 254 нм. Озонирование растворов фибриногена проводили в реакторе объемом $3,3 \cdot 10^{-3}$ л, снабженном кварцевыми окнами, продувая озono-кислородную смесь через свободный объем реактора. Количество озона в реакторе составляло $2 \cdot 10^{-7}$ М. Озон синтезировали в разрядном устройстве при пропускании струи кислорода между электродами [14]. Спектры в ультрафиолетовой области белков до и после озонирования регистрировали на спектрофотометре “СФ-2000” (Россия).

Изучение кинетики поглощения соединением КН-14-ЦД озона проводили барботажным методом, при котором через объем раствора, содержащего исследуемое соединение, пропускали поток озонированного кислорода, фиксируя изменение концентрации озона до и после прохождения через раствор. Оценка функциональной активности фибриногена, как до, так и после окисления озоном, проводилась с помощью определения времени образования фибринового сгустка после добавления тромбина (“Roche”, Франция) в раствор фибриногена. Раствор тромбина объемом 0,05 мл (2,5 ед. НИН) добавляли к 0,3 мл исследуемой пробы. Константу скорости взаимодействия озона с КН-14 определяли по формуле:

$$k = W([O_3]_0 - [O_3]_{\text{газ}}) / \alpha [O_3]_{\text{газ}} [\text{реагент}], \quad (1)$$

где W — скорость подачи газовой смеси (50 – 200 л/мин); α — растворимость озона в воде, составляет 0,32; $[O_3]_0$ — начальная концентрация озона; $[O_3]_{\text{газ}}$ — концентрация озона на выходе из реактора; $[\text{реагент}]$ — исходная концентрация реагентов.

Статистический анализ полученных данных проводили с помощью программы Statistica 6. Для оценки значимости выявленных различий использовался критерий Манна-Уитни.

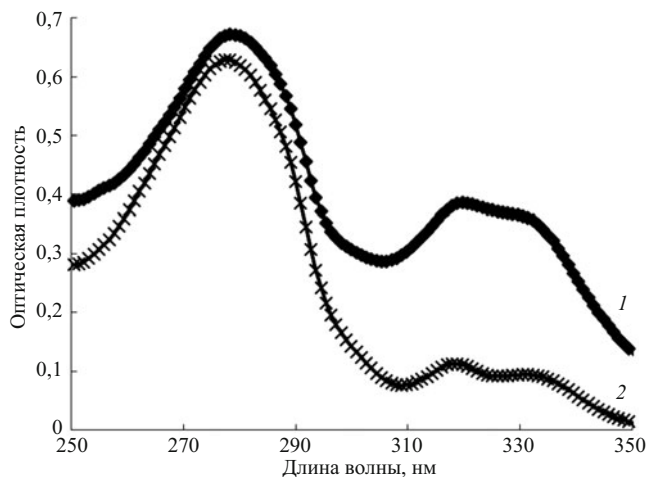


Рис. 4. УФ-спектры фибриногена (1,87 мг/мл) в присутствии комплекса включения КН-14 в циклодекстрин (10^{-5} М) до (1) и после (2) окисления озоном.

Результаты и их обсуждение

Для изучения влияния КН-14-ЦД на окисление озоном фибриногена предварительно в качестве контроля нами исследовано окисление озоном КН-14-ЦД с помощью барботажного метода. Концентрация КН-14-ЦД составляла $6,25 \cdot 10^{-7}$ М. Кинетика поглощения озона соединением КН-14-ЦД представлена на рис. 2.

По данным, представленным на рис. 2, с использованием формулы 1 [6, 11], нами рассчитаны константа скорости взаимодействия озона с соединением КН-14-ЦД и стехиометрический коэффициент реакции, который определяется отношением количества поглощенного озона к количеству прореагировавшего вещества. Стехиометрический коэффициент реакции взаимодействия озона с КН-14-ЦД составляет 3. Таким образом, к 1 моль КН-14-ЦД присоединяется 3 моль озона, что может свидетельствовать о наличии 3 активных центров на молекуле КН-14-ЦД, способных присоединять молекулы озона. Константа скорости взаимодействия озона с КН-14-ЦД составляет $5 \cdot 10^3$.

В качестве второго контроля исследовано взаимодействие смеси нативного фибриногена и циклодекстрина с озоном. С этой целью проведена реакция окисления смеси фибриногена и циклодекстрина в закрытом реакторе на протяжении 10 мин. Интенсивность и характер процесса окисления определялись по УФ-спектрам, полученным для неокисленной и окисленной смеси. На рис. 3 представлены спектры данной смеси до и после окисления. Реакцию окисления фибриногена озоном оценивали по изменению оптической плотности при длине волны 280 нм, характерной для аминокислотных остатков, содержащих фенольные группы, такие как тирозин, фенилаланин, а также остатков, имеющих ненасыщенные циклы триптофана и гистидина.

На представленном графике видно, что по мере окисления озоном фибриногена происходит уменьшение амплитуды максимума поглощения фибриногена, а также смещение этого максимума в коротковолновую область.

Далее было проведено окисление озоном фибриногена в присутствии КН-14-ЦД. Полученные результаты представлены на рис. 4.

Сопоставляя спектры, представленные на рис. 3 и 4, видно, что в случае окисления фибриногена в присутствии КН-14-ЦД оптическая плотность в максимуме поглощения фибриногена уменьшается на 5 %, тогда как в отсутствие КН-14-ЦД происходит более значимое уменьшение оптической плотности фибриногена – на 30 %. Таким образом, можно прийти к выводу, что КН-14-ЦД в данном случае оказывает защитное влияние в отношении окисления озоном фибриногена. Для удобства сравнения нами составлена таблица, включающая данные оптической плотности в максимумах поглощения нативного фибриногена, окисленного фибриногена, а также смеси фибриногена с КН-14-ЦД и окисленной смеси фибриногена с КН-14-ЦД.

Для определения функциональной активности фибриногена после его окисления озоном в чистом виде и в присутствии КН-14-ЦД была использована способность фибриногена формировать фибриновый сгусток после добавления тромбина. Время образования фибринового сгустка фибриногена неокисленного — 60 ± 1 с, фибриногена, окисленного в присутствии КН-14-ЦД (10^{-5} м), — 112 ± 9 с.

Фибриноген, окисленный в отсутствие КН-14-ЦД, полностью утратил свою функциональную активность, тогда как фибриноген, окисленный в присутствии КН-14-ЦД, в значительной степени сохранил свои свойства.

Таким образом, в присутствии комплекса включения нового производного дигидрокверцетина КН-14 в циклодекстрин фибриноген окисляется озоном незначительно (оптическая плотность фибриногена в его максимуме поглощения уменьшилась на 5% после озонирования в присутствии КН-14-ЦД, тогда как в отсутствие КН-14-ЦД оптическая плотность фибриногена в его максимуме поглощения уменьшилась на

30 %). Также в присутствии КН-14-ЦД фибриноген сохраняет свои функциональные свойства после окисления озоном, тогда как при окислении фибриногена, не защищенного КН-14-ЦД, функциональная активность фибриногена полностью утрачивается. Следует отметить, что, согласно ранее проведенным исследованиям, КН-14-ЦД обладает более выраженной протективной активностью в отношении окисления фибриногена, чем нативный дигидрокверцетин [5].

ЛИТЕРАТУРА

1. М. В. Карлина, О. Н. Пожарицкая, А. Н. Шиков, *Хим.-фарм. журн.*, **43**(6), 46 – 48 (2009).
2. В. С. Роговский, Н. Л. Шимановский, А. И. Матюшин, *Эксперим. и клин. фармакол.*, **75**(9), 37 – 41 (2012).
3. Е. Б. Меньщикова, В. З. Ланкин, Н. К. Зенков и др., *Окислительный стресс. Проксиданты и антиоксиданты*, Фирма “Слово”, Москва (2006).
4. В. А. Куркин, В. М. Рыжов, О. В. Бирюкова и др., *Хим.-фарм. журн.*, **43**(2), 33 – 42 (2009).
5. V. S. Rogovsky, M. A. Rosenfeld, V. B. Leonova, et al., *J. Information, Intelligence and Knowledge*, No. 4, 53 – 60 (2012).
6. И. П. Иванова, Д. И. Князев, Ю. В. Кудрявцев, *Совр. техн. в медицине*, № 3, 16 – 20 (2011).
7. K. V. Pandey, N. Mishra, S. I. Rizvi, *Clin. Biochem.*, No. 43, 508 – 511 (2010).
8. C. Banfi, M. Brioschi, S. Barcella, et al., *Eur. J. Heart Failure*, **10**, 244 – 251 (2008).
9. М. А. Розенфельд, В. Б. Леонова, М. Л. Константинова, С. Д. Разумовский, *Известия РАН, Сер. биол.*, № 6, 671 – 679 (2008).
10. L. C. Dijkgraaf, G. Zaardeneta, F. W. Corddewener, et al., *J. Oral. Maxillofac Surg.*, No. 61, 101 – 111 (2003).
11. E. Shacter, J. A. Williams, R. F. Levine, *Fee Radic. Biol. Med.*, No. 18, 815 – 831 (1995).
12. М. А. Belisario, D. Domenico, C. Pelagalli, et al., *Biochimie*, No. 79, 449 – 455 (1997).
13. Е. В. Ройтман, О. А. Азизова, Ю. А. Морозов, А. В. Асейчев, *Бюл. экспер. биол. и мед.*, № 138, 527 – 530 (2004).
14. М. А. Розенфельд, В. Б. Леонова, А. Н. Щеголихин и др., *Биохимия*, **75**(10), 1451 – 1461 (2010).
15. О. А. Азизова, Е. В. Максынина, Ю. А. Романов, и др., *Бюл. экспер. биол. мед.*, № 137, 406 – 409 (2004).
16. В. И. Лушак, *Биохимия*, № 72, 995 – 1017 (2007).
17. О. А. Азизова, А. В. Асейчев, А. П. Пирязев, Л. В. Шуленина, *Бюл. экспер. биол. и мед.*, № 3, 284 – 290 (2009).
18. Патент России 2396077 (2009); *РЖ Химия*, А61P9 / 14 (2009).

Поступила 28.11.12

EFFECT OF INCLUSION COMPLEX OF A NEW AMINOMETHYLATED DIHYDROQUERCETIN DERIVATIVE (KN-14) WITH CYCLODEXTRIN ON OZONE-INDUCED OXIDATION OF FIBRINOGEN

V. S. Rogovsky¹, T. M. Arzamasova¹, M. A. Rosenfeld², M. L. Konstantinova², V. B. Leonova², S. D. Razumovskii², A. I. Matyushin¹, N. L. Shimanovskii¹, A. M. Koroteev³, S. E. Mosyurov³, M. P. Koroteev³, T. S. Kukhareva³, and É. E. Nifant'ev³

¹ Department of Molecular Pharmacology and Radiobiology, Medico-Biological Faculty, Pirogov State Research Medical University, Moscow, Russia;

² Emanuel Institute of Biochemical Physics, Russian Academy of Sciences, Moscow, Russia;

³ Department of Organic Chemistry, Moscow State Pedagogical University, Moscow, Russia

The ability of water-soluble inclusion complex KN-14-CD of a new aminomethylated dihydroquercetin derivative (KN-14) with β -cyclodextrin (CD) to inhibit the oxidation of fibrinogen by ozone has been evaluated. KN-14-CD inhibits ozone-induced oxidation of fibrinogen, prevents the oxidative modification of fibrinogen and preserves its functional activity. The ability of KN-14-CD complex to prevent the oxidative modification of fibrinogen is more pronounced than that of native dihydroquercetin (taxifolin).

Keywords: KN-14, taxifolin, cyclodextrin, dihydroquercetin, oxidative damage of fibrinogen, ozone-induced oxidation