

Радикал-улавяща активност на новосинтезирани 4-метокси производни хидразони. Протективен ефект в липид съдържащи моделни системи *in vitro*.

Н. Христова-Авакумова, В. Хаджимитова

Катедра медицинска физика и биофизика, Медицински факултет,
Медицински университет -- София

Abstract. The present investigation includes the determination of the antioxidant activity three structurally characterized salicylaldehydebenzoylhydrazone (SBH) derivatives. For the determination of their antioxidant potential we have used spectrophotometric methods i.e. tests for estimation of their radical scavenging activity against stable free radicals (ABTS and DPPH) and assays allowing the evaluation of their protection effect in model systems of Fe(II) – induced oxidative damage of biologically relevant molecules.

The studied compounds exhibited excellent scavenging activity against $ABTS^{+\bullet}$ (higher compared to the one of the reference Trolox), whereas in the DPPH model system their effectiveness was negligibly lower. The comparison of the results from the quantitative determination of the TBARS (thiobarbituric acid reactive substances) disclosed better efficiency of the hydrazones in the egg yolk lipoproteins containing model system. The chemical composition of this *in vitro* system is more plausible to the living systems compared to the lecithin containing one.

1 Увод

Множество проведени през годините изследвания доказват недвусмислено ролята на оксидативното клетъчно увреждане при редица социално значими заболявания като исхемична болест на сърцето, рак, органно специфични аутоимунни заболявания, диабет и др. В дългосрочен аспект непрекъснатата продукция на АФК при тези патологични състояния е съпроводена с невъзможността да се поддържа важният за жизнената дейност на клетката окислително-редукционен баланс [1]. Пълноценната защита на организма от патологични отклонения на този параметър, постигната чрез поддържането на равновесието АФК-антиоксиданти и прооксиданти-антиоксиданти, се нарушава [2]. Специфичните особености на хра-

нителния режим при пациенти с изброените заболявания и ограничението да бъдат подлагани на терапия с някои есенциални антиоксиданти налагат разработването на фармакологично-активни агенти, притежаващи многостранно проявяващи се антиоксидантни свойства.

Настоящото проучване цели да изследва радикал-улавящата активност и протективен ефект спрямо биологично релевантни молекули на три новосинтезирани структурни аналога на активният хератор салицилалдехидбензоилхидразон (SBH). Изследваните съединения са 4-метоксисалицилалдехидбензоилхидразон (4mSBH), 4-метоксисалицилалдехид-4-хидрокси бензоилхидразон (4mShBH) и 4-метоксисалицилалдехидизоникотиноилхидразон (4mSIH), синтезирани и структурно охарактеризирани във Фармацевтичния факултет на МУ-София [3]. Научният ни интерес към този клас съединения е породен от намерените в литературата данни за сходни по структура съединения, доказващи лесна и евтина технология на синтез, склонност към образуване на кристални форми, висока хидролитична стабилност и изключителна широкоспектърност по отношение на проявената биологична активност [4, 5].

2 Материали и методи

Абсорбционен спектрален анализ -- с цел да се избегне спектралното пречене преди подбирането на методиките за оценка на антиоксидантна активност (АОА) беше проведено спектрофотометрично изследване на разтвори на SBH структурните производни в 50 mM K_2HPO_4/KH_2PO_4 .

Радикал-улавяща активност -- подбрани бяха съвременни, широко използвани методи за оценка на тоталната антиоксидантна активност.

ABTS метод -- изследванията бяха проведени съгласно Re et al., [6]. ABTS^{+•} беше генериран чрез добавяне на еквивалентен обем калиев персулфат към ABTS. Към 2 ml от преинкубирания радикал бяха добавени различни концентрации от изследваните структурни аналози. Пробите бяха инкубирани в продължение на 60 min при стационарна температура, след което екстинкцията им беше измерена при 734 nm. За изчисляване на АОА бе използвана формулата:

$$AOA\% = \frac{A_{control} - A_{sample}}{A_{control}} * 100\%, \quad (1)$$

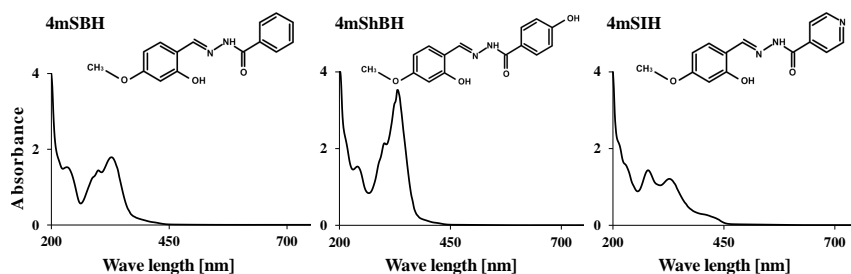
където $A_{control}$ е стойността на екстинкцията измерена за контролата, а A_{sample} -- стойността на екстинкцията за съдържащата хидразони проба.

DPPH метод -- методът беше проведен съгласно Group et al. [7]. Беше приготвен изходен разтвор на DPPH• с екстинкция 1. Към 2 ml от радикала бяха добавени изследваните хидразони в указанияте на фигурите концентрации. Пробите бяха инкубирани в продължение на 60 min при стайна температура, след което екстинкцията им беше измерена при 517 nm. Получените резултати са представени като процент от контролата.

Протективен ефект в липид-съдържащи моделни системи – количественото определяне на взаимодействията с тиобарбитурова киселина (ТБК) продукти в системите беше осъществено колориметрично [8]. Резултатите за степента на оксидативно молекулно увреждане са представени като процент от нетретирания контрола. Определянето на нивото на Fe²⁺-индуцирана липидна пероксидация (ЛП) е осъществено със система, съдържаща жълтъчен хомогенат (разреден v/v 1:100), и такава, съдържаща яйчен лецитин в концентрация 1 mg/ml. Иницирането на ЛП беше извършено чрез добавяне на 0.1 mmol/L FeCl₂. Пробите бяха инкубирани в продължение на 30 min при температура 37°C. След инкубацията към всяка проба бяха добавени 2.8% разтвор на трихлороцетна киселина и 1% разтвор на тиобарбитурова киселина. След повторна инкубация при 100°C в продължение на 20 min екстинкциите на пробите бяха измерени при 532 nm.

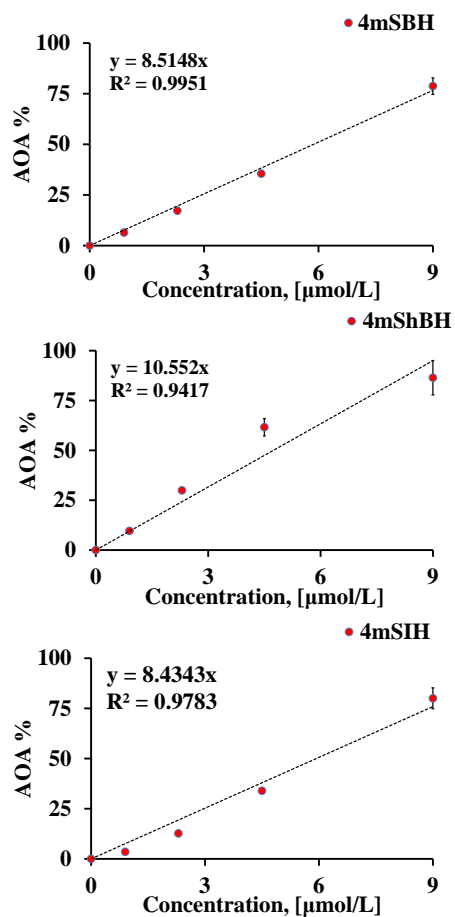
3 Резултати

В получените данни при провеждането на абсорбционния спектрален анализ се наблюдават характерните честоти в ултравиолетовата област на спектъра, обусловени от наличието на два ароматни пръстена в структурата на молекулите им (фиг. 1). При нито един от изследваните разтвори не беше установено поглъщане при 517 nm и при 734 nm, където се определят свободните радикали DPPH и ABTS.



Фиг. 1: Абсорбционен спектър на изследваните 4-метокси производни на SBH, получен при концентрация 0.1 mmol/L в 50 mM K₂HPO₄/KH₂PO₄ буфер, pH 7.4.

Н. Христова-Авакумова, В. Хаджимитова



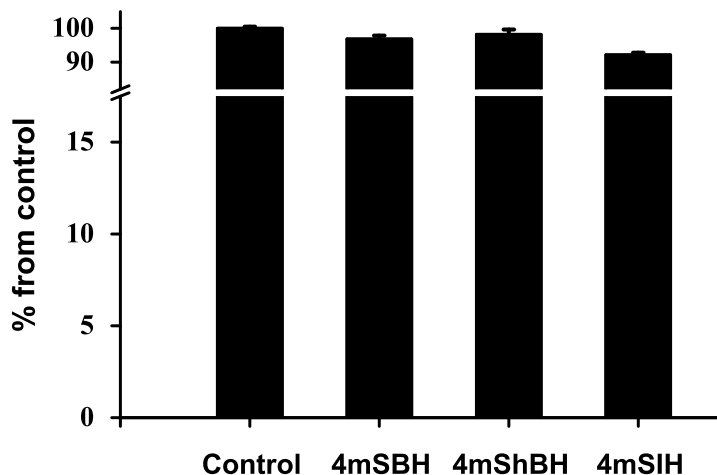
Фиг. 2: Антиоксидантна активност на изследваните съединения, спрямо $\text{ABTS}^{\bullet+}$.

Характерни за избраните методи за оценка на тоталната антиоксидантна активност са висока чувствителност и възпроизводимост на получените резултати. И двете моделни системи предполагат взаимодействие на потенциалните антиоксиданти със съответните радикали, което се изразява в промяна на екстинкцията на разтвора (обезцветяване), пропорционално на количеството редуциран радикал. Прилагането на комбинацията от двата метода ще позволи по-пълно охарактеризиране на антиоксидантните свойства на изследваните хидразони, поради различния механизъм на елиминиране на $\text{ABTS}^{\bullet+}$ и DPPH^{\bullet} .

На Фиг. 2 са представени резултатите от изследването на редукционната способност на 4-метокси производните спрямо $ABTS^{+\bullet}$ в концентрационен интервал, обхващащ ниските концентрации от 0 до $9 \mu\text{mol/L}$. Резултатите показват силно изразен антиоксидантен ефект и линейно нарастване на AOA с повишаване на съдържанието на изследваните хидразони, като корелационните коефициенти са над 0.94.

В изследваният концентрационен интервал 4mShBH проявява най-силно изразени редукционни свойства спрямо $ABTS^{+\bullet}$. На базата на аналитичния вид на уравнението, описващо експерименталните данни, бяха изчислени стойностите на $C-50$ (концентрацията, при която се наблюдава 50% AOA) -- $C-50_{4mSBH} = 5.87 \mu\text{mol/L}$, $C-50_{4mShBH} = 4.74 \mu\text{mol/L}$, $C-50_{4mSIH} = 5.93 \mu\text{mol/L}$. При същите условия стойността на $C-50$ за референта Trolox е $8.53 \mu\text{mol/L}$ [9].

В моделната система, съдържаща DPPH радикал, изследваните съединения проявяват липса на активност или многократно по-ниска ефективност в сравнение с Trolox (фиг. 3). От трите съединения най-силни водород-донорни свойства се наблюдават при пиридин съдържащият 4mSIH (92.16%). Получената стойност остава пренебрежимо ниска в сравнение с тази на Trolox, за който при два пъти по-ниска концентрация стойността на отчитания показател достига 7.43%.

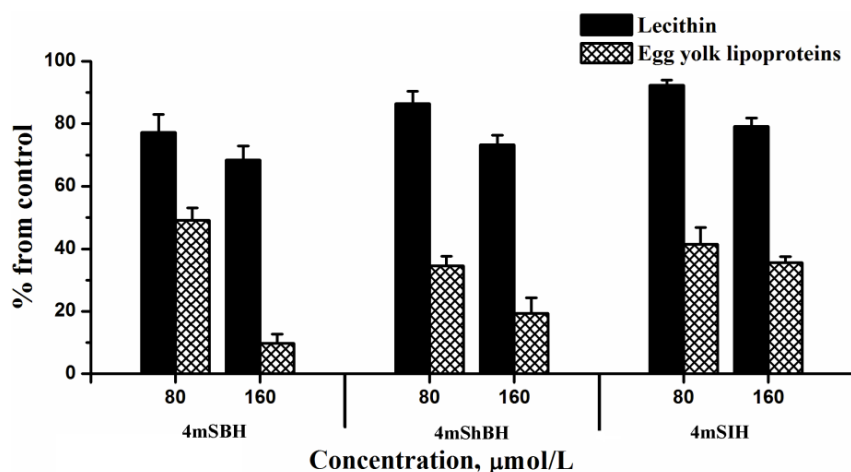


Фиг. 3: Антиоксидантна активност на изследваните съединения и референта Trolox, спрямо $DPPH^{\bullet}$. Концентрацията на изследваните хидразони е $90 \mu\text{mol/L}$, на Trolox $46 \mu\text{mol/L}$.

Предполагаме, че отчетената ниска ефективност се дължи на липсата на възможност за отдаване на водороден атом и образуване на характерният за съединения със сходна структура на изследваните азот-центриран хидразонов радикал, който в следствие претърпява стабилизиране, чрез трансформация в делокализиран въглерод-центриран радикал [10].

Получените резултати от изследването на протективния ефект на хидразоните в условия на Fe-индуцирана липидна пероксидация, осъществена в двете моделни системи, показаха различна степен на ефективност на хидразоните. В моделната система, съдържаща лецитин, стойностите на ефекта на увреждане, представен като процент от контролата, варира и при по-високата тествана концентрация при всички вещества надвишава 68%. В системата, съдържаща жълтъчни липопротеини, неговата стойност за същата концентрация варира от 9,39 до 35,58%. И в двете моделни системи при концентрация 160 $\mu\text{mol/L}$ ефективността на съединенията нараства в ред 4mSIH < 4mShBH < 4mSBH.

Получените нови данни показват, че новосинтезираните 4-метокси производни са способни да повлияват свободно радикални процеси, имащи отношение към механизмите на развитие на оксидативен стрес в организма. Сравнителният анализ на получените данни показва по-висок протективен ефект на всички изследвани вещества в системата, съдържаща жълтъчни липопротеини, която по химичен състав наподобява по-голяма степен живите системи сравнение със системата, съдържа чист лецитин.



Фиг. 4: Протективен ефект на изследваните 4-метокси SBH структурни аналози в липид съдържащи моделни системи.

Благодарности

Разработката е финансирана от Съвета за медицинска наука на МУ–София. (ДОГОВОР № 6 -Д/2015 г., ПРОЕКТ вх. № 245/14.01.2015 г.)

Литература

- [1] M. Valko *et al.* (2007) *Int. J. Biochem. Cell Biol.* **39** 44.
- [2] B. Halliwell, C. Gutteridge (1990) *Meth. Enzymol.* 1.
- [3] B. Nikolova-Mladenova *et al.* (2011) *Arzneimittelforschung/Drug research* **61** 714.
- [4] P. Kumar, B. Narasimhan (2013) *Mini Rev. Med Chem.* 971.
- [5] J. Kalia, R. Raines (2008) *Angrew Chem. Int. edEngl.* 7523.
- [6] R. Re *et al.* (1999) *Free Rad. Biol, Med.* 1231.
- [7] P. Goupy *et al.* (2003) *J. Agric. Food Chem.* 615.
- [8] P. Bird, H. Draper (1984) *Meth. Enzymol.* 299.
- [9] N. G. Hristova-Avakumova *et al.* (2015) *Bul. Chem. Com.* **47** 1053.
- [10] N. Belkheiri *et al.* (2010) *Eur J Med Chem.* **45** 3019.