

ИЗУЧЕНИЕ АНТИОКСИДАНТНОЙ И МЕМБРАНОТРОПНОЙ АКТИВНОСТИ ХИНОЗАЛИНОВОГО АЛКАЛОИДА ТРИПТАНТРИНА С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ РАЗЛИЧНЫХ МОДЕЛЬНЫХ СИСТЕМ

© 2015 г. А.М. Попов* **, А.Н. Осипов***, Е.А. Корепанова***, О.Н. Кривошапко*, Ю.П. Штода*, А.А. Климович*

*Тихоокеанский институт биоорганической химии им. Г.Б. Елякова ДВО РАН, 690022, Владивосток, просп. 100-летия Владивостока, 159;

E-mail: popovam@piboc.dvo.ru

**Дальневосточный федеральный университет, 690000, Владивосток, ул. Октябрьская, 27;

***Российский национальный исследовательский медицинский университет им. Н.И. Пирогова Минздрава России, 117997, Москва, ул. Островитянова, 1;

E-mail: osipov@fbm.msu.ru

Поступила в редакцию 03.12.14 г.

После доработки 19.01.15 г.

Проведено сравнительное исследование антиоксидантных (радикалперехватывающих) свойств триптантрина (хиназолинового алкалоида, обладающего высокой противовоспалительной активностью и найденного во многих видах различных семейств высших растений и микроорганизмов, включая микробиом человека) в системах 2,2'-азобис(2-метилпропионамидин)дигидрохлорид–люминол и гемоглобин–пероксид водорода–люминол и оценено его влияние на проницаемость плоских бислойных липидных мембран. В качестве эталонного антиоксиданта был использован тролокс, а в качестве стандартов – аскорбиновая кислота и дигидрокверцетин. Показано, что триптантрин проявляет очень слабую антиоксидантную активность, заметно уступая эталонному и стандартным антиоксидантам в тестах по антиоксидантной активности в обеих исследованных системах. По эффективности антиоксидантного действия исследуемые вещества могут быть выстроены в следующий ряд: дигидрокверцетин > тролокс > аскорбиновая кислота > триптантрин. Антиоксидантный потенциал триптантрина приблизительно в 1000 и 3000 раз меньше, чем у тролокса и у биофлавоноида дигидрокверцетина соответственно. Триптантрин не вызывает достоверного изменения проницаемости плоских бислойных мембран в диапазоне доз от 0,5 до 10 мкг/мл. Полученные данные свидетельствуют об отсутствии у триптантрина значимой радикалперехватывающей и мембранотропной активности. Можно предположить, что отмеченная для триптантрина высокая противовоспалительная активность не связана с нейтрализующим действием в отношении активных форм кислорода и влиянием на проницаемость клеточных мембран. Предполагаемые механизмы биологической активности триптантрина обсуждаются.

Ключевые слова: алкалоиды, триптантрин, антиоксиданты, активные формы кислорода, противовоспалительная активность.

Триптантрин – алкалоид хиназолинового ряда (рис. 1а), выделенный из ряда растений, различных микроорганизмов и кожных дрожжеподобных грибов человека, обладает широким спектром медико-биологической активности [1–4]. В настоящее время отлажены схемы органического синтеза этого соединения [5]. На разных экспериментальных моделях триптан-

трин эффективно ингибирует воспалительные процессы, связанные с развитием аллергических реакций замедленного типа, являясь сильным, но непрямым природным ингибитором клеточного биосинтеза лейкотриенов – провоспалительных медиаторов, которые продуцируются под действием циклооксигеназы-2 и арахидонат-5-липоксигеназы. Как мощный противовоспалительный агент, триптантрин значительно ингибирует продукцию макрофагами как NO, так и простагландина E(2) [6,7]. Однако наиболее эффективно триптантрин подавляет функ-

Сокращений: АБАП – 2,2'-азобис(2-метилпропионамидин)дигидрохлорид, Hb – гемоглобин, LM – люминол, АОА – антиоксидантная активность.

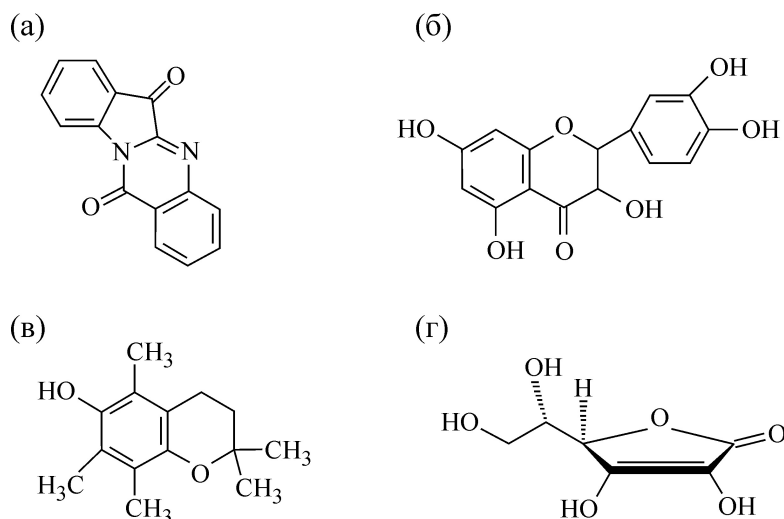


Рис. 1. Химические структуры исследуемых веществ: (а) – триптантрин, (б) – дигидрокверцетин (в) – тролокс и (г) – аскорбиновая кислота.

циональную активность различных цитокинов: интерлейкинов, факторов роста и γ -интерферона в опухолевых и иммунокомпетентных клетках, принимающих участие в воспалительных реакциях [8–10].

Используя в качестве носителя триптантрина хитозан, мы разработали лекарственную форму препарата, названного «Коурохитином», который проявляет, прежде всего, противовоспалительную, ранозаживляющую, противоаллергическую и противомикробную активность [1–3]. Модулирующее действие редокс-активных соединений, которые часто называют антиоксидантами, на свободнорадикальные процессы часто способствует как усилению, так и ослаблению сложных процессов, вызывающих воспаление. Поэтому такие антиоксиданты на клеточном уровне могут вызвать нежелательные побочные эффекты, связанные с нейтрализацией функционально значимых для внутриклеточной сигнальной трансдукции активных форм кислорода [4].

Учитывая отмеченный выше широкий спектр биологической активности триптантрина и его фармакологическую перспективность как потенциального противовоспалительного и иммуномодулирующего агента, цель настоящей работы состояла в проведении сравнительного исследования антиоксидантных (радикалперехватывающих) свойств триптантрина в системах 2,2'-азобис(2-метилпропионамидин)дигидрохлорид–люминол и гемоглобин–пероксид водорода–люминол в сравнении с тролоксом, аскорбиновой кислотой и дигидрокверцетином, структурные формулы которых приведены на рис. 1б–г, и оценке его мембранотропной ак-

тивности с использованием плоских бислойных липидных мембран.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В работе использовали: триптантрин, 2,2'-азобис(2-метилпропионамидин)дигидрохлорид (АБАП), гемоглобин (Hb), аскорбиновую кислоту («Sigma-Aldrich», США), люминол (ЛМ), тролокс («Fluka», Швейцария); дигидрокверцетин (ОАО «Диод», Россия); $\text{KН}_2\text{PО}_4$, КОН, диметилсульфоксид («Химмед», Россия).

Антиоксидантные свойства триптантрина изучали с помощью двух хемилюминесцентных модельных систем окисления: гомогенной системы, состоящей из гемоглобина, пероксида водорода и люминола ($\text{Hb-H}_2\text{O}_2\text{-ЛМ}$), и гомогенной системы, представляющей собой раствор азосоединения 2,2'-азобис(2-метилпропионамидин)дигидрохлорида и люминола (АБАП–ЛМ) [11].

Хемилюминесцентные измерения проводили с помощью хемилюминометра ХЛМ-3 («Бикап», Россия). Кинетику хемилюминесценции регистрировали и обрабатывали с помощью интерфейса MacLab/2e (ADInstruments, Австралия), связанного с компьютером Macintosh LC II.

На полученных кинетиках определяли длительность латентного периода, которую рассчитывали как время от момента введения АБАП до начала развития свечения. Далее находили значения латентного периода в контроле (величина t_0) и для различных концентраций тролокса, дигидрокверцетина, аскорбиновой кислоты и триптантрина (величина t).

После этого строили калибровочную зависимость латентного периода от концентрации тролокса по следующему линейному уравнению:

$$t/t_0 = 1 + K_T \times C_T, \quad (1)$$

где t/t_0 – изменение латентного периода; K_T – константа изменения латентного периода для тролокса; C_T – концентрация тролокса.

Затем аналогичную зависимость находили для исследуемого препарата:

$$t/t_0 = 1 + K_x \times C_x, \quad (2)$$

где t/t_0 – изменение латентного периода хемилюминисценции; K_x – константа изменения латентного периода для исследуемого вещества; C_x – концентрация исследуемого вещества.

Все исследованные препараты имели хорошую линейную зависимость полученного уравнения (2) (коэффициент линейной корреляции 0,98–0,99). В этом случае можно записать:

$$K_x \times C_x = K_T \times C_T. \quad (3)$$

Используя уравнение (3) и рассчитанные по линейным уравнениям значения констант K_x и K_T , определяли величину антиоксидантной активности (АОА) препарата как отношение концентрации тролокса к концентрации исследуемого препарата в модельной системе:

$$AOA = C_T / C_x = K_x / K_T. \quad (4)$$

Чем больше величина антиоксидантной активности у исследуемого препарата, тем эффективнее он перехватывает радикалы-инициаторы в данной модельной системе.

В данных исследованиях тролокс был использован в качестве эталонного антиоксиданта (рис. 1б), а аскорбиновая кислота и дигидрокверцетин соответственно взяты в качестве известных стандартных антиоксидантов (рис. 1в,г).

Трипантрин растворяли в фосфатном буфере в концентрации 0,01 мг/мл. Тролокс и дигидрокверцетин сначала растворяли в этаноле в концентрации 10 мМ, затем полученный раствор разводили фосфатным буфером до концентрации 100 мкМ и использовали в работе. Все растворы готовили непосредственно перед экспериментом.

Для измерения хемилюминисценции, сопровождающей окисление люминола в системе $\text{Hb}-\text{H}_2\text{O}_2$ -ЛМ, в кювету хемилюминометра последовательно добавляли фосфатный буфер (50 мМ KH_2PO_4 , 100 мкМ ЭДТА, рН 7,4) до конечного объема 5 мл, 0,3 мкМ гемоглобина,

30 мкМ люминола и определенный объем исследуемого объекта. Инициирование окисления ЛМ осуществляли введением 90 мкМ пероксида водорода. Исследуемые вещества добавляли перед введением H_2O_2 [11].

Антиоксидантную активность препаратов в системе АБАП-ЛМ также определяли по окислению люминола, инициированному пероксильными радикалами. Среда инкубации объемом 5 мл содержала: 5 мМ АБАП и 10 мкМ люминола в фосфатном буфере (50 мМ KH_2PO_4 , 100 мкМ ЭДТА, рН 7,4). В среду инкубации, содержащую люминол, вводили АБАП и измеряли контрольную хемилюминограмму. Кинетики хемилюминисценции регистрировали в присутствии исследуемых веществ, которые добавляли в среду инкубации перед вводом АБАП [11].

Действие трипантрин на электрическую проводимость плоских фосфолипидных мембран оценивали, как описано ранее [11]. Все исследуемые вещества растворяли в диметилсульфоксиде. Для их формирования использовали раствор азолектина в декане (25–30 мг/мл). Стандартное измерительное напряжение равнялось 50 мВ. Величину электропроводности рассчитывали по формуле:

$$G_M = \frac{U - U'}{U} \times \frac{1}{R_{\text{эт}}} [\text{См}], \quad (5)$$

где G_M – электропроводность мембраны; U – напряжение, подаваемое от потенциометра; U' – напряжение на выходе; $R_{\text{эт}}$ – эталонное сопротивление. При построении графиков использовали значение удельной электропроводности G_M/S_M , [$\text{Ом}^{-1}\cdot\text{см}^{-2} \cong \text{См}\cdot\text{см}^{-2}$], где G_M – интегральная проводимость мембраны, S_M – площадь мембраны.

Для математической обработки экспериментального материала мы использовали программу Microsoft Excel 7.0 с применением методов вариационной статистики и вычислением средней арифметической величины (M), среднего квадратичного отклонения (C), ошибки средней арифметической (m) и t -критерия Стьюдента. Достоверными считались результаты при $p < 0,05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

В основу исследования антиоксидантной активности трипантрин были положены два теста, система гемоглобин- H_2O_2 и система, содержащая азоинициаторы (нестойкие соединения, самопроизвольно распадающиеся с образованием свободных радикалов). Количественной

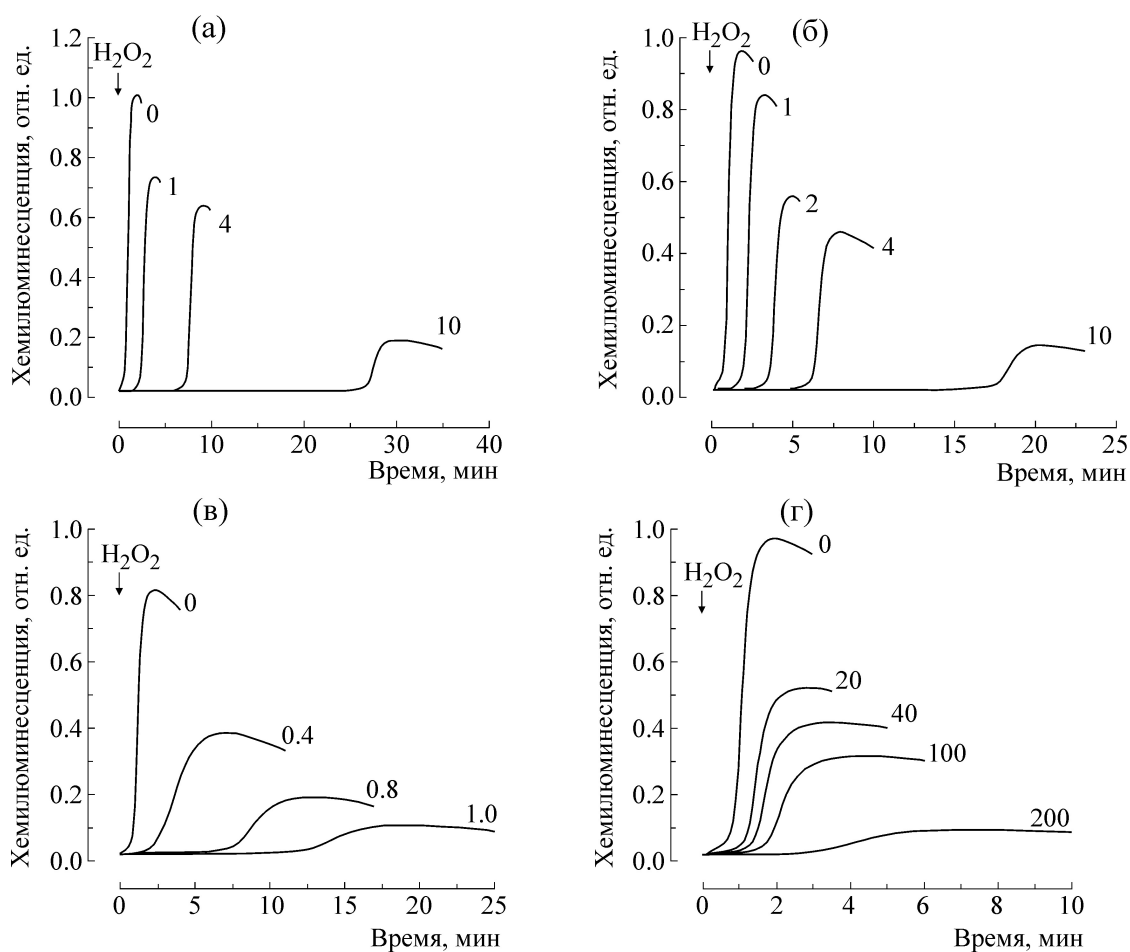


Рис. 2. Кинетики хемилюминесценции системы Nb–H₂O₂–ЛМ в присутствии тролокса (а), аскорбиновой кислоты (б), дигидрокверцетина (в) и триптантрина (г). Цифры у кривых – концентрация исследуемых веществ (мкМ). По оси абсцисс – время (мин). По оси ординат – интенсивность хемилюминесценции (отн. ед.).

мерой антиоксидантной активности является длительность периода, в течение которого хемилюминесценция была снижена в результате присутствия антиоксиданта в реакционной среде. Необходимость использования двух экспериментальных подходов – систем Nb–H₂O₂ и системы, содержащей азоинициаторы, была продиктована желанием исследовать радикал-перехватывающую активность исследованных соединений в отношении двух типов радикалов – гидроксил-анионов, образующихся в системе Nb–H₂O₂, и алкилперекисных радикалов, образующихся в системе, которая содержит азоинициаторы [11,12].

На рис. 2 представлены кинетики хемилюминесценции системы Nb–H₂O₂–ЛМ без исследуемых веществ и в присутствии тролокса (а), аскорбиновой кислоты (б), дигидрокверцетина (в) и триптантрина (г). Можно видеть, что примерно через 1 мин после добавления H₂O₂ к реакционной среде, содержащей гемоглобин

и люминол, развивается свечение хемилюминесценции, которое достигает максимальных значений на 3-й минуте и далее постепенно уменьшается. Максимальная интенсивность свечения (амплитуда хемилюминесценции) и время от момента введения H₂O₂ до начала развития свечения (латентный период) были выбраны в качестве измеряемых параметров.

На рис. 3 приведены данные о влиянии тролокса (а), дигидрокверцетина (б) и триптантрина (в) на амплитуду и латентный период хемилюминесценции в модельной системе Nb–H₂O₂–ЛМ. Окисление люминола сопровождается образованием радикала люминола и в конечном итоге приводит к образованию возбужденного продукта окисления, который переходит в основное состояние с высвечиванием кванта света хемилюминесценции. Количество выделившихся квантов света хемилюминесценции пропорционально количеству образовавшегося конечного продукта окисления и, сле-

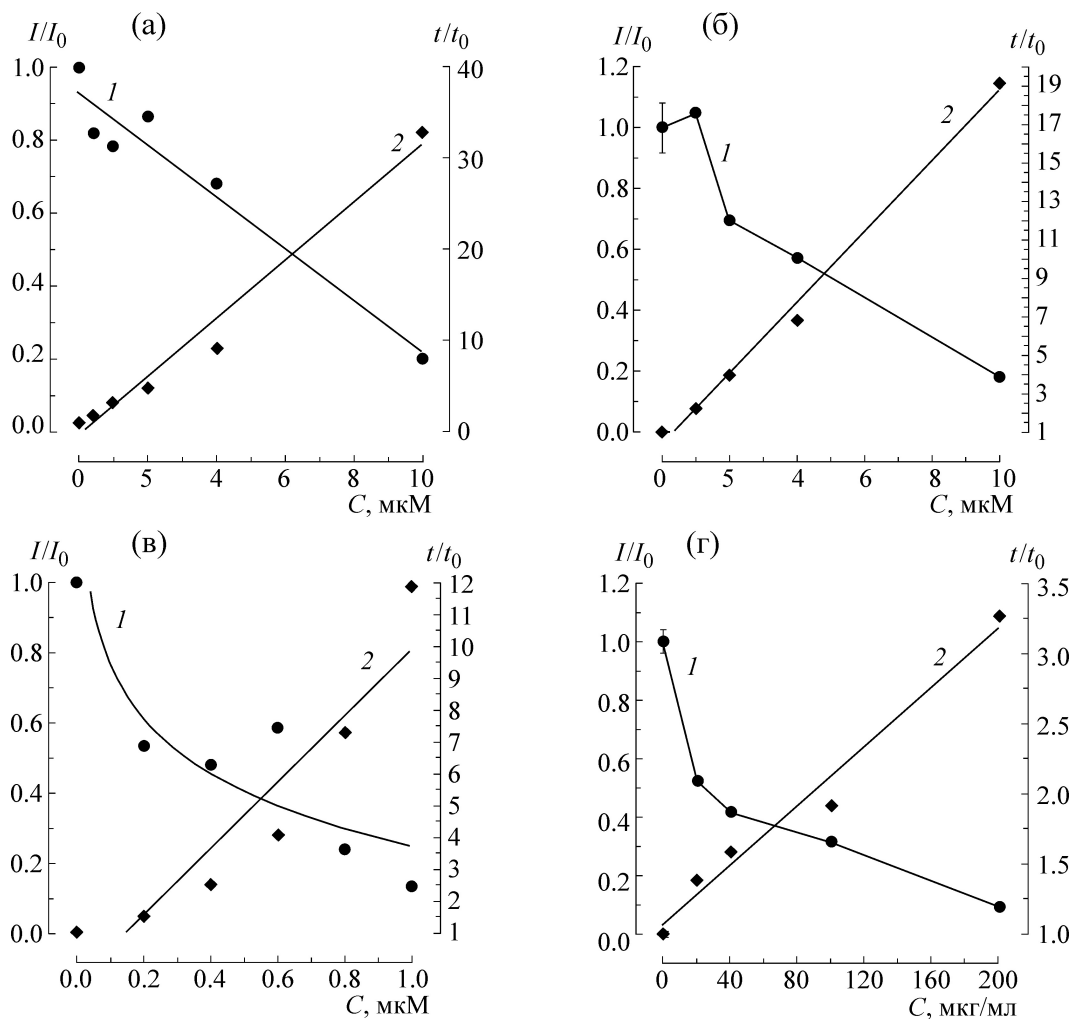


Рис. 3. Влияние тролокса (а), аскорбиновой кислоты (б), дигидрокверцетина (в) и триптантрина (г) на амплитуду (1) и латентный период (2) хемилюминесценции в системе Nb–H₂O₂–ЛМ. По оси абсцисс – концентрация исследуемых веществ (мкМ). По оси ординат слева – изменение амплитуды хемилюминесценции, справа – изменение латентного периода хемилюминесценции.

довательно, является мерой окисленности люминола. Добавление в данную модельную систему веществ, способных препятствовать окислению люминола (антиоксидантов), приводит к уменьшению количества квантов света хемилюминесценции [11,12].

Измерив кинетику интенсивности хемилюминесценции в системе Nb–H₂O₂–ЛМ в присут-

ствии тролокса, дигидрокверцетина и триптантрина, мы произвели сравнительный расчет их антиоксидантных свойств. В левой части таблицы представлены значения констант тушения хемилюминесценции модельной системы Nb–H₂O₂–ЛМ, которые свидетельствуют о том, что триптантрин обладает очень низкой антиоксидантной активностью: она приблизительно в

Антиоксидантная активность исследуемых веществ в модельных системах

Вещества	Модельная система Nb–H ₂ O ₂ –ЛМ		Модельная система АБАП–ЛМ	
	K_T , мкМ ⁻¹	АОА, усл. ед.	K_T , мкМ ⁻¹	АОА, усл. ед.
Тролокс	3,2 (K_T)	1,00	1,76 (K_T)	1,00
Триптантрин	0,0027	0,00084	0,00067	0,00038
Дигидрокверцетин	10,4	3,25	5,3	3,01
Аскорбиновая кислота	1,84	0,58	–	–

1000 раз меньше, чем у тролокса, и в 3000 раз, чем у биофлавоноида дигидрохверцетина. Трипантрин как антиоксидантный агент также приблизительно в 100 раз менее эффективен, чем аскорбиновая кислота.

В качестве второй модельной системы для исследования антиоксидантных свойств трипантрин мы использовали водную гомогенную систему на основе АБАП и люминола. Максимальная интенсивность свечения (амплитуда хемиллюминесценции) и время от момента введения АБАП до начала развития свечения (латентный период) были выбраны в качестве измеряемых параметров. Как видно из данных, приведенных на рис. 4, трипантрин оказывает незначительное влияние на амплитуду и латентный период хемиллюминесценции очевидно из-за слабой нейтрализующей активности в отношении пероксильных радикалов.

По этим показателям трипантрин также гораздо менее эффективен, чем тролокс и дигидрохверцетин. Как видно из данных правой части таблицы, трипантрин по параметрам антиоксидантной активности в системе АБАП-ЛМ более чем в 1000 раз менее эффективен, чем тролокс, и приблизительно в 3000 раз, чем дигидрохверцетин.

Ранее при оценке радикалулавливающих свойств трипантрин в тест-системе дифенилпикрилгидразинового радикала, которая широко используется для анализа АОО природных соединений, также было отмечено отсутствие антирадикальной активности в широком диапазоне концентраций трипантрин [7].

Несмотря на то, что медико-биологические свойства трипантрин изучены довольно хорошо, до настоящего времени не было никакой информации о мембранотропной активности этого хиназолинового алкалоида. Из данных, представленных рис. 5, видно, что трипантрин только в достаточно высоких дозах ($1,0 \cdot 10^{-5}$ М) вызывает незначительное, примерно 10-кратное, увеличение электропроводности плоских бислоевых фосфолипидных мембран. Следовательно, можно заключить, что в низких физиологических концентрациях трипантрин оказывает слабое влияние на ионную проницаемость модельных фосфолипидных мембран. Полученные результаты наводят на мысль, что трипантрин при взаимодействии с клеточными мембранами в физиологических концентрациях не оказывает первичного мембранотропного действия на липидный бислой.

Хорошо известно, что многие противвоспалительные вещества (биофлавоноиды, полифенольные и другие ароматические соединения)

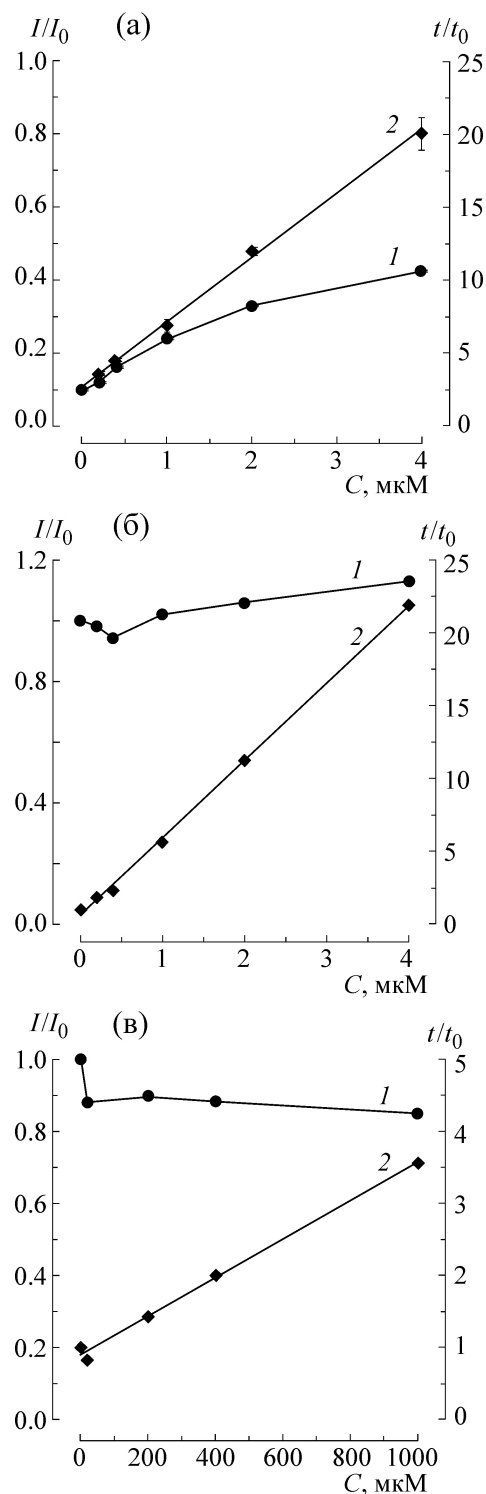


Рис. 4. Влияние тролокса (а), дигидрохверцетина (б) и трипантрин (в) на амплитуду (I) и латентный период (t) хемиллюминесценции в системе АБАП-люминол. По оси абсцисс – концентрация тролокса (мкМ). По оси ординат слева – изменение амплитуды хемиллюминесценции, справа – изменение латентного периода хемиллюминесценции.

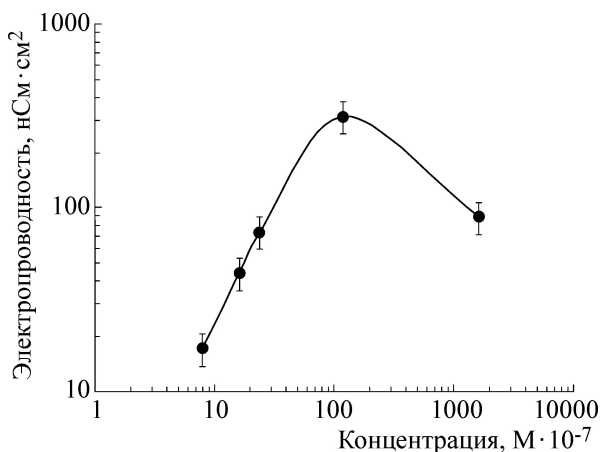


Рис. 5. Электропроводность мембран в зависимости от концентрации триптантрина в окружающей среде.

обладают высокой антиоксидантной активностью благодаря выраженному нейтрализующему действию на внутриклеточные активные формы кислорода (супероксид-анион, пероксильные радикалы гидроксил-анион и другие), т.е. их противовоспалительная активность тесно связана с антиоксидантной активностью в отношении различных активных форм кислорода [13]. Полученные нами данные свидетельствуют об отсутствии у триптантрина значимой радикалперехватывающей активности. Следовательно, высокая противовоспалительная активность вещества не всегда находится в прямой зависимости от степени выраженности его антиоксидантных свойств. Можно предположить, что механизмы противовоспалительной активности триптантрина не связаны с нейтрализующим действием в отношении активных форм кислорода и влиянием на проницаемость клеточных мембран.

Нами недавно было показано [14], что при развитии различных воспалительных патологических процессов в организме экспериментальных животных триптантрин эффективно ингибирует содержание различных цитокинов как в местах воспаления, так и в плазме крови. Значительное сокращение уровня цитокинов, исполняющих важную роль лигандов толл-подобных рецепторов, приводит к резкому уменьшению функциональной активности клеток. Анализ последних данных о механизме ингибирования триптантрином пролиферации лейкозных клеток говорит о том [15], что факторы

транскрипции – сигнальные трансдукторы и активаторы транскрипции (СТАТы), принимающие непосредственное участие в трансдукторной передаче сигнала от толл-подобных рецепторов в ядро клетки, являются одной из основных молекулярных мишеней триптантрина.

Таким образом, механизм противовоспалительной активности триптантрина может быть связан со специфическим блокированием работы толл-подобных рецепторов и факторов транскрипции в клетках, принимающих участие в активации и развитии воспалительных процессов.

Работа выполнена при финансовой поддержке Программы повышения конкурентоспособности ДВФУ «Создание центра разработки физиологически активных веществ».

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. А. М. Попов, Ю. М. Гафуров, Т. В. Московкина и др., Докл. АН **426** (1), 119 (2009).
2. А. М. Попов, О. И. Недашковская, Ю. М. Гафуров и др., Биофармацевт. журн. **3** (3), 3 (2011).
3. А. М. Попов, Ю. П. Штода, О. Н. Кривошапко и др., Биофармацевт. журн. **4** (2), 21 (2012).
4. Y. Jahng Arch, Pharm. Res. **36** (5), 517 (2013).
5. Т. В. Московкина, М. В. Денисенко, А. И. Калининский и В. А. Стоник, Журн. орган. химии **49** (12), 1760 (2013).
6. T. Ishihara, K. Kohno, S. Ushio, et al., Eur. J. Pharmacol. **407**, 197 (2000).
7. C. Pergola, B. Jazzar, A. Rossi, et al., Br. J. Pharmacol. **165**, 765 (2012).
8. N. R. Han, P. D. Moon, H. M. Kim, and H. J. Jeong, Arch. Biochem. Biophys. **542**, 14 (2014).
9. M. J. Micallef, K. Iwaki, T. Ishihara, et al., Int. Immunopharmacol. **2**, 565 (2002).
10. T. Motoki, Y. Takami, Y. Yagi, et al., Biol. Pharm. Bull. **28** (2), 260 (2005).
11. А. М. Попов, А. Н. Осипов, Е. А. Корепанова, et al., Biophysics **58** (5), 607 (2013).
12. J. A. Barltrop, T. C. Owen, A. H. Cory, and J. G. Cory, J. Bioorg. Med. Chem. Lett., № 11, 611 (1991).
13. А. М. Попов, О. Н. Кривошапко и А. А. Артюков, Биофармацевт. журн. **4** (4), 27 (2012).
14. А. М. Попов, О. Н. Кривошапко, А. В. Цыбульский и др., Биофармацевт. журн. **7**, (2015).
15. A. S. Pathania, S. Kumar, S. K. Guru, et al., PLOS One **9** (11), (2014).

Study of Antioxidant and Membranotropic Activities of Quinazoline Alkaloid Tryptanthrin Using Different Model Systems

A.M. Popov* **, A.N. Osipov***, E.A. Korepanova***, O.N. Krivoshapko*,
Yu.P. Shtoda*, and A.A. Klimovich*

**Elyakov Pacific Institute of Bioorganic Chemistry, Far Eastern Branch, Russian Academy of Sciences, prosp. 100-letiya Vladivostoka 159, Vladivostok, 690022 Russia*

***Far Eastern Federal University, ul. Oktjabrskaya 27, Vladivostok, 690000 Russia*

****Pirogov Russian National Research Medical University, ul. Ostrovityanova 1, Moscow, 117997 Russia*

A comparative study of antioxidant (radical-interceptor) properties of tryptanthrin (quinazoline alkaloid shows a high anti-inflammatory activity and it is found in many types of different families of higher plants and microorganisms, including the human microbiome) in the systems of 2,2'-azobis(2-methylpropionamidin)dihydrochloride–luminol and hemoglobin–hydrogen peroxide–luminol has been conducted and the influence on the permeability of planar bilayer lipid membranes is evaluated. Trolox was used as a reference antioxidant, and ascorbic acid and dihydroquercetin were taken as standards. Tryptanthrin exhibits very weak antioxidant activity, being markedly inferior to the reference standard and antioxidants while testing antioxidant activity in both studied systems. By the efficacy of antioxidative action the substrates in the systems studied can be arranged in the following order: dihydroquercetin > trolox > ascorbic acid > tryptanthrin. Antioxidant potential of tryptanthrin is approximately 1000 and 3000 times lower than that of trolox and bioflavonoid dihydroquercetine, respectively. Tryptanthrin causes no significant changes in the permeability of planar bilayer membranes in a dose range of 0.5 to 10 µg/ml. Our data show that tryptanthrin displays no significant radical-interceptor and membranotropic activities. It can be assumed that the observed high anti-inflammatory activity of tryptanthrin is not related to the neutralizing effect against reactive oxygen species and the influence on the permeability of cell membranes. The anticipated mechanisms of biological activity of tryptanthrin are discussed.

Key words: alkaloids, tryptanthrin, antioxidants, reactive oxygen species, anti-inflammatory activity