

## ИЗУЧЕНИЕ АНТИОКСИДАНТНОЙ И МЕМБРАНОТРОПНОЙ АКТИВНОСТИ ЭХИНОХРОМА А С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ РАЗЛИЧНЫХ МОДЕЛЬНЫХ СИСТЕМ

© 2017 г. А.М. Попов\* \*\*, А.Н. Осипов\*\*\*, Е.А. Корепанова\*\*\*, О.Н. Кривошапко\*, А.А. Аргюков\*, А.А. Климович\*

\*Тихоокеанский институт биоорганической химии им. Г.Б. Елякова ДВО РАН, 690022, Владивосток, просп. 100-лет Владивостоку, 15

E-mail: popovam@piboc.dvo.ru

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

\*\*\*Российский государственный медицинский университет имени Н.И. Пирогова МЗ РФ, 117997, Москва, ул. Островитянова, 1

E-mail: osipov@fbm.msu.ru

Поступила в редакцию 09.06.15 г.

После доработки 15.04.16 г.

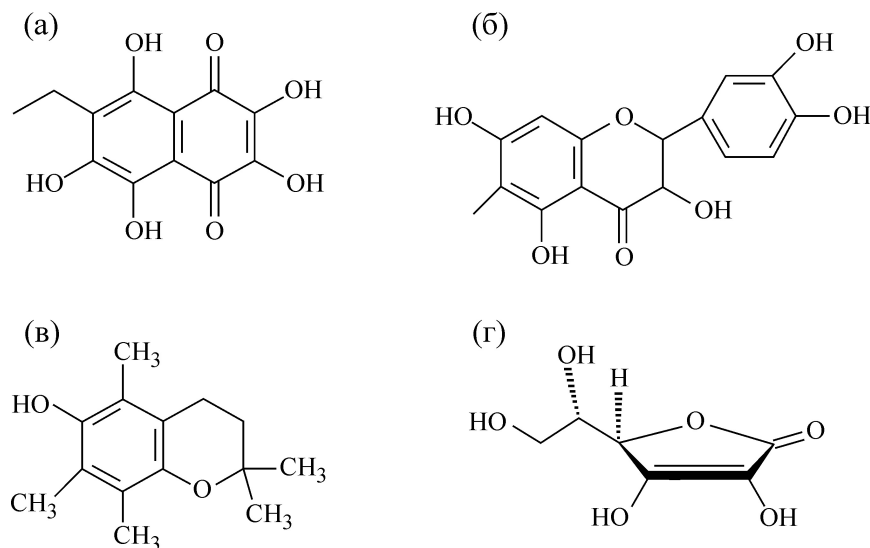
Эхинохром А, или 6-этил-2,3,5,7,8-пентагидрокси-1,4-нафтохинон, выделенный из тела плоского морского ежа *Scaphechinus mirabilis*, является активной основой кардиопротекторного лекарственного препарата «Гистохром» и обладает широким спектром противовоспалительной активности. В работе проведено сравнительное исследование антиоксидантных (радикалперехватывающих) свойств эхинохрома А в системах 2,2'-азо-бис(2-метилпропионамидин)дигидрохлорид-люминол и гемоглобин-пероксид водорода-люминол и оценено его влияние на проницаемость плоских бислойных липидных мембран. В качестве эталонного антиоксиданта использовали тролокс, в качестве стандартов – аскорбиновую кислоту и дигидрохверцетин. Эхинохром А показал умеренную антиоксидантную активность, проявляя более высокий антиоксидантный потенциал, чем тролокс и аскорбиновая кислота, но уступая дигидрохверцетину в тестах по антиоксидантной активности в обеих исследованных системах. По эффективности антиоксидантного действия исследуемые вещества можно выстроить в следующий ряд: дигидрохверцетин > эхинохром А > тролокс > аскорбиновая кислота. Эхинохром А не вызывает достоверного изменения проницаемости плоских бислойных мембран в диапазоне доз от 1,5 до 30 мкМ. Полученные данные свидетельствуют о наличии у эхинохрома А достаточно высокой радикалперехватывающей активности и об отсутствии первичного мембранотропного действия. Можно предположить, что отмеченная высокая кардиопротекторная и противовоспалительная активность эхинохрома А связаны не только с его нейтрализующим действием в отношении активных форм кислорода, но и со способностью формировать в биологических системах физиологические концентрации молекул перекиси водорода как сигнальных мессенджеров различных метаболических процессов и биохимических путей. Предполагаемые механизмы биологической активности эхинохрома А обсуждаются.

*Ключевые слова:* 1,4-нафтахиноны, эхинохром А, антиоксиданты, перекись водорода, противовоспалительная активность.

Разнообразие химических структур нафтохинонов, их высокая биологическая активность и перспективы их эффективного терапевтического применения привлекают большое внимание. Они найдены в растениях (филлохиноны),

в морских беспозвоночных (спинохромы) и у людей (витамины группы К) и проявляют кардиопротекторную, противовоспалительную, антиоксидантную и иммуномодулирующую активность. Эхинохром А, или 6-этил-2,3,5,7,8-пентагидрокси-1,4-нафтохинон (ЭХА), выделенный из тела плоского морского ежа *Scaphechinus mirabilis*, является активной основой кардиопротекторного лекарственного препарата «Гистохром» и обладает широким спектром противовоспалительного действия [1–8].

Сокращения: ЭХА – эхинохром А, ААРН – 2,2'-азобис(2-метилпропионамидин) дигидрохлорид, Нб – гемоглобин, ЛМ – люминол, ХЛ – хемилюминесценция, АОА – антиоксидантная активность, БАД – биологически активная пищевая добавка.



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

ЭХА используется в клинике для лечения офтальмологических заболеваний и инфаркта миокарда на ранних стадиях развития этого патологического процесса [2–4]. Полученные нами положительные результаты в серии экспериментов *in vivo* при моделировании диабета, гиперлипидемии и других патологий, связанных с развитием плохо регулируемых воспалительных и иммунологических реакций, позволяют в значительной мере расширить терапевтический диапазон использования ЭХА [5–7].

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

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

ЭХА был выделен из плоского морского ежа *Scaphechinus mirabilis* в лаборатории биотехнологии ТИБОХ ДВО РАН согласно процедуре, описанной в работе [8]. Также были использованы: 2,2'-азобис(2-метилпропионамидин)дигидрохлорид (ААРН), гемоглобин (Нб),

аскорбиновая кислота (все – от Sigma-Aldrich, США); люминол (ЛМ), тролокс (Fluka, Швейцария); дигидрокверцетин (ОАО «Диод», Россия);  $\text{KН}_2\text{PO}_4$ ,  $\text{KOH}$ , диметилсульфоксид («Химмед», Россия).

Антиоксидантные свойства ЭХА 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 (ААРН–ЛМ) [9].

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

По полученным кинетическим зависимостям определяли длительность латентного периода, которую рассчитывали как время от момента введения ААРН до начала развития свечения. Далее находили значения латентного периода в контроле ( $t_0$ ) и для различных концентраций тролокса, дигидрокверцетина, аскорбиновой кислоты и ЭХА ( $t$ ).

После этого производили построение калибровочной зависимости латентного периода от концентрации тролокса по следующему линейному уравнению:

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

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:

$$t/t_0 = 1 + K_X C_X, \quad (2)$$

где  $t/t_0$  – изменение латентного периода ХЛ;  $K_X$  – 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:

$$K_X C_X = K_T C_T. \quad (3)$$

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:

$$АОА = C_T / C_X = K_X / K_T. \quad (4)$$

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

В данных исследованиях тролокс был использован как эталонный антиоксидант, а аскорбиновая кислота и дигидрокверцетин – в качестве известных стандартных антиоксидантов.

ЭХА, тролокс и дигидрокверцетин сначала растворяли в этаноле до концентрации 10 мМ, затем полученный раствор разводили фосфатным буфером до концентрации 100 мкМ. Все растворы были приготовлены непосредственно перед экспериментом.

Для измерения ХЛ, сопровождающей окисление ЛМ в системе Нб–Н<sub>2</sub>О<sub>2</sub>–ЛМ, в кювету хемилуминометра последовательно добавляли фосфатный буфер (50 мМ КН<sub>2</sub>РО<sub>4</sub>, 100 мкМ ЭДТА, рН 7,4) до конечного объема 5 мл, 0,3 мкМ Нб, 30 мкМ ЛМ и определенный объем исследуемого объекта. Инициирование окисления ЛМ осуществляли введением 90 мкМ перекиси водорода. Исследуемые вещества добавляли перед введением Н<sub>2</sub>О<sub>2</sub> [9].

Антиоксидантную активность препаратов в системе ААРН–люминол также определяли по окислению ЛМ, инициированному пероксильными радикалами. Среда инкубации объемом 5 мл содержала: 5 мМ ААРН и 10 мкМ ЛМ

в фосфатном буфере (50 мМ КН<sub>2</sub>РО<sub>4</sub>, 100 мкМ ЭДТА, рН 7,4). В инкубационную среду, содержащую ЛМ, вводили ААРН и измеряли контрольную хемилуминограмму. Исследуемые вещества добавляли в среду инкубации непосредственно перед добавлением перекиси и вводом ААРН [9].

Действие ЭХА на электрическую проводимость плоских фосфолипидных мембран оценивали, как описано ранее [9]. Все исследуемые вещества растворяли в диметилсульфоксиде. Для формирования мембран использовали раствор азолектина в декане (25 ÷ 30 мг/мл). Стандартное измерительное напряжение равнялось 50 мВ. Величину электропроводности рассчитывали по формуле:

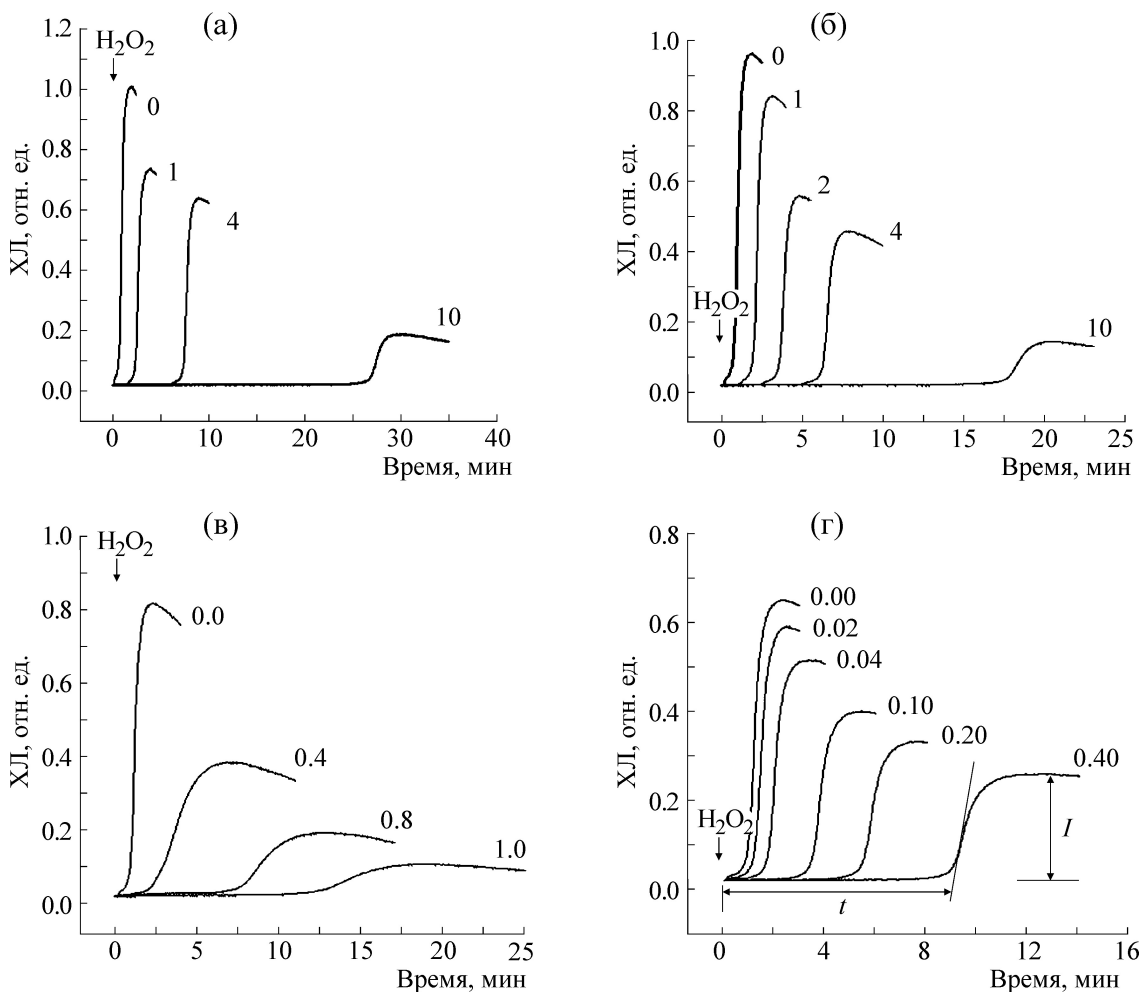
$$G_M = \frac{U - U'}{U'} \frac{1}{R_{эт}} [СМ], \quad (5)$$

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

Для математической обработки экспериментального материала 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 ЭХА были положены два теста – система гемоглобин–Н<sub>2</sub>О<sub>2</sub> и система, содержащая азоинициаторы (нестойкие соединения, самопроизвольно распадающиеся с образованием свободных радикалов). Количественной мерой АОА является длительность периода, в течение которого ХЛ была снижена в результате присутствия антиоксиданта в реакционной среде. Необходимость использования двух экспериментальных подходов – системы Нб–Н<sub>2</sub>О<sub>2</sub> и системы, содержащей азоинициаторы, – была продиктована желанием исследовать радикал-перехватывающую активность исследованных соединений в отношении двух типов радикалов – гидроксил-анионов, образующихся в системе Нб–Н<sub>2</sub>О<sub>2</sub>, и алкилперекисных радикалов,



**Рис. 2.** Кинетики хемилюминесценции системы Nb-H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-ЛМ в присутствии тролокса (а), аскорбиновой кислоты (б), дигидрокверцетина (в) и эхинохрома А (г). Цифры у кривых – концентрация тролокса, аскорбиновой кислоты, дигидрокверцетина (мкМ), эхинохрома А (мкг/мл). По оси абсцисс – время (мин). По оси ординат – интенсивность хемилюминесценции (отн. ед.).

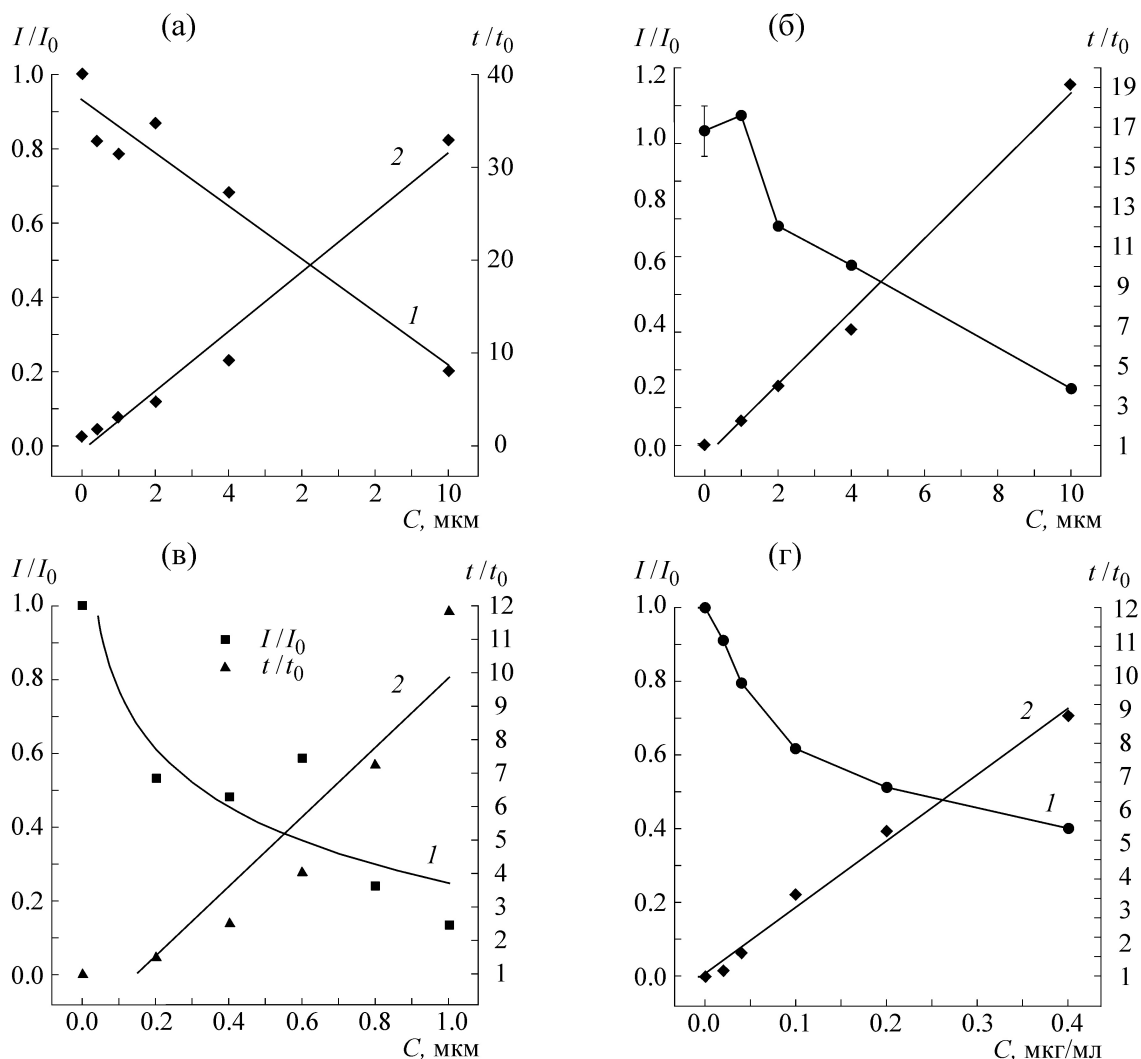
образующихся в системе, которая содержит азоинициаторы [9].

На рис. 2 представлены кинетики хемилюминесценции системы Nb-H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-ЛМ без исследуемых веществ и в присутствии тролокса (а), аскорбиновой кислоты (б), дигидрокверцетина (в) и ЭХА (г). Можно видеть, что примерно через одну минуту после добавления H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> к реакционной среде, содержащей Nb и ЛМ, развивается свечение ХЛ, которое достигает максимальных значений на третьей минуте и далее постепенно уменьшается. Максимальная интенсивность свечения (амплитуда ХЛ) и время от момента введения H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> до начала развития свечения (латентный период) были выбраны в качестве измеряемых параметров.

На рис. 3 приведены данные о влиянии тролокса (а), дигидрокверцетина (б) и ЭХА (в) на амплитуду и латентный период хемилюми-

несценции в модельной системе Nb-H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-ЛМ. Окисление ЛМ сопровождается образованием радикала ЛМ и в конечном итоге приводит к образованию возбужденного продукта окисления, который переходит в основное состояние с высвечиванием кванта света ХЛ. Количество выделившихся квантов света ХЛ пропорционально количеству образовавшегося конечного продукта окисления и, следовательно, является мерой окисленности ЛМ. Добавление в данную модельную систему веществ, способных препятствовать окислению ЛМ (антиоксидантов), приводит к уменьшению количества квантов света ХЛ [9].

Измерив кинетику интенсивности ХЛ в системе Nb-H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-ЛМ в присутствии тролокса, дигидрокверцетина и ЭХА, мы произвели сравнительный расчет их антиоксидантных свойств.



**Рис. 3.** Влияние тролокса (а), аскорбиновой кислоты (б), дигидрокверцетина (в) и эхинохрома А (г) на амплитуду (кривая 1) и латентный период (кривая 2) хемилюминесценции в системе Nb–H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>–ЛМ. По оси абсцисс – концентрация тролокса и дигидрокверцетина (мкМ), эхинохрома А (мкг/мл). По оси ординат слева – изменение амплитуды ХЛ, справа – изменение латентного периода ХЛ. Приведенные величины статистически достоверны при  $p < 0,05$ .

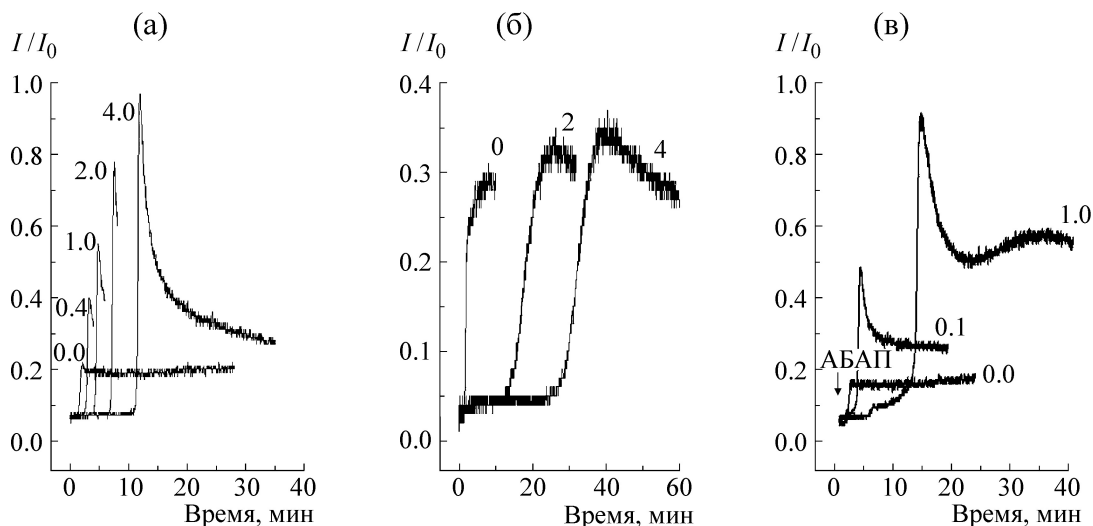
В левой части таблицы представлены значения констант тушения хемилюминесценции модельной системы Nb–H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>–ЛМ, которые свидетельствуют о том, что ЭХА обладает АОА более

чем в 1,5 и 3 раза выше, чем у тролокса и аскорбиновой кислоты соответственно, и примерно в 2 раза ниже, чем у биофлавоноида дигидрокверцетина.

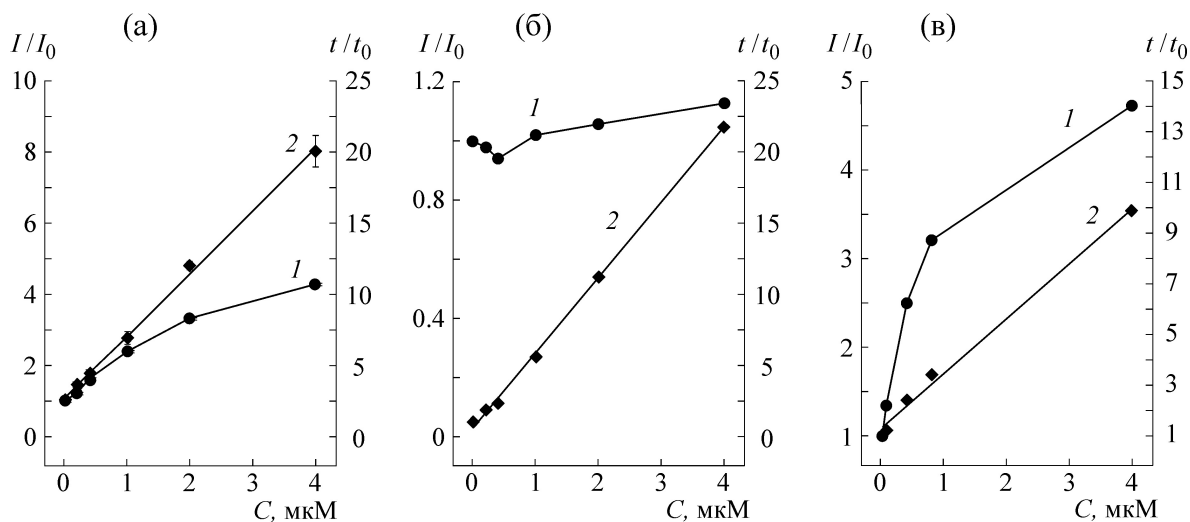
Антиоксидантная активность исследуемых веществ в модельных системах Nb–H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>–ЛМ и ААРН–люминол

Вещества	Модельная система Nb–H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> –ЛМ		Модельная система ААРН–ЛМ	
	$K_X$ , мкМ <sup>-1</sup>	АОА, усл. ед.	$K_X$ , мкМ <sup>-1</sup>	АОА, усл. ед.
Тролокс	3,20 ± 0,30 ( $K_T$ )	1,00	1,76 ± 0,09 ( $K_T$ )	1,00
Эхинохром А	5,28 ± 0,46	1,65	2,30 ± 0,15	1,31
Дигидрокверцетин	10,40 ± 0,85	3,25	5,30 ± 0,25	3,01
Аскорбиновая кислота	1,84 ± 0,08	0,58	–	–

Примечание. Приведенные в таблице величины статистически достоверны при  $p < 0,05$ .



**Рис. 4.** Кинетики хемилюминесценции системы ААРН–люминол в присутствии тролокса (а), дигидрокверцетина (б) и ЭХА (в). Цифры у кривых – концентрация тролокса, аскорбиновой кислоты, дигидрокверцетина ( $\mu\text{M}$ ), эхинохрома ( $\mu\text{г/мл}$ ). Стрелкой показан момент введения ААРН. По оси абсцисс – время (мин). По оси ординат – интенсивность хемилюминесценции (отн. ед.).



**Рис. 5.** Влияние тролокса (а), дигидрокверцетина (б) и эхинохрома А (в) на амплитуду (кривая 1) и латентный период (кривая 2) хемилюминесценции в системе ААРН–люминол. По оси абсцисс – концентрация тролокса и дигидрокверцетина ( $\mu\text{M}$ ), эхинохрома А ( $\mu\text{г/мл}$ ). По оси ординат слева – изменение амплитуды ХЛ, справа – изменение латентного периода ХЛ. Приведенные величины статистически достоверны при  $p < 0,05$ .

В качестве второй модельной системы для исследования антиоксидантных свойств ЭХА мы использовали водную гомогенную систему на основе ААРН–люминол. Максимальная интенсивность свечения (амплитуда ХЛ) 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 и 5, ЭХА оказывает заметное влияние на амплитуду и латентный период ХЛ, очевидно, вследствие

высокой нейтрализующей активности в отношении пероксильных радикалов.

Как видно из данных, приведенных в правой части таблицы, ЭХА примерно в 1,3 раза более эффективен, чем тролокс, но приблизительно в 2,5 раза менее активен, чем дигидрокверцетин.

Ранее [10] при оценке радикалулавливающих свойств ЭХА в тест-системе дифенилпикрил-гидрозинового радикала, которая широко используется для анализа АОО природных соединений, также было отмечено наличие достаточ-

но высокой антирадикальной активности ЭХА, что подтверждает результаты наших наблюдений.

Несмотря на то что медико-биологические свойства ЭХА изучены довольно хорошо, до настоящего времени не было никакой информации о мембранотропной активности этого полигидроксиафтохинона. На рис. 6 показано действие ЭХА на электропроводность бислойных липидных мембран в зависимости от его концентрации в окружающей среде. Следует отметить, что ЭХА обладает слабой мембранотропной активностью. Он только в высоких концентрациях, например  $3,0 \cdot 10^{-4}$  М, вызывает увеличение электропроводности мембран примерно в 100 раз, а при концентрациях выше, чем  $7,0 \cdot 10^{-4}$  М, мембраны разрушаются. Этот эффект ЭХА неспецифический, и поэтому не представляет интереса для объяснения его биологической активности. Полученные результаты наводят на мысль, что ЭХА при взаимодействии с клеточными мембранами в физиологических концентрациях не оказывает значимого первичного мембранотропного действия на липидный бислой.

Таким образом, в экспериментах *in vitro* ЭХА обладает умеренной прямой АОА и по способности нейтрализовать радикальные активные формы кислорода заметно уступает дигидрохверцетину. Как показали наши недавние исследования [9], в свою очередь, розмариновая кислота имеет гораздо более высокий антиоксидантный потенциал, чем дигидрохверцетин.

Необходимо отметить, что препараты серии «Гистохром», активным началом которых является ЭХА, в настоящее время успешно применяются в качестве лекарственных средств для лечения инфаркта миокарда и некоторых офтальмологических заболеваний [8]. ЭХА составляет также основу биологически активной пищевой добавки (БАД) «Тимарин» [4,8]. Клинические исследования на группах пациентов с ишемической болезнью сердца показали высокую эффективность этой БАД при пероральном использовании для коррекции нарушений липидного обмена и эндотелиальной дисфункции [4,7,8]. Эта БАД нормализовала липидный статус пациентов не хуже, чем такие широко известные лекарственные препараты, как статины (аторвастатин), которые принимали пациенты контрольной группы в течение 6–12 недель [8].

Широкий спектр биологической активности ЭХА предполагает, что не только антиоксидантный потенциал этого соединения вносит вклад в его лечебные свойства. ЭХА по химической природе относится к группе витами-

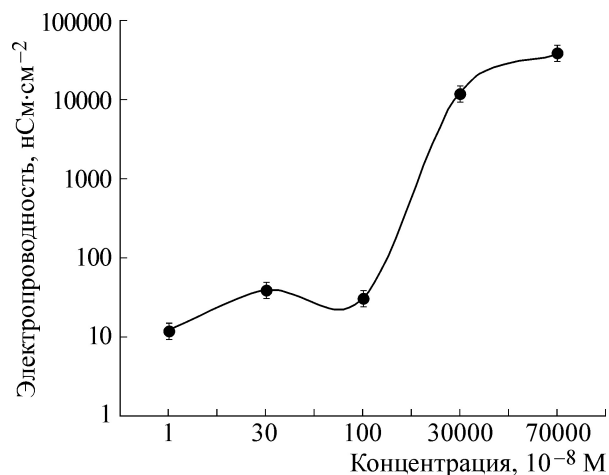


Рис. 6. Электропроводность мембран в зависимости от концентрации эхинохрома А в буферном солевом растворе. Концентрации эхинохрома А приведены в логарифмической шкале.

нов К, но не оказывает видимого влияния на гемостаз, а по своим редокс-свойствам наиболее близок к аскорбиновой кислоте (витамин С). Аскорбиновая кислота и ЭХА обнаруживают сходную хелатирующую активность в отношении ионов двухвалентных металлов, имеют одинаковые окислительно-восстановительные потенциалы, равные +0,080 В, и содержат в своем составе редуктоновую группировку [8,11]. Важно и то, что во многих редокс-процессах, опосредованных свободными радикалами, аскорбиновая кислота и ЭХА могут действовать не только как антиоксиданты, но и как прооксиданты [1–3,11].

Наличие хиноновой структуры сближает ЭХА с убихиноном, который является ключевым агентом электронно-транспортных сетей в организме человека и животных, и витамином К<sub>3</sub> (менадионом), который, как и ЭХА, имеет 1,4-нафтохиноновую структуру. Однако, в отличие от менадиона, ЭХА не оказывает никакого влияния на коагуляционную систему гемостаза [8].

Уникальным свойством ЭХА и витамина К<sub>3</sub> является способность функционировать в качестве регенерирующей без распада редокс-пары хинон–хинол. Оба эти нафтохинона могут являться переносчиками электронов между различными энзиматическими комплексами митохондриальной дыхательной цепи и быть эффективными ингибиторами перекисного окисления липидов. Как и менадион, ЭХА, очевидно, может восстанавливать электронный поток при нарушении дыхательной цепи (гипоксия или воздействие ротенона), усиливать образование

АТФ и уменьшать необратимые повреждения кардиомиоцитов [8,12].

В последнее время накапливается информация о том, что ЭХА при взаимодействии с клетками принимает участие в дополнительной продукции  $H_2O_2$ , что стимулирует внутриклеточные сигнальные процессы [1–8].  $H_2O_2$ -опосредованное окисление различных сигнальных белков является важным механизмом посттрансляционной регуляции различных биологических процессов, включая пролиферацию, дифференцировку и апоптоз клеток [3,8,12]. В синтезе  $H_2O_2$  важную роль играет ДТ-диафраза, которая располагается в цитозоле около плазматической мембраны и принимает активное участие в редокс-превращениях ЭХА, которые приводят к образованию физиологических концентраций  $H_2O_2$  в цитозоле, что, несомненно, играет ключевую адаптационно-приспособительную роль в защите различных клеток и тканей организма [2–5,13].

Известно, что редокс-реакции пронизывают живые клетки. Поэтому способность таких редокс-соединений, как ЭХА, поддерживать окислительно-восстановительный баланс играет важную роль для нормального функционирования разных клеточных систем. В норме различные рецепторные структуры клеток, имеющие редокс-сенсоры в виде тиольных групп, проявляют высокую чувствительность к физиологическим концентрациям  $H_2O_2$  [8,11]. В ответ на изменение окислительно-восстановительного баланса в клетке инициируются сигнальные и метаболические пути, координируется репарация или шунтирование поврежденных клеточных компонентов, а также резко индуцируется синтез ферментов антиоксидантной системы защиты организма, которые в значительной степени повышают жизнеспособность и выживаемость клеток [8,14,15].

Можно предположить, что отмеченная для ЭХА высокая кардиопротекторная и противовоспалительная активность связана не только

с его радикалперехватывающими свойствами, но и со способностью ЭХА формировать *in vivo* в биологических системах физиологические концентрации молекул  $H_2O_2$  как сигнальных мессенджеров различных метаболических процессов и биохимических путей.

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. A. M. Popov and O. N. Krivoschapko, *New bioactive substances from marine organisms* (LAMBERT Academic Publishing: OmniScriptum GmbH & Co. KG Heinrich-Böcking-Str. 6–8, 66121, Saarbrücken, Germany, 2013).
2. А. М. Попов, О. Н. Кривошапко и А. А. Артюков, *Биофармацевтич. журн.* **4** (4), 27 (2012).
3. A. M. Popov and O. N. Krivoschapko, *J. Biomed. Sci. Engineer.* **6**, 543 (2013).
4. А. В. Цыбульский, А. М. Попов, О. Н. Кривошапко и др., *Биомед. химия* **60** (1), 115 (2014).
5. А. В. Цыбульский, А. М. Попов, А. А. Артюков и др., *Биомед. химия* **57** (3), 314 (2011).
6. А. В. Цыбульский, А. М. Попов, О. Н. Кривошапко, *Биофармацевтич. журн.* **5**(3), 21 (2013).
7. А. В. Цыбульский, А. М. Попов, О. Н. Кривошапко и др., *Биофармацевтич. журн.* **5** (2), 34 (2013).
8. А. А. Artyukov, А. М. Popov, А. V. Tsybulsky, et al., *Biochemistry (Moscow), Suppl. Ser. B: Biomed. Chem.* **7**, 239 (2013).
9. А. М. Popov, А. N. Osipov, Е. А. Korepanova, et al., *Biophysics* **58** (5), 607 (2013).
10. N. K. Utkina and N. D. Pokhilo, *Nat. Prod. Commun.* **7** (7), 901 (2012).
11. J. Mandl, A. Szarka, and G. Bánhegyi, *Br. J. Pharmacol.* **157**, 1097 (2009).
12. V. Shneyvays, D. Leshem, Y. Shmist, et al., *J. Mol. Cell. Cardiol.* **39**, 149 (2009).
13. А. Т. Dinkova-Kostova, and P. Talalay, *Arch. Biochem. Biophys.* **501** (1), 116 (2010).
14. L. A. Sena, N. S. Chandel, *Mol. Cell.* **48**, 158 (2012).
15. I. Irrcher, V. Ljubicic, and D. A. Hood, *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* **296** (1), 116 (2009).



## Study of Antioxidant and Membranotropic Activities of Echinochrome A Using Different Model Systems

A.M. Popov\* \*\*, A.N. Osipov\*\*\*, E.A. Korepanova\*\*\*, O.N. Krivoshapko\*,  
A.A. Artyukov\*, and A.A. Klimovich\*

\*Elyakov Pacific Institute of Bioorganic Chemistry, Far Eastern Branch of the Russian Academy of Sciences,  
prosp. 100-let Vladivostoku 15, Vladivostok, 690022 Russia

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

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

Echinochrome A (6-ethyl-2,3,5,7,8-pentahydroxy-1,4-naphthoquinone) isolated from the body of sand dollar *Scaphechinus mirabilis* is an active substance of cardioprotective medication «HistoChrome» and exerts a wide spectrum of anti-inflammatory activity. In the present paper, we conduct a comparative study of antioxidant (radical-scavenging) properties of echinochrome A in 2,2'-azobis(2-methylpropionamidine)dihydrochloride-luminol and hemoglobin-hydrogen peroxide-luminol systems and assess its impact on permeability of planar bilayer lipid membranes. Trolox was used as a reference antioxidant, and ascorbic acid and dihydroquercetin are taken as standards. Echinochrome A shows moderate antioxidant activity possessing higher antioxidant capacity than Trolox and ascorbic acid, but exhibiting lower antioxidant potential compared with dihydroquercetin in tests for antioxidant activity in both systems under investigation. The test substances can be arranged in the following order according to the effectiveness of the antioxidant effect: dihydroquercetin > echinochrome A > trolox > ascorbic acid. Echinochrome A does not lead to significant changes in permeability of planar bilayer membranes in a dose range of 1.5 to 30  $\mu\text{M}$ . Our data indicate that echinochrome A has rather high radical-scavenging activity without primary membranotropic effect. It is assumed that the high cardioprotective and anti-inflammatory activity of echinochrome A can be due not only to the ability of this substance to neutralize reactive oxygen species, but also to its capacity of generating in biological systems physiological concentrations of hydrogen peroxide molecules as signaling messengers of various metabolic processes and biochemical pathways. The suspected mechanisms of biological activity of echinochrome A are discussed.

*Key words:* 1,4-naphthoquinones, echinochrome A, antioxidants, hydrogen peroxide, anti-inflammatory activity