

АНТИОКСИДАНТНАЯ И МЕМБРАННАЯ АКТИВНОСТЬ БЕНЗОТРОПАЛОНОВОГО ПИГМЕНТА ПУРПУРОГАЛЛИНА

© 2019 г. А.М. Попов* **, А.Н. Осипов***, Е.А. Корепанова***, А.А. Климович*,
О.Н. Стышова*, А.А. Артюков*

*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 Минздрава РФ,
117997, Москва, ул. Островитянова, 1

E-mail: osipov@fbm.msu.ru

Поступила в редакцию 07.12.2017 г.

После доработки 24.01.2019 г.

Принята к публикации 01.04.2019 г.

Фенольное соединение пурпурагаллин, обнаруженное в дубовых орешках, представляет собой красный пигмент с бензотропалоновой кольцевой структурой. Пурпурагаллин обладает выраженной цитопротективной и противовоспалительной активностью. Предполагают, что пурпурагаллин может стать эффективным средством профилактики и лечения различных системных воспалительных заболеваний, оказывая влияние на функциональную активность различных клеточных метаболических и сигнальных путей, связанных с воспалением. В данной работе мы провели сравнительное исследование антиоксидантных (свободнорадикальных) свойств пурпурагаллина с использованием двух тест-систем: «гемоглобин– H_2O_2 –люминол» и «2,2'-азобис(2-метилпропионамидин)дигидрохлорид–люминол» в сравнении с дигидрохверцетином, аскорбиновой кислотой и тролоксом, а также оценили его влияние на проницаемость плоских липидных бислоевых мембран. Было показано, что пурпурагаллин обнаруживает умеренную антиоксидантную активность в системе гемоглобин– H_2O_2 –люминол, проявляя нейтрализующую способность в отношении гидрокил- и супероксид-анионов, сравнимую с аскорбиновой кислотой. Изученные нами соединения в этой системе могут быть ранжированы в соответствии с эффективностью их антиоксидантного действия: дигидрохверцетин > тролокс > аскорбиновая кислота > пурпурагаллин. Интересно, что в тестах на антиоксидантную активность в системе «2,2'-азобис(2-метилпропионамидин)дигидрохлорид–люминол» пурпурагаллин не проявил нейтрализующей активности в отношении пероксильных радикалов, образующихся в этой системе. Пурпурагаллин не вызывает значительных изменений в проницаемости плоских модельных липидных мембран в диапазоне доз от 1,5 до 30 мкМ, что указывает на практическое отсутствие у него первичного мембранотропного эффекта. Обсуждаются предполагаемые механизмы и особенности цитопротекторной, антиоксидантной и противовоспалительной активности пурпурагаллина.

Ключевые слова: пурпурагаллин, природные полифенолы, антиоксиданты, активные виды кислорода, противовоспалительная активность, цитопротекторы.

DOI: 10.1134/S0006302919040069

Пурпурагаллин (ППГ) - это красный пигмент с бензотропалоновой кольцевой структурой (рис. 1), который обладает широким спектром биологической активности, воздействуя на различные целевые рецепторы, а также метаболиче-

ские и сигнальные пути трансдукции, контролирующие, главным образом, противовоспалительную активность клетки [1].

Противовоспалительные свойства ППГ ярко продемонстрировал при ингибировании гиперпроницаемости эндотелиальных клеток, адгезии и миграции моноцитов, вызванных воздействием липополисахарида. При этом ППГ подавляет опосредованное липополисахаридом освобождение провоспалительного ядерного фактора-кВ (NF-кВ) и фактора некроза опухоли-α (TNF-α) из

Сокращения: ППГ – пурпурагаллин, NF-кВ – ядерный фактор-кВ, TNF-α – фактор некроза опухоли-α, ДГК – дигидрохверцетин, ААРН – 2,2'-азобис(2-метилпропионамидин)дигидрохлорид, Нб – гемоглобин, ЛМ – люминол, БЛМ – бислоевые липидные мембраны.

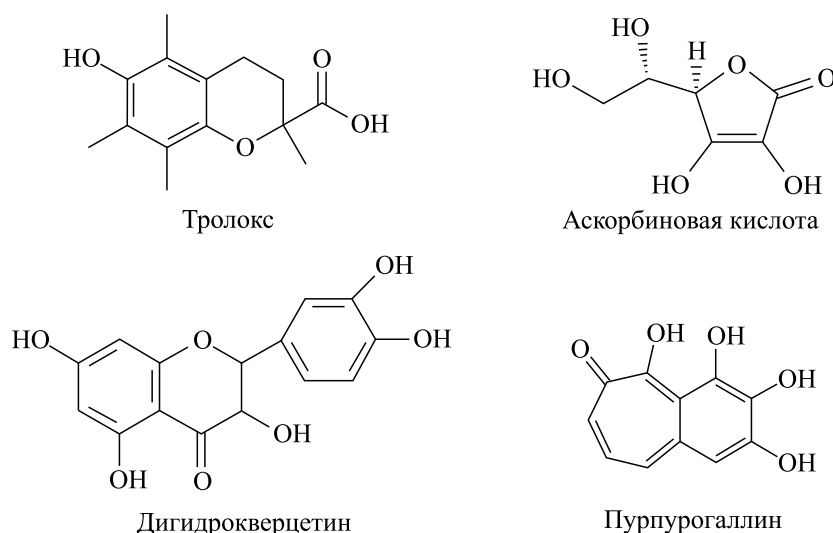


Рис. 1. Структурные формулы исследуемых веществ.

эндотелиальных клеток пупочной вены человека. Отмеченные эффекты в значительной степени коррелируют с ингибирующим действием ППГ на биосинтез молекул адгезии, опосредованный предварительным провоспалительным действием липополисахарида [2].

ППГ значительно ингибирует избыточную продукцию NO и простагландина PGE2 в микроглиальных клетках, вызванную введением липополисахарида, что связывают с повышенной ферментативной активностью NO-синтазы и циклооксигеназы 2 соответственно. Он также ослабляет синтез провоспалительных цитокинов, включая интерлейкин-1 и TNF- α , подавляя экспрессию мРНК этих белков. Молекулярные механизмы, лежащие в основе ослабления воспаления, опосредованного ППГ, тесно коррелируют с подавлением транслокации белковой субъединицы p65 NF- κ B в ядро и с деградацией его ингибитора (I κ B). Кроме того, ППГ обладает противовоспалительными свойствами, подавляя сигнальные пути фосфатидилинозитол-3-киназы/Akt и митоген-активированной протеинкиназы, и, тем самым, оказывает выраженный нейропротекторный эффект в активированной микроглии [3].

ППГ обладает высокой протективной активностью при воспалении сосудов, вызванном субарахноидальным кровоизлиянием. ППГ дозависимо снижает экспрессию генов цитокинового медиатора HMGB1, TNF- α и интерлейкина-6, принимающих активное участие в сосудистом воспалении [4]. Следовательно, ППГ можно рассматривать как кандидата в терапевтические агенты при различных системных воспалительных заболеваниях.

Особого внимания заслуживают данные о цитопротективном действии ППГ при окислитель-

ном стрессе, вызванном действием супероксид-анионов, продуцируемых ксантиноксидазой и гипоксантином, на выживаемость различных видов клеток (гепатоциты, миоциты желудочков, эндотелиальные клетки аорты крыс и почек) [5–7]. Он также защищает человеческие эритроциты от лизиса, вызываемого пероксильными радикалами [8].

Важно подчеркнуть, высокую ингибирующую активность ППГ в отношении различных ферментов, например ксантиноксидазы ($IC_{50} = 0,2$ мкМ), которая представляет собой флавопротеин железомолибдена, содержащий 2Fe-2S-кластер. Этот кластер опосредует транспорт электронов в пределах ксантиноксидазы, синтезирующей токсичные супероксид-анионы. Характерно, что активность ППГ была выше, чем у пирогаллола – селективного ингибитора этого фермента, обнаруженного в обжаренном кофе. При этом пирогаллол нестабилен и при физиологических условиях легко превращается в пурпурогаллин. Ингибирующая активность ППГ в отношении ксантиноксидазы была в восемь раз выше, чем у пирогаллола (1,6 мкмоль/л). Молекулярное моделирование путем докирования показывает, что ППГ имеет более сильное сродство к ксантиноксидазе, чем соответствующие пирогаллолы [9]. Можно заключить, что ППГ, активно действующий в качестве ингибитора ксантиноксидазы, является эффективным природным цитопротектором.

Тропоны, к которым относится ППГ, образуют хелатные комплексы с ионами металлов. Вполне вероятно, что отмеченные выше фармакологические эффекты частично базируются на присущим ППГ хелатирующим свойствам. Так, защитные свойства ППГ против токсического

действия перекиси водорода, вызывающей повреждение в ДНК и апоптоз в культуре Т-клеток человека, связаны с образованием редокс-неактивного комплекса с ионами железа [10].

Важным представляется также тот факт, что ППГ способен ингибировать синтез ДНК некоторых опухолевых клеток, т. е. является перспективным профилактическим противоопухолевым средством [8,11]. Этот бензотропалон находится на ранней стадии клинических исследований как специфический ингибитор поло-подобных серин-треониновых киназ (Plks), которые регулируют некоторые важные внутриклеточные процессы, включающие репликацию ДНК и митоз. P1k1 – наиболее хорошо изученный член этого семейства, который контролирует многочисленные этапы митоза, его повышенная экспрессия наблюдается при многих видах раковых заболеваний. В настоящее время проходят клинические исследования потенциальные противоопухолевые препараты: воласертиб – селективный ингибитор P1k1, используемый при острой миелоидной лейкемии, и ригосертиб – двойной ингибитор сигнальных путей P1k1/фосфоинозитид-3-киназы, применяемый при миелодисплазии [12–14].

Интересно, что ППГ обладает антитромботической активностью и может рассматриваться как антикоагулянт мягкого типа действия [15]. Однако механизмы отмеченных выше биологических активностей ППГ изучены недостаточно.

Учитывая широкий спектр биологической активности ППГ, упомянутый выше, и его фармакологические перспективы в качестве потенциального противовоспалительного и цитопротективного средства, целью данной работы явилось изучение антиоксидантных (свободнорадикальных) свойств ППГ в двух системах, а именно: гемоглобин–H₂O₂–люминол и 2,2 (2-метилпропионамидин)дигидрохлорид–люминол в сравнении с тролоксом, аскорбиновой кислотой и дигидрокверцетином (ДГК), а также оценка его мембранотропной активности с использованием модельных липидных мембран.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В работе использовали пурпурогаллин, полученный в лаборатории биотехнологии ТИБОХ ДВО РАН, согласно описанной ранее процедуре [16]. Также были использованы: 2,2'-азобис(2-метилпропионамидин)дигидрохлорид (ААРН), гемоглобин (Hb), которые были поставлены компанией Sigma-Aldrich (США), люминол (ЛМ), тролокс (Fluka, Швейцария); дигидрокверцетин (ОАО «Диод», Россия); КН₂РО₄, КОН, диметилсульфоксид («Химмед», Россия).

ППГ растворяли в минимальном объеме диметилсульфоксида, а затем доводили до исследуе-

мых концентраций фосфатным буферным раствором. Концентрация диметилсульфоксида в инкубационной среде не превышала 1% и не оказывала влияние на результаты измерений. Тролокс и дигидрокверцетин сначала растворяли в этаноле в концентрации 10 мМ, а затем полученный раствор разводили фосфатным буфером до концентрации 100 мкМ и использовали в работе. Все растворы готовили непосредственно перед экспериментом.

Антиоксидантные свойства ППГ изучали с помощью двух хемилюминесцентных модельных систем окисления – гомогенной системы, состоящей из гемоглобина, пероксида водорода и люминола (Hb–H₂O₂–ЛМ) и гомогенной системы, представляющей собой раствор азосоединения 2,2'-азобис(2-метилпропионамидин)дигидрохлорида и люминола (ААРН–ЛМ) [19].

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

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

Для измерения хемилюминесценции, сопровождающей окисление ЛМ в системе Hb–H₂O₂–ЛМ, в кювету хемилюминометра последовательно добавляли фосфатный буфер (50 мМ КН₂РО₄, 100 мкМ ЭДТА, рН 7,4) до конечного объема 5 мл, 0,3 мкМ Hb, 30 мкМ ЛМ и определенный объем исследуемого объекта. Инициирование окисления ЛМ осуществляли введением 90 мкМ пероксида водорода. Исследуемые вещества добавляли перед введением H₂O₂ [19,20].

Антиоксидантную активность ППГ и других препаратов в системе ААРН–люминол также определяли по окислению ЛМ, инициированному пероксильными радикалами (RO₂[•]), генерируемыми с постоянной скоростью, зависящей от температуры, водорастворимым азосоединением ААРН [11, 12]. Среда инкубации объемом 5 мл содержала: 5 мМ ААРН и 10 мкМ ЛМ в фосфатном буфере (50 мМ КН₂РО₄, 100 мкМ ЭДТА, рН 7,4). Измерение хемилюминесценции проводили следующим образом. В среду инкубации, содержащую ЛМ в фосфатном буфере, при постоянном перемешивании и температуре 37°С вводили ААРН и измеряли контрольную хемилюминограмму. Далее измеряли кинетику хемилюминесценции в присутствии исследуемых веществ, которые добавляли в среду инкубации перед вводом ААРН.

На полученных кинетических кривых 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, дигидрохверцитина, аскорбиновой кислоты и ППГ (t).

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

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

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:

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

где t/t_0 – изменение латентного периода хемилюминесценции; K_X – константа изменения латентного периода для исследуемого вещества; C_X – концентрация исследуемого вещества.

Все исследованные препараты демонстрировали хорошую линейную зависимость согласно полученному уравнению (2) (коэффициент линейной корреляции 0,98–0,99). В этом случае можно записать:

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

Используя уравнение (3) и рассчитанные по линейным уравнениям значения констант K_X и K_T , определяли величину антиоксидантной активности 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.

Действие ППГ на электрическую проводимость плоских бислоев липидных мембран (БЛМ) оценивали традиционно по методу Мюллера и соавторов путем впрыскивания мембранного раствора в область отверстия площадью $\sim 1 \text{ мм}^2$ в стенке фторопластовой кюветы. Для формирования БЛМ использовали раствор азолектина в декане (25±30 мг/мл). Процесс образования липидного бислоя наблюдали в отраженном свете при помощи бинокулярного микроскопа МБС-1. Измерение электропроводности БЛМ проводили методом сравнения падения напряжения на эталонном сопротивлении и суммарном сопротивлении эталона и БЛМ. Входной регистр электрометра содержал набор сопротивлений от

10^7 до 10^9 Ом, что обеспечивало большую точность измерения. Стандартное измерительное напряжение равнялось 50 мВ. Величину электропроводности рассчитывали по следующей формуле:

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

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 [$\text{Ом}^{-1} \cdot \text{см}^{-2}$ $\text{См} \cdot \text{см}^{-2}$], где G_M – интегральная проводимость мембраны, S_M – площадь мембраны.

Измерение электропроводности БЛМ проводили в растворе незабуференного 0,1 М водного раствора хлорида калия при комнатной температуре. Концентрация соли по обе стороны от мембраны была одинаковой. ППГ растворяли в воде.

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

Для исследования антиоксидантной активности ППГ мы использовали два теста – систему $\text{Hb}-\text{H}_2\text{O}_2$ и систему, содержащую азоинициаторы (нестабильные соединения, спонтанно разрушающиеся с образованием свободных радикалов). Количественной мерой антиоксидантной активности является длительность периода, в течение которого ХЛ была снижена в результате присутствия антиоксиданта в реакционной среде. Необходимость использования двух экспериментальных подходов – системы $\text{Hb}-\text{H}_2\text{O}_2$ и системы, содержащей азоинициаторы, была продиктована желанием исследовать радикал-перехватывающую активность исследованных соединений в отношении двух типов радикалов – гидроксил-анионов, образующихся в системе $\text{Hb}-\text{H}_2\text{O}_2$, и алкилперекисных радикалов, образующихся в системе, которая содержит азоинициаторы. Количественная мера антиоксидантной активности представляет собой продолжительность периода, в течение которого хемилюминесценция снижалась в результате присутствия антиоксиданта в реакционной среде, то есть продолжительности периода запаздывания [17,18].

Как было показано ранее [17,18], при регистрации кинетики хемилюминесценции в мо-

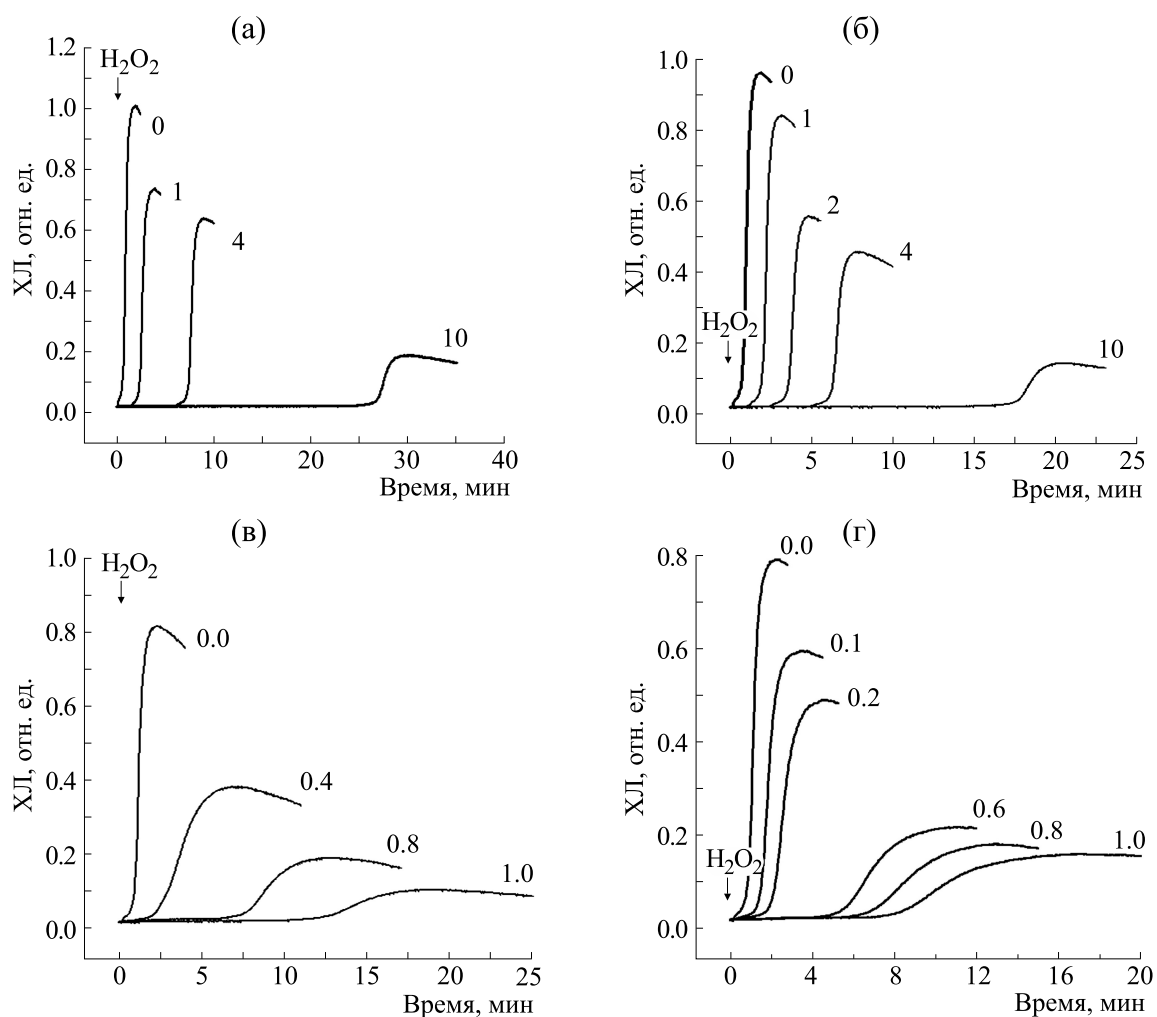


Рис. 2. Кинетики хемилюминесценции системы Nb–H₂O₂–ЛМ в присутствии тролокса (а), аскорбиновой кислоты (б), дигидрокверцетина (в) и пурпурогаллина (г). Цифры у кривых – концентрация тролокса, аскорбиновой кислоты и дигидрокверцетина в мкМ, пурпурогаллина в мкг/мл. По оси абсцисс – время, по оси ординат – интенсивность хемилюминесценции.

дельной системе Nb–H₂O₂–ЛМ без исследуемых препаратов (контроль) примерно через 1 мин после добавления H₂O₂ в реакционную среду, содержащую гемоглобин и ЛМ, развивается свечение хемилюминесценции, которое достигает предельных значений на третьей минуте и далее постепенно уменьшается.

На рис. 2 представлена кинетика хемилюминесценции системы Nb–H₂O₂–ЛМ без исследуемых веществ и в присутствии тролокса, аскорбиновой кислоты, дигидрокверцетина и пурпурогаллина.

В качестве измеряемых параметров были выбраны максимальная интенсивность свечения (амплитуда хемилюминесценции) и время с момента введения H₂O₂ в начале развития свечения (латентный период). Введение в среду различных доз исследуемых веществ изменяет амплитуду и

увеличивает латентный период, но не в одинаковой степени.

На рис. 3 представлены расчетные данные о влиянии тролокса, аскорбиновой кислоты, дигидрокверцетина и пурпурогаллина на амплитуду и латентный период хемилюминесценции в модельной системе Nb–H₂O₂–ЛМ [18].

Инициатор окисления в данной модельной системе предположительно появляется в виде феррильных радикалов Nb или гидроксильных радикалов, образующихся при взаимодействии Nb и перекиси водорода. Окисление ЛМ сопровождается образованием радикала ЛМ и в конечном итоге приводит к образованию возбужденного продукта окисления, который переходит в основное состояние с испусканием кванта хемилюминесцентного света. Количество изолированных квантов света пропорционально коли-

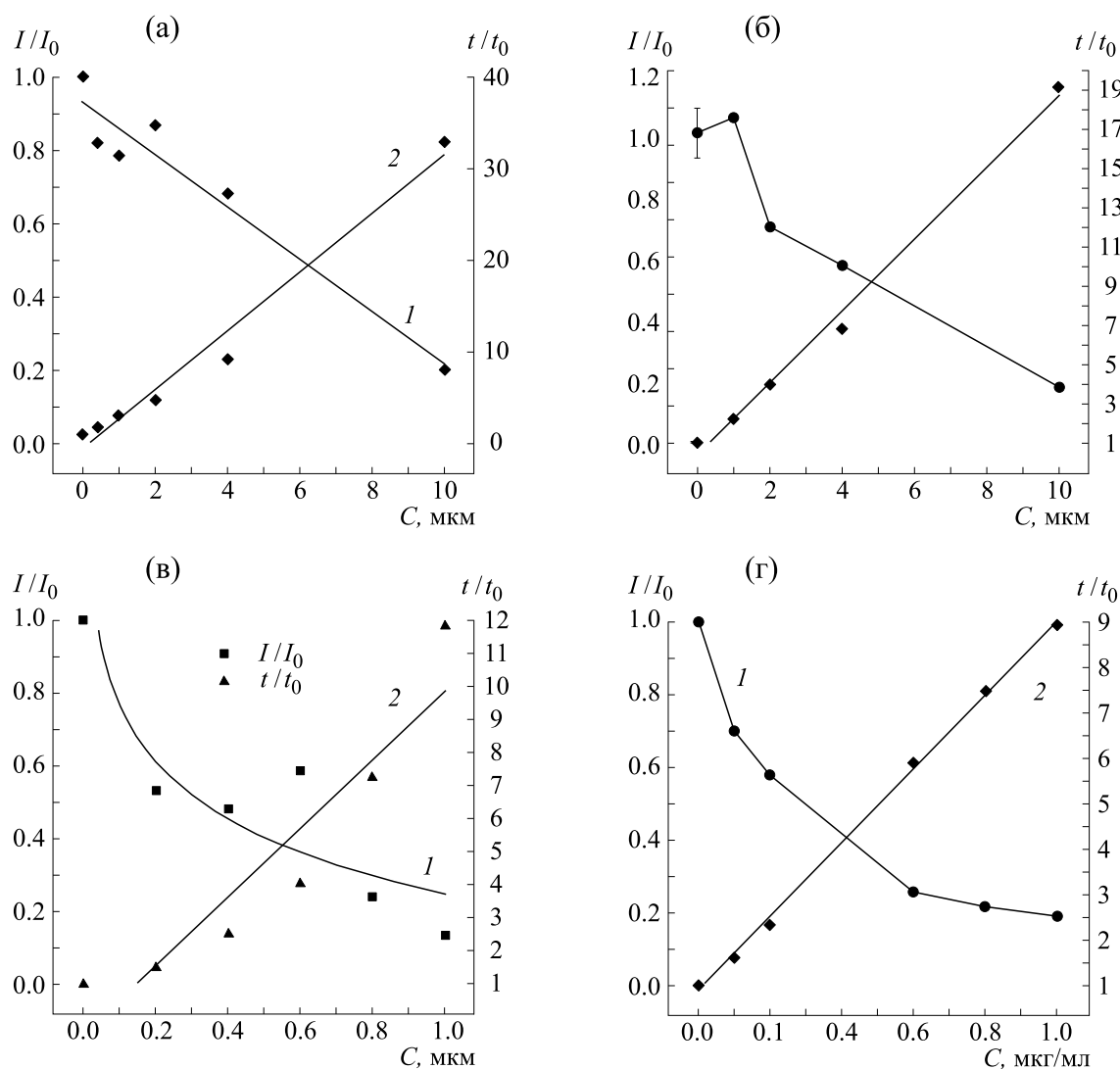


Рис. 3. Влияние тролокса (а), аскорбиновой кислоты (б), дигидрокверцетина (в) и пурпуругаллина (г) на амплитуду (кривая 1) и латентный период (кривая 2) хемилюминесценции в системе Нб–Н₂О₂–ЛМ. По оси абсцисс – концентрация тролокса, аскорбиновой кислоты и дигидрокверцетина в мкМ, пурпуругаллина в мкг/мл. По оси ординат слева – изменение амплитуды хемилюминесценции, справа – изменение латентного периода хемилюминесценции. Приведенные величины статистически достоверны при $p < 0,05$.

честву образующегося конечного продукта окисления и, следовательно, представляет собой меру окисленности ЛМ. Добавление в данную модельную систему веществ, способных затруднить окисление ЛМ (антиоксидантов), приводит к уменьшению количества световых квантов. Измеряя интенсивность хемилюминесценции в системе Нб–Н₂О₂–ЛМ в присутствии и отсутствии данного вещества, можно таким образом исследовать антиоксидантные свойства этого вещества [17].

Измеряя кинетику интенсивности хемилюминесценции в системе Нб–Н₂О₂–ЛМ в присутствии ППГ, аскорбиновой кислоты, ДГК и тролокса, мы провели сравнительный расчет их ан-

тиоксидантных свойств. Результаты исследования антиоксидантной активности ППГ по сравнению с ДГК и тролоксом в системе гемоглобин–Н₂О₂ приведены на рис. 2 и 3 и в таблице.

Антиоксидантную активность соединения измеряли как отношение концентрации тролокса к концентрации исследуемого соединения в модельной системе: $AOA = K_X/K_T$, где K_X – константа изменения латентного периода для исследуемых веществ, а K_T является константой изменения латентного периода для тролокса. Значения, приведенные в таблице, отражают данные трех независимых экспериментов и статистически значимы при $p < 0,05$.

Таблица 1. Антиоксидантная активность изучаемых веществ в двух модельных системах

Исследуемые соединения	Модельная система Нb–Н ₂ О ₂ –ЛМ		Модельная система ААРН–ЛМ	
	$K_X, \mu\text{M}^{-1}$	антиоксидантная активность, U	$K_X, \mu\text{M}^{-1}$	антиоксидантная активность, U
Тролокс	$3.20 \pm 0.30 (K_T)$	1.00	$1.76 \pm 0.09 (K_T)$	1.00
ДГК	$10.40 \pm 0.85^*$	3.25	$5.30 \pm 0.25^*$	3.01
Аскорбиновая кислота	$1.84 \pm 0.08^*$	0.58	—	—
ППГ	$1.81 \pm 0.07^*$	0.57	#	#

Примечание. * Отмечены статистически значимые результаты относительно тролокса; # – показатели нельзя подсчитать, так как в присутствии разных концентраций ППГ латентный период на кривых не был зарегистрирован; — – данные отсутствуют.

На рис. 2 показаны кинетические кривые хемилюминесценции в системе Нb–Н₂О₂ в присутствии различных концентраций ППГ (от 0,1 до 1,0 мкМ), ДГК и тролокса. Можно видеть, что по мере увеличения концентрации ППГ увеличивается продолжительность латентного периода. Кривые на рис. 3 показывают зависимость амплитуды хемилюминесценции и длительности латентного периода от концентрации ППГ. В левой части таблицы представлены значения констант тушения хемилюминесценции в модельной системе Нb–Н₂О₂–ЛМ, которые показывают, что ППГ проявляет умеренные антиоксидантные свойства, сравнимые с аскорбиновой кислотой. Однако активность ДГК и тролокса в этой системе соответственно примерно в пять и два раза выше, чем у ППГ.

Таким образом, можно сделать вывод, что в этой модельной системе ППГ обладает умеренной прямой антиоксидантной активностью и эффективно нейтрализует реактивные виды кислорода, уступая, однако, ДГК. Ранее было также отмечено [9], что ППГ является сильным ингибитором ксантиноксидазы, которая продуцирует супероксид-анион. Можно предположить, что отмеченная нами прямая нейтрализующая активность ППГ в отношении супероксид-анионов и гидроксил-анионов вносит большой

вклад в зарегистрированный ранее цитопротективный эффект ППГ [18].

В качестве второй модельной системы для исследования антиоксидантных свойств исследуемых материалов мы использовали водную гомогенную систему на основе раствора азосоединения 2,2'-азобис(2-метилпропионамидин)дигидрохлорида и люминола (ААРН–ЛМ). При нагревании молекулы ААРН подвергаются термическому разложению при 37°C, распадаясь на два пероксильных радикала. Взаимодействие этих радикалов с ЛМ приводит к его окислению, сопровождаемому хемилюминесценцией. При введении в систему перехватчика радикалов в системе создается конкуренция между радикалом ЛМ и перехватчиком, что сопровождается гашением хемилюминесценции и появлением так называемого латентного периода. Продолжительность латентного периода определяется временем, в течение которого антиоксидант расходуется в реакции с пероксильными радикалами и служит мерой антиоксидантной активности вещества [17].

На рис. 4 представлена кинетика хемилюминесценции данной модельной системы. Видно, что характер кривых имеет тот же вид, что и в системе Нb–Н₂О₂–ЛМ. В качестве измеряемых параметров были выбраны максимальная интенсивность свечения (амплитуда хемилюминесцен-

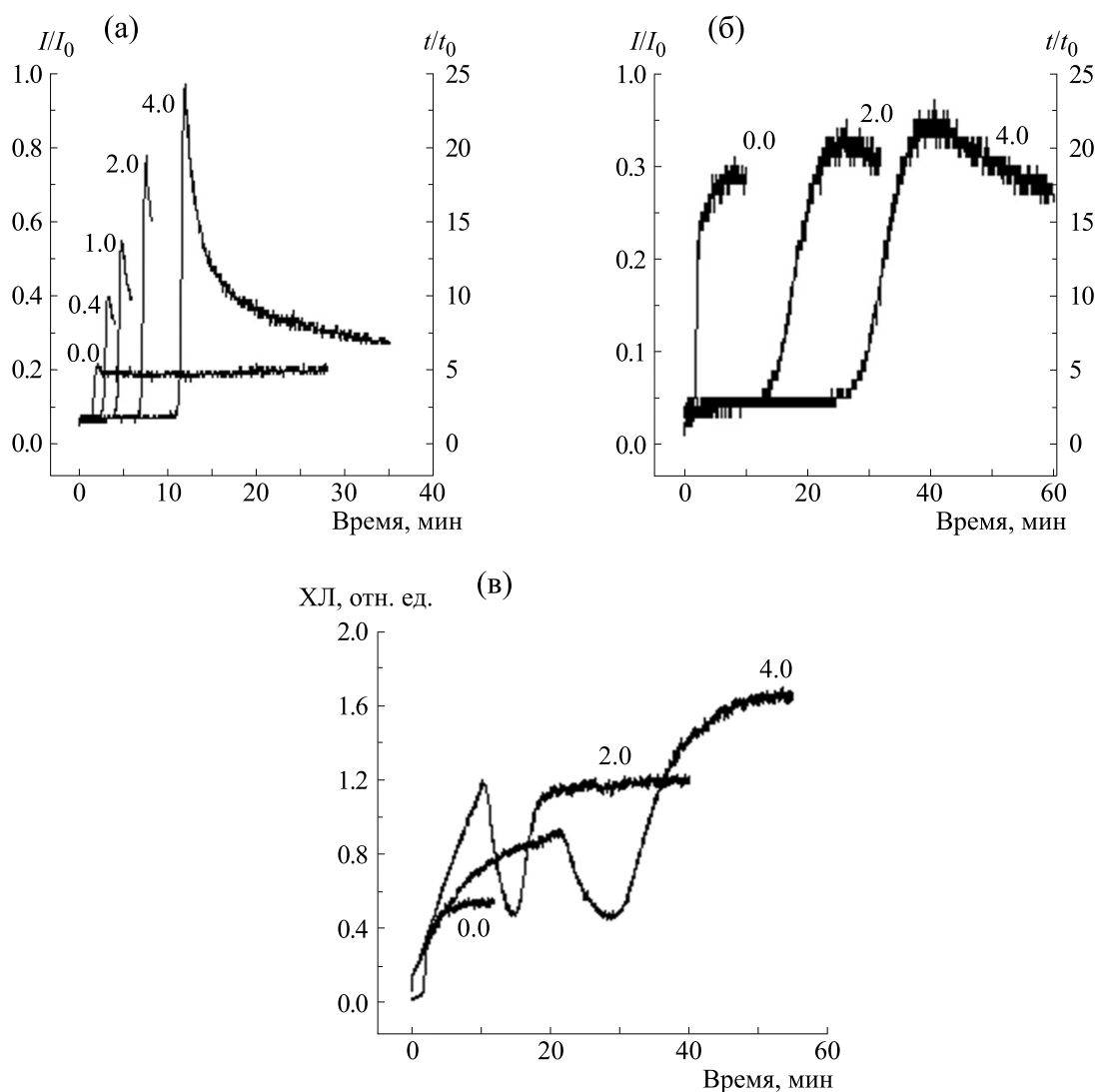


Рис. 4. Кинетики хемилюминесценции системы ААРН—люминол в присутствии тролокса (а), дигидрокверцетина (б) и пурпурогаллина (в). Цифры у кривых — концентрация тролокса, аскорбиновой кислоты и дигидрокверцетина в μM , пурпурогаллина в $\mu\text{g}/\text{ml}$. По оси абсцисс — время, по оси ординат — интенсивность хемилюминесценции в отн. ед.

ции) и время с момента введения ААРН в начало развития свечения (латентный период).

При использовании модельной системы ААРН-ЛМ было обнаружено, что введение в систему ППГ даже при высоких дозах (рис. 4в) не приводит к дозозависимому увеличению продолжительности латентного периода, в отличие от ДГК и тролокса (рис. 4а, 4б).

Как видно из данных, представленных на рис. 4 и в таблице, ППГ в широком диапазоне концентраций не проявляет антиоксидантной активность в системе ААРН—ЛМ (латентный период отсутствует). По этой причине расчетные данные о антиоксидантной активности ППГ в системе ААРН—ЛМ во второй части таблицы не приведены.

Таким образом, отмеченная в данной работе специфичность антиоксидантного действия у ППГ, а именно умеренная скевенжеро-вая активность в отношении супероксид- и гидроксил-анионов при отсутствии нейтрализующей активности в отношении пероксильных радикалов (рис. 4, таблица), является важной особенностью данного соединения.

На рис. 5 показано действие ППГ на электропроводность БЛМ в зависимости от его концентрации в растворе. Анализ данного рисунка указывает на то, что ППГ вызывает стократное увеличение электропроводности БЛМ только при очень высоких концентрациях (порядка $1,0 \cdot 10^{-4}$ М). Данный эффект также нельзя рассматривать как спе-

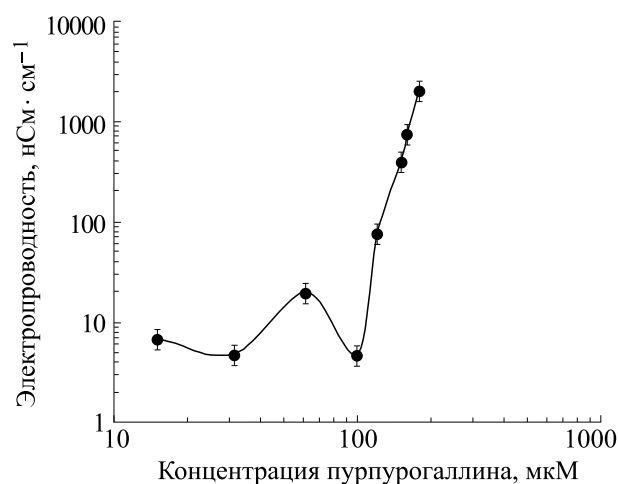


Рис. 5. Электропроводность мембран в зависимости от концентрации пурпурогаллина в растворе.

цифическое действие вещества на ионную проницаемость БЛМ.

Таким образом, исследование первичного мембранотропного действия ППГ, индикатором которого явилось измерение ионной проницаемости плоских БЛМ, показало, что значимого прямого влияния на липидный бислой этот природный бензотропалон в физиологически значимых концентрациях не оказывает. Эффекты, наблюдаемые при высоких концентрациях данного вещества, по-видимому, связаны с его избыточной адсорбцией в липидном бислое. Можно предположить, что при физиологических концентрациях ППГ, очевидно, не является первичным мембранотропным агентом, который изменяет параметры проницаемости липидного бислоя как модельных, так и биологических мембран.

В заключение следует подчеркнуть, что ППГ обладает широким спектром биологической активности, воздействуя на различные целевые рецепторы, а также метаболические и сигнальные пути трансдукции, контролирующие, главным образом, противовоспалительную и антиоксидантную активность клетки. Мы считаем, что в основе противовоспалительной и антиоксидантной активности ППГ лежат его ярко выраженная хелатирующая способность в отношении ионов железа и умеренная прямая нейтрализующая способность в отношении токсичных супероксидных и гидроксильных радикалов. В связи с этим данный агент имеет большие перспективы терапевтического применения для профилактики и лечения патофизиологических состояний, связанных с воспалением и окислительным стрессом. ППГ находится на ранней стадии фармакологических исследований как эффективный цитопротектор и

специфический антиоксидант, обладающий высокой противовоспалительной активностью.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. K. Cheng., X. Wang, S. Zhang, and H. Yin, *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **51** (49), 12246 (2012).
2. T. H. Kim, S. K. Ku, I. C. Lee, and J. S. Bae, *BMB Rep.* **45** (3), 200 (2012).
3. H. Y. Park, T. H. Kim, C. G. Kim, et al., *Int. J. Mol. Med.* **32** (5):1171 (2013).
4. C. Z. Chang, C. L. Lin, S. C. Wu, and A. L. Kwan, *Int. J. Vasc. Med.* **2014**, 254 (2014).
5. L. H. Zeng and T. W. Wu, *Biochem. Cell Biol.* **70** (8), 684 (1992).
6. T. W. Wu, J. Wu, D. Carey, and L. H. Zeng, *Biochem. Cell Biol.* **70** (9):803 (1992).
7. T. W. Wu, L. H. Zeng, J. Wu, and D. Carey, *Biochem. Cell Biol.* **69** (10–11), 747 (1991).
8. H. Sugiyama, K. P. Fung, and T. W. Wu, *Life Sci.* 1993;53(4):PL39-43.
9. S. Honda, Y. Fukuyama, H. Nishiwaki, et al., *Free Radic. Biol. Med.* **106**, 228 (2017).
10. P. T. Doulias, L. Nouis, B. Z. Zhu, et al., *Free Radic. Res.* **39** (2), 125 (2005).
11. K. P. Fung, et al., *Chemotherapy* **42**, 199 (1996).
12. C. Liao, J. E. Park, J. K. Bang, et al., *ACS Med. Chem. Lett.* **1** (3), 110 (2010).
13. X. Liu, *Transl. Oncol.* **8** (3), 185 (2015).
14. S. K. Ku and J. S. Bae, *BMB Rep.* **47** (7), 376 (2014).
15. S. Y. Sheu, et al., *Anticancer Res.* **8** (1A), 263 (1998).
16. K. Miyazaki, S. Arai, T. Iwamoto, et al., *Exp. Med.* **203**, 319 (2004).
17. A. M. Popov, A. N. Osipov, E. A. Korepanova, et al., *Biophysics* **58** (5), 607 (2013).
18. A. M. Popov, A. N. Osipov, E. A. Korepanova, et al., *Biophysics* **60** (4), 574 (2015).

Antioxidant and Membrane Activity of the Benzotropalone Pigment Purpurogallin

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

*G.B. Elyakov Pacific Institute of Bioorganic Chemistry, Far Eastern Branch of the Russian Academy of Sciences, prosp. 100 let Vladivostoku 159, Vladivostok, 690022 Russia

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

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

The phenolic compound purpurogallin, found in oak nutgalls, is a red pigment with a benzotropalone ring structure. Purpurogallin shows pronounced cytoprotective and anti-inflammatory activities. This compound is considered to be effective in preventing and treating diverse inflammatory systemic diseases, affecting functional activities of various cellular metabolic and signaling pathways that are associated with inflammation. This study was targeted toward a comparative investigation of antioxidant (free radical) properties of purpurogallin and dihydroquercetin, ascorbic acid and trolox by using two test systems: hemoglobin–H₂O₂–luminol and 2,2'-azobis(2-methylpropionamidine)dihydrochloride–luminol. Also, the effect of purpurogallin on the permeability of flat lipid bilayer membranes was evaluated. It has been shown that purpurogallin demonstrates moderate antioxidant activity in the hemoglobin–H₂O₂–luminol system, exhibiting neutralizing potency relative to hydroxyl and superoxide anions, that is comparable to ascorbic acid. The compounds studied in this system can be ranked according to the effectiveness of their antioxidant action: dihydroquercetin > trolox > ascorbic acid > purpurogallin. Interestingly, that when antioxidant activities were determined in the 2,2'-azobis(2-methylpropionamidine)dihydrochloride–luminol system, purpurogallin showed no neutralizing activity in regard to peroxy radicals formed in this system. Purpurogallin does not cause significant changes in the permeability of flat bilayer lipid membranes in the dose range from 1.5 to 30 μM, that indicates the absence of a primary membrane effect in it. The proposed mechanisms and characteristics of cytoprotective, antioxidant and anti-inflammatory activities of purpurogallin are under discussion.

Keywords: purpurogallin, natural polyphenols, antioxidants, reactive oxygen species, anti-inflammatory activity, cytoprotectant