# ПРОТИВОБЛАСТОМНЫЕ СРЕДСТВА

## АНТИПРОЛИФЕРАТИВНАЯ И АНТИОКСИДАНТНАЯ АКТИВНОСТЬ НОВЫХ ПРОИЗВОДНЫХ ДИГИДРОКВЕРЦЕТИНА

**В. С. Роговский[1], А. И. Матюшин[1], Н. Л. Шимановский[1], А. В. Семейкин[1], Т. С. Кухарева[2], А. М. Коротеев[2], М. П. Коротеев[2], Э. Е. Нифантьев[2]**

Исследовано влияние новых производных дигидрокверцетина на жизнеспособность культивируемых нормальных и опухолевых клеток, проведена оценка их антиоксидантной активности и взаимосвязи полученных эффектов с химическим строением. Среди 9 производных дигидрокверцетина наибольшей антипролиферативной активностью на модели культуры фибробластов крыс обладают соединения КН-2, КН-4, КН-7, КН-8, на модели культуры клеток MCF-7 (рак молочной железы человека) — КН-7 и КН-8. Наибольшей антиоксидантной активностью обладает нативный дигидрокверцетин и соединение КН-8. Наблюдается значительная корреляция (коэффициент корреляции 0,93) между антипролиферативными эффектами производных дигидрокверцетина в отношении фибробластов кожи мышей и клеток MCF-7 (рак молочной железы человека).

**Ключевые слова**: дигидрокверцетин, таксифолин, кверцетины, антиоксиданты, антипролиферативная активность, перекисное окисление липидов

## ВВЕДЕНИЕ

Дигидрокверцетин (таксифолин) — биофлавоноид, обладающий широким спектром фармакологических эффектов, среди которых особый интерес представляет его противоопухолевое, ангиопротекторное и противовоспалительное действие [6, 13]. В отличие от кверцетина [11], дигидрокверцетин (ДГК), не обладает генотоксичностью и не вызывает повреждения ДНК в экспериментах *in vivo* [4]. Более того, у дигидрокверцетина обнаружен антимутагенный эффект [12]. Дигидрокверцетин является антиоксидантом, что проявляется в его способности уменьшать количество свободных радикалов, продуцируемых в процессах перекисного окисления липидов (ПОЛ) [2, 4, 8, 9].

В последние годы на кафедре органической химии МПГУ синтезирован ряд новых производных дигидрокверцетина (ПДГК) [7], фармакологическая активность которых мало изучена. Целью данной работы явилось исследование влияния новых производных дигидрокверцетина на жизнеспособность культивируемых нормальных и опухолевых клеток, оценка антиоксидантной активности соединений и взаимосвязи полученных эффектов с их химическим строением.

[1] Кафедра молекулярной фармакологии и радиобиологии медико-биологического факультета (зав. — чл.-корр. РАМН, Н. Л. Шимановский) Российский государственный медицинский университет, Москва, 119021, ул. Большая Пироговская, 9а.

[2] Кафедра органической химии (зав. — чл.-корр. РАН Э. Е. Нифантьев) Московский педагогический государственный университет.

## МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Исследование влияния производных дигидрокверцетина на жизнеспособность нормальных и опухолевых клеток проводили на культуре фибробластов кожи новорожденных крысят и культуре клеток MCF-7 (рак молочной железы человека), полученной из банка клеток НИИ вирусологии им. Д. И. Ивановского в среде инкубации DMEM. После образования клеточного монослоя проводили трипсинизацию и в 96-луночные планшеты вносили суспензию клеток.

Исследовано 9 производных дигидрокверцетина под шифрами КН-(1 – 9). Исходные растворы готовили, растворяя по 20 мг каждого соединения в 0,2 мл ДМСО. Дальнейшие разведения до конечных концентраций 1; 0,1; 0,01 мг/мл готовили на среде инкубации. Максимальная концентрация растворителя ДМСО в среде составила 1 % (при внесении 1 мг/мл образца) и не влияла достоверно на жизнеспособность клеток. В водной среде наблюдалось образование осадка. Наиболее выраженным он был у образцов КН-5 и КН-9. Образец КН-8 давал синее окрашивание, что в максимальной концентрации могло повысить оптическую плотность, так как образующийся в ходе эксперимента раствор формазана имеет сходную окраску.

Инкубировали планшеты в течение 48 ч. По окончании инкубации действие препаратов на клеточный рост определяли микрокалориметрическим методом при помощи МТТ-теста, который является стандартным для оценки токсичности соединений в культуре [9].

Полученные результаты представляли в виде средних значений 4-х измерений оптической плотности (в

Таблица 1. **Химические названия исследуемых производных дигидрокверцетина (ДГК)**

| Код | Химическое название |
|---|---|
| КН-1 | 3,3’, 4’,7-тетра-О-ацетил-2,3-ДГК |
| КН-2 | 3,3’, 4’,5,7-пента-О-ацетил-2,3-ДГК |
| КН-3 | 3,3’, 4’,5,7-пента-О-бензоил-2,3-ДГК |
| КН-4 | 3,3’, 4’,5,7-пента-О-(4’’-нитробензоил)-2,3-ДГК |
| КН-5 | 3,3’, 4’,5,7-пента-О-[1’’-(4’’-изобутилфенил)пропионил]-2,3-ДГК |
| КН-6 | 3,3’, 4’,5,7-пента-О-ацетилсалицил-2,3-ДГК |
| КН-7 | 3,3’, 4’,5,7-пента-О-никотиноил-2,3-ДГК |
| КН-8 | 3,3’, 4’,5,7-пента-О-никотиноилгидрохлорид-2,3-ДГК |
| КН-9 | 3’, 4’,5,7-тетра-О-бензил-2,3-ДГК |

условных единицах). Вычисляли также процент жизнеспособности культур от соответствующего контроля (среда инкубации), принимаемого за 100 %. Данные округляли до целых значений. Погрешность метода составила 15 %.

Для изучения антиоксидантной активности производных дигидрокверцетина использовали метод хемилюминесценции на модели гомогената мозга крысы [5, 6]. Для индукции ПОЛ в систему добавляли ионы двухвалентного железа ($Fe^{2+}$), что инициировало процесс ПОЛ, сопровождаемый хемилюминесценцией.

Суспензию мозга крыс готовили в соотношении 1:9 (мозг:фосфатный буфер). Производные дигидрокверцетина вводили в виде раствора в диметилсульфоксиде (ДМСО) или в дистиллированной воде.

Химические названия и формулы исследуемых соединений представлены в табл. 1.

Статистический анализ полученных данных проводили с помощью программы Statistica 6. Рассчитывали парные коэффициенты корреляций Спирмена между антипролиферативной и антиоксидантной активностью изучаемых соединений.

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Исследование влияния производных дигидрокверцетина на жизнеспособность клеток показало наличие зависимости эффекта от концентрации исследуемого соединения и его химического строения. Среди исследованных соединений наибольшей активностью обладают представленные в табл. 2 и 3 соединения КН-2, КН-4, КН-6, КН-7 и КН-8.

Таблица 2. **Влияние производных дигидрокверцетина на жизнеспособность клеток MCF-7**

| *C*, мг/мл | Исследуемые соединения | | | | |
|---|---|---|---|---|---|
| | КН-2 | КН-4 | КН-6 | КН-7 | КН-8 |
| 1,0 | 35 %* | 40 %* | 65 %* | 14 %* | 12 %* |
| 0,1 | 62 %* | 91 % | 90 % | 98 % | 100 % |
| 0,01 | 101 % | 96 % | 105 % | 97 % | 140 %* |

**Примечание**. Здесь и в табл. 3: С — концентрация; % — процент жизнеспособных клеток;* – достоверные отличия от контроля (100 %).

Таблица 3. **Влияние производных дигидрокверцетина на жизнеспособность фибробластов кожи крыс**

| *C*, мг/мл | Исследуемые соединения | | | | |
|---|---|---|---|---|---|
| | КН-2 | КН-4 | КН-6 | КН-7 | КН-8 |
| 1,0 | 19 %* | 26 %* | 70 % | 22 %* | 17 %* |
| 0,1 | 63 % | 85 % | 98 % | 88 % | 90 % |
| 0,01 | 90 % | 110 % | 102 % | 104 % | 122 %* |

Как следует из табл. 2 наиболее выраженное цитостатическое действие в концентрации 1 мг/мл проявляют соединения КН-7 и КН-8. В меньшей концентрации 0,01 мг/мл соединение КН-8, напротив, оказывает достоверное стимулирующее влияние на жизнеспособность клеток MCF-7.

В следующей серии экспериментов нами исследовано влияние производных дигидрокверцетина на жизнеспособность фибробластов кожи крыс (табл. 3).

Из табл. 3 видно, что наблюдается определенный параллелизм в угнетающем действии производных дигидрокверцетина на жизнеспособность фибробластов кожи крыс и жизнеспособность клеток MCF-7 рака молочной железы. Как и в случае с клетками MCF-7 соединение КН-8 в концентрации 0,01 мг/мл оказывает стимулирующее влияние на жизнеспособность фибробластов кожи.

Следует отметить, что значительное угнетающее влияние на жизнеспособность клеток в культуре соединения КН-2, КН-4, КН-7, КН-8 проявляли в высокой концентрации (1 мг/мл). При внесении веществ в такой концентрации в среду инкубации наблюдается выпадение осадка исследуемых соединений и токсичность может быть следствием непосредственного контакта веществ с клетками.

Исследование антиоксидантной активности производных дигидрокверцетина на модели $Fe^{2+}$-индуцированной хемилюминесценции показало, что изученные соединения неоднозначно влияют на процессы перекисного окисления липидов в гомогенате мозга крыс.

Как следует из данных, представленных в табл. 4, производные дигидрокверцетина КН-1, КН-7, КН-8 обладают значительной способностью ингибировать процесс $Fe^{2+}$-индуцированной хемилюминесценции в суспензии мозга крыс. Наибольшей ингибирующей активностью обладают ДГК и соединение КН-8, которые в концентрации $10^{-4}$ М уменьшают амплитуду медленной вспышки на 100 %. КН-1 уменьшает амплитуду медленной вспышки на 70 %, КН-2 на 26 %, КН-3 на 13 %, КН-4 на 20 %, КН-7 на 60 %, КН-9 на 27 %. КН-5 в используемом растворителе (ДМСО) не растворился.

В табл. 5 приведены сравнительные данные по расчету АОА для ДГК и соединения КН-8.

Как следует из табл. 5 антиоксидантная активность производного дигидрокверцетина КН-8 превосходит

Таблица 4. **Влияние производных дигидрокверцетина на амплитуду медленной вспышки кривой $Fe^{2+}$-индуцированной хемилюминесценции гомогената мозга крыс (% по отношению к контролю); растворитель — ДМСО**

| Группа | Н |
|---|---|
| Контроль | 0 |
| ДГК | 100 |
| КН-1 | 70 ± 1 |
| КН-2 | 26 ± 3 |
| КН-3 | 13 ± 8 |
| КН-4 | 20 ± 9 |
| КН-5 | В ДМСО не растворился |
| КН-6 | 9 ± 5 |
| КН-7 | 60 ± 5 |
| КН-8 | 100 |
| КН-9 | 27 ± 12 |

**Примечание**. Н — амплитуда медленной вспышки хемилюминесценции; концентрация производных дигидрокверцетина $10^{-4}$ М.

антиоксидантную активность исходного соединения - дигидрокверцетина.

Для выявления возможной взаимосвязи между антиоксидантной и антипролиферативной активностью исследуемых соединений были рассчитаны коэффициенты парной корреляции Спирмена.

Как следует из табл. 6 коэффициент корреляции между антипролиферативной активностью производных дигидрокверцетина по отношению к клеткам MCF-7 и фибробластам составил 0,93, что статистически достоверно свидетельствует о значительной корреляции между антипролиферативными эффектами изучаемых веществ в отношении данных видов клеток.

Коэффициенты корреляции между антипролиферативной и антиоксидантной активностью производных дигидрокверцетина составили 0,08 и 0,26, что свидетельствует об отсутствии корреляции между данными эффектами. Однако стоит отметить, что отдельные соединения (например, КН-8) обладают как выраженной антиоксидантной, так и антипролиферативной активностью. Подобные соединения могут представлять наибольший интерес для дальнейшего изучения в качестве противоопухолевых средств.

Значительный интерес представляет оценка взаимосвязи между антиоксидантной активностью изученных соединений и их химической структурой.

Производные дигидрокверцетина по структуре представляют систему фенольных остатков, связанных с различными заместителями. Фенольное кольцо, благодаря системе сопряженных двойных связей, легко передает электроны свободным радикалам, превращаясь при этом в феноксирадикал, который является достаточно стабильным и в дальнейшем продолжении цепи не участвует. Известно, что значительной антиоксидантной активностью обладают пространственно-затрудненные фенолы (ПЗФ), реагирующие в

Таблица 5. **Антиоксидантная активность (АОА) дигидрокверцетина и КН-8**

| Соединение | АОА ($M^{-1}$) |
|---|---|
| ДГК в ДМСО | $0{,}4 \cdot 10^5$ |
| КН-8 в ДМСО | $1{,}0 \cdot 10^5$ |

основном с радикалами $ROO^{\bullet}$ и прерывающие цепь окисления.

Определяющим для антиоксидантной активности фактором в структуре фенолов является строение О-алкильных заместителей или О-ацильных радикалов, а также характер пара-заместителя. Введение в пара-положение ПЗФ электронодонорных заместителей увеличивает их АОА, в то время как введение электроноакцепторных заместителей — уменьшает.

Исходя из рассмотрения соответствия химической структуры ПДГК их антиоксидантной активности, можно высказать ряд предположений. По-видимому, антиоксидантная активность изученных производных дигидрокверцетина связана с наличием в их структуре центров повышенной электронной плотности. Повышенная электронная плотность может возникать вследствие наличия как электронодонорных групп (в этом случае они еще больше увеличивают электронную плотность в системе фенольных колец), так и электроноакцепторных групп (смещают электронную плотность от фенольного кольца в свою сторону, приводя к возникновению нового центра повышенной электронной плотности).

Так, в случае с соединением КН-8 можно предположить, что его значительная антиоксидантная активность связана со смещением электронной плотности от центральных колец в сторону периферических благодаря наличию у них связи с атомом азота и HCl. Стоит отметить, что АОА соединения КН-7 выражена в меньшей степени, чем у КН-8, при том, что КН-8 отличается от КН-7 наличием молекулы HCI, связанной с азотом на периферических фенольных кольцах. Возможно, наличие HCI вызывает еще большее смещение электронной плотности в свою сторону, где она становится доступной для передачи свободным радикалам.

Таблица 6. **Коэффициенты парных корреляций между антипролиферативной и антиоксидантной активностью производных дигидрокверцетина**

| Активность | АП MCF-7 | АП ФКК | АОА |
|---|---|---|---|
| АП MCF-7 | 1 | 0,93* | 0,08 |
| АП ФКК | 0,93* | 1 | 0,26 |
| АОА | 0,08 | 0,26 | 1 |

**Примечание**. АП MCF-7 — антипролиферативная активность ПДГК в отношении клеток MCF-7, АП ФКК — антипролиферативная активность ПДГК в отношении фибробластов кожи крыс, АОА — антиоксидантная активность ПДГК; концентрация ПДГК в экспериментах по изучению антипролиферативной активности: 1 мг/мл; концентрация ПДГК в экспериментах по изучению антиоксидантной активности: $10^{-4}$ М; * — корреляция статистически значима при $p < 0{,}05$.

Соединения КН-1 и КН-2 различаются наличием гидроксильной группы вместо ацетильной в первом фенольном кольце. При этом КН-1, обладающий данной гидроксильной группой, проявляет большую АОА, чем КН-2.

Фенольные кольца у соединений КН-3, КН-4, КН-6 содержат О-ацильные заместители, а соединение КН-9 содержит О-алкильные остатки, однако, все данные производные ДГК не обладают значительной АОА.

## ВЫВОДЫ

1. Среди изученных 9 производных дигидрокверцетина наибольшей антипролиферативной активностью на модели культуры фибробластов крыс обладают КН-2, КН-4, КН-7, КН-8, а на модели культуры клеток MCF-7 (рак молочной железы человека) КН-7, КН-8.

2. Наибольшей ингибирующей активностью в отношении $Fe^{2+}$-индуцированной хемилюминесценции в суспензии мозга крыс обладают соединения КН-8 и дигидрокверцетин, которые в концентрации $10^{-4}$ М уменьшают амплитуду медленной вспышки на 100 %. КН-1 уменьшает амплитуду медленной вспышки на 70 %, КН-2 на 26 %, КН-3 на 13 %, КН-4 на 20 %, КН-7 на 60 %, КН-9 на 27 %. АОА активность КН-5 не определялась ввиду его нерастворимости в используемом растворителе (ДМСО). Значение АОА для наиболее активного соединения КН-8 равняется $1{,}0 \cdot 10^5$, для дигидрокверцетина — $0{,}4 \cdot 10^5$ $M^{-1}$.

3. Наблюдается значительная корреляция (коэффициент корреляции 0,93) между антипролиферативными эффектами производных дигидрокверцетина в отношении фибробластов кожи мышей и клеток MCF-7 (рак молочной железы человека).

## ЛИТЕРАТУРА


1. Ю. А. Владимиров, А. И. Арчаков, *Перекисное окисление липидов в биологических мембранах*, Наука, Москва (1972).
2. Ю. А. Владимиров, Е. В. Проскурнина, Е. М. Демин и др., *Биохимия*, **74**(3), 372 (2009).
3. А. К. Жанатаев, А. В. Кулакова, В. В. Насонова, А. Д. Дурнев, *Бюл. экспер. биол.*, **145**(3), 309 – 313 (2008).
4. С. З. Иванова, Т. Е. Федорова, Н. В. Иванова, Л. А. Остроухова, *Химия растительного сырья*, **4**, 5 – 13 (2002).
5. В. П. Казаков, *Хемилюминесценция уранила, лантаноидов и других элементов*, Наука, Москва (1980).
6. В. К. Колхир, Н. А. Тюкавкина, В. А. Быков, *Хим.-фарм. журн.*, 9 (1995).
7. Э. Е. Нифантьев, *Средство, обладающее противоопухолевым действием, и способ его получения*, Патент России 2349317 (2009).
8. Ю. О. Теселкин, Б. А. Жамбалова, И. В. Бабенкова, Н. А. Тюкавкина, *Биофизика*, **41**(3), 620 – 623, (1996).
9. Р. У. Хабриев, *Руководство по экспериментальному (доклиническому) изучению новых фармакологических веществ*, Медицина, Москва (2005).
10. Ю. И. Черняк, О. Г. Щукина, *Бюл. экспер. биол.*, **147**(5), 532 (2009).
11. L. F. Bjeldanes and G. W. Chang, *Sciense*, **197**(4303), 577 (1977).
12. M. T. Huang, A. W. Wood, H. L. Newmark, et al., *Carcinogenesis*, **4**(12), 1631 – 1637 (1983).
13. C. Kandaswami, E. Perkins, G. Drzewiecki, et al., *Anticancer Drugs*, **3**(5), 525 – 530 (1992).


Поступила 15.04.10

## ANTIPROLIFERATIVE AND ANTIOXIDANT ACTIVITY OF NEW DIHYDROQUERCETIN DERIVATIVES

**V. S. Rogovskii[1], A. I. Matyushin[1], N. L. Shimanovskii[1], A. V. Semeikin[1], T. S. Kukhareva[2], A. M. Koroteev[2], M. P. Koroteev[2], and E. E. Nifant'ev[2]**

[1] Medico-Biological Faculty, Pirogov State Medical University, ul. Bol'shaya Pirogovskaya 9a, Moscow, 119021, Russia;

[2] Organic Chemistry Department, Moscow State Pedagogical University, ul. Malaya Pirogovskaya 1, Moscow, 119991, Russia

Effect of nine new derivatives of dihydroquercetin (taxifolin) on the viability of cultivated normal and tumor cells, their antioxidant activity, and interconnection of the antioxidant activity with the chemical structure have been studied. Among these dihydroquercetin derivatives, the maximum antiproliferative activity on the model of rat fibroblast culture exhibited KN-2, KN-4, KN-7, and KN-8 compounds, while KN-7 and KN-8 compounds also showed maximum activity on the model of MCF-7 tumor cell culture (human breast cancer). The maximum general antioxidant activity was observed for the native dihydroquercetin and KN-8 compound. There is a strong correlation (with a correlation coefficient of 0.93) between the antiproliferative effects of dihydroquercetin derivatives on murine skin fibroblasts and MCF-7 cells (human breast cancer).

**Key words**: Dihydroquercetin, taxifolin, quercetin, antioxidants, antiproliferative activity, lipid peroxidation