

УДК 615.256.5:66.094.3.098+615.252

К.В. ТАРАН, Н.І. ГОРБЕНКО, Ж.О. КОНДРАТЮК, Ф.Г. ЯРЕМЕНКО

ДУ «Інститут проблем ендокринної патології ім. В.Я. Данилевського АМН України»

ПОРІВНЯЛЬНИЙ АНАЛІЗ АНТИОКСИДАНТНИХ ВЛАСТИВОСТЕЙ 17 β -ЕСТРАДІОЛУ ТА ЙОГО 16-АРИЛІДЕНПОХІДНИХ В УМОВАХ IN VITRO

Вивчена антиоксидантна активність оригінальних похідних 17 β -естрадіолу в умовах in vitro. Встановлено, що наявність електронно-акцепторних замісників у пара-положенні бензенового кільця 16-ариліденового фрагменту 17 β -естрадіолу зменшує, тоді як введення замісників електронно-донорної природи посилює антиоксидантну активність сполук. Максимальний антиоксидантний ефект серед вивчених похідних проявляє 16-пара-анізиліден-17 β -естрадіол (ПЕ0607), що обумовлює доцільність його подальшого вивчення як перспективного фармакологічного засобу для корекції естрогендефіцитних станів, поєднаних з порушенням про/антиоксидантного балансу.

Ключові слова: похідні естрадіолу; антиоксидантна активність; дефіцит естрогенів

ВСТУП

Відомо, що естрогендефіцитні стани призводять до складних обмінних порушень, багаторазово примножуючи ризик появи та прогресування атеросклерозу, остеопорозу, інсулінорезистентності, захворювань серцево-судинної системи, старіння [4]. У зв'язку з цим ВООЗ розглядає менопаузу як один із незалежних чинників серцево-судинної патології у жінок, підтвердженням чому є впровадження спеціального терміну «постменопаузальний метаболічний синдром» [9].

В останні роки велика увага приділяється дослідженню ролі оксидативного стресу в індукції різних складових метаболічного синдрому, зокрема, інсулінорезистентності, ендотеліальної дисфункції, прозапального та протромбінового стану [7].

За умов оксидативного стресу продукти глікоксидації та ліпопероксидації накопичуються у плазмі крові, що погіршує надходження глюкози до м'язів та адипозної тканини, знижує секрецію інсуліну панкреатичними β -клітинами [5]. Зменшення функціональної активності останніх спричиняє прогресування гіперглікемії, підвищення вмісту циркулюючих вільних жирних кислот, неадекватно активується ренін-ангіотензинова система, виникає хронічне запалення, що створює умови для розвитку метаболічного синдрому та діабету 2 типу [8].

Експериментальні дослідження підтверджують зниження антиоксидантної системи захисту в оваріоектомованих тварин, що пов'язують із дефіцитом естрогенів, які належать до природних

антиоксидантів. Відомо, що естрогени виконують вазопротекторні функції, обумовлені їх антиоксидантною дією. Зокрема введення 17 β -естрадіолу сприяло зменшенню продукції супероксиду в ендотелії за рахунок стимулюючого впливу на активність позаклітинної і мітохондріальної супероксиддисмутази.

Останнім часом сформульована концепція, згідно з якою протективний вплив естрогенів стосовно розвитку індукованих старінням хвороб, зокрема, серцево-судинних, може бути результатом підвищення окиснювального фосфорилування та зниження продукції вільних радикалів у мітохондріях [3]. Нещодавно було показано, що в мітохондріях присутні рецептори до естрогенів, а хронічне застосування естрогенів сприяє підвищенню енергетичної продукції та зниженню оксидативного стресу та інтенсивності апоптозу в ендотелії за умов гіпоестрогенії [10].

У зв'язку з цим доцільним є пошук сполук з антиоксидантною активністю серед похідних 17 β -естрадіолу, які можуть бути використані для профілактики та терапії захворювань, обумовлених порушенням про/антиоксидантного балансу.

Метою даної роботи було проведення фармакологічного скринінгу серед синтетичних похідних 17 β -естрадіолу на предмет визначення у них *in vitro* антиоксидантної активності.

МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ

Визначення антиоксидантної активності досліджуваних сполук проводили на моделі Fe^{2+} -індукованого окиснення ліпопротеїнів яєчного жовтка [1]. Ступінь вільнорадикального окиснення ліпідів визначали за рівнем ТБК-активних продуктів че-

рез 15 хв інкубації при 37 °С. Антиоксидантну активність сполук визначали за їх здатністю гальмувати утворення ТБК-активних продуктів та розраховували у відсотках зниження оптичної щільності при 520 нм відносно контрольної проби (І%). Для порівняльної оцінки антиоксидантних властивостей 16-ариліден похідних 17β-естрадіолу використовували очікувану концентрацію сполуки, що призводить до 50% зниження утворення ТБК-активних продуктів, та її довірчий інтервал (CI₅₀ [-95% ; +95% CL]), які розраховували за допомогою відповідної регресійної моделі (І% = aC+b). Регресійний аналіз проводили за допомогою комп'ютерної програми «Statistica 6.0». Синтез 16 (Е) — ариліден-1,3,5-естратрієн-3,17β-діолів ПЕ0107 — ПЕ0607 здійснено відомим методом [6] — відновленням 17-кетогрупи в 16 (Е) — ариліденестронах [2] за допомогою NaBH₄. Існування по-

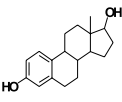
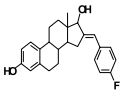
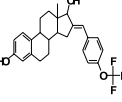
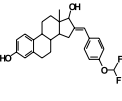
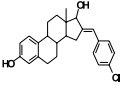
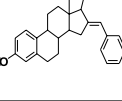
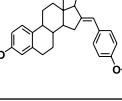
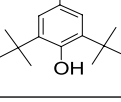
хідних 17β-естрадіолу у вигляді Е-ізомерів із взаємною трансюдною орієнтацією арилу та атома карбону С (17) підтверджено методами двомірної ЯМР спектроскопії, зокрема, NOESY. Як препарат порівняння при вивченні антиоксидантних властивостей використано іонол (2,6-ди-*трет*-бутил-4-метилфенол), який за своєю хімічною будовою найбільш близький до природних естрогенів.

РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

У результаті досліджень було встановлено, що всі похідні 17β-естрадіолу виявляють здатність до гальмування процесів ліпідної пероксидації, що досягає 70–90% при їх використанні в концентрації 40 мкМ. Аналіз залежності антиоксидантних властивостей похідних 17β-естрадіолу від концентрації показав, що для всіх сполук вона носить лінійний характер у діапазоні концентрацій 4-40 мкМ

Таблиця 1

АНТИОКСИДАНТНА АКТИВНІСТЬ ПОХІДНИХ 17β-ЕСТРАДІОЛУ, n=5, (X±SX)

| Формула | Шифр | Загальна антиоксидантна активність, % | | | | |
|---|-------------------|---------------------------------------|-----------|-----------|-----------|-----------|
| | | концентрація сполук, мкМ | | | | |
| | | 4 | 10 | 20 | 30 | 40 |
|  | 17β-естрадіол, E2 | 29,4±1,9 | 49,6±2,6 | 53,9±5,0 | 63,2±7,3 | 71,3±3,3 |
|  | ПЕ0107 | 31,3±5,7 | 59,6±3,7* | 61,1±5,7 | 72,2±6,2 | 80,7±4,7 |
|  | ПЕ0207 | 19,3±1,3* | 57,4±1,7* | 52,3±5,9 | 62,2±4,7 | 76,7±2,1 |
|  | ПЕ0307 | 26,5±2,8 | 49,8±6,8 | 66,7±8,0 | 77,8±7,3 | 89,6±6,2* |
|  | ПЕ0407 | 34,2±5,7 | 58,6±4,7* | 73,3±4,5* | 84,7±9,7* | 91,6±4,9* |
|  | ПЕ0507 | 36,9±3,9 | 63,1±2,0* | 62,5±5,1 | 87,5±5,5* | 96,9±3,1* |
|  | ПЕ0607 | 44,1±3,1* | 64,6±3,1* | 68,8±4,3* | 75,0±6,9 | 91,7±2,1* |
|  | Іонол | 83,3±4,8* | | | | |

* Статистично значущі відмінності показників від таких для 17β-естрадіолу, p≤0,05.

(табл. 1) та добре апроксимується рівнянням лінійної регресії $I\% = aC + b$ ($r = 0,84 - 0,96$).

Представлені похідні ряду 17 β -естрадіолу можна умовно розділити на дві групи, які відрізняються наявністю замісників з акцепторними (сполуки ПЕ0107, ПЕ0207, ПЕ0307) або донорними (сполуки ПЕ0407, ПЕ0607) властивостями в ариліденовому залишку молекули. При порівняльному аналізі було показано, що 16-бензиліденпохідне (ПЕ0507) має більш виразні антиоксидантні властивості відносно 17 β -естрадіолу, про що свідчили значення CI_{50} , яке складало 9,2 мкМ [4,7; 13,7] проти 18,9 мкМ [15,2; 22,5] для 17 β -естрадіолу (табл. 2).

Встановлено, що наявність електронно-акцепторних замісників (флуоро-, трифлуорометокси- та дифлуорометокси-групи) у пара-положенні ариліденового залишку сполук ПЕ0107, ПЕ0207 та ПЕ0307, відповідно, призводить до нівелювання позитивного впливу останнього, так як очікувана CI_{50} для цих речовин достовірно не відрізнялася від CI_{50} 17 β -естрадіолу.

У той же час введення в ариліденовий залишок хлору — замісника зі слабкими електронно-донорними властивостями (ПЕ0407) суттєво не впливає на антиоксидантну активність цього похідного ($CI_{50} = 11,6$ мкМ [7,8; 14,8]) у порівнянні з ПЕ0507. Слід зазначити, що наявність у пара-положенні метокси-групи — замісника з виразними донорними властивостями приводить до посилення антиоксидантної активності у сполуки ПЕ0607 ($CI_{50} = 5,6$ мкМ [3,4; 7,4]) як у порівнянні з 17 β -естрадіолом, так і у порів-

нянні з 16-бензиліденпохідним 17 β -естрадіолу (ПЕ0507). Ймовірно, що наявність електронно-донорних властивостей пара-анізіліденового фрагменту сприяє більш активній нейтралізації вільних радикалів у модельній системі окиснення ліпопротеїнів.

ВИСНОВКИ

1. Введення ариліденового залишку у 16-положення 17 β -естрадіолу приводить до посилення антиоксидантних властивостей сполуки.
2. Наявність електронно-акцепторних замісників у пара-положенні ариліденового фрагменту зменшує антиоксидантні властивості похідних 17 β -естрадіолу, тоді як введення електронно-донорних замісників у пара-положення даного фрагменту посилює їх біологічну активність.
3. Максимальний антиоксидантний ефект серед вивчених похідних 17 β -естрадіолу проявляє сполука ПЕ0607 з метокси-замісником у пара-положенні ариліденового залишку молекули.
4. Отримані результати можуть бути використані при пошуку перспективного фармакологічного засобу серед похідних 17 β -естрадіолу для профілактики та терапії естрогендефіцитних станів, поєднаних з порушенням про/антиоксидантного балансу.

ПЕРЕЛІК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ ІНФОРМАЦІЇ

1. Оценка антиокислительной активности плазмы крови с применением желточных липо-

Таблиця 2

АНАЛІЗ ЗАЛЕЖНОСТІ АНТИОКСИДАНТНИХ ВЛАСТИВОСТЕЙ ПОХІДНИХ 17 β -ЕСТРАДІОЛУ ВІД КОНЦЕНТРАЦІЇ ($I\% = aC + b$)

| Шифр | Коефіцієнт кореляції, коефіцієнти регресії та очікувана CI_{50} | | | |
|--------|---|------------|-------------|----------------------------|
| | r | a÷Sa | b÷Sb | CI_{50} [-95%;+95%CL] |
| E2 | 0,85 | 0,98÷0,13 | 33,10÷3,60 | 18,9 [15,2; 22,5] |
| ПЕ0107 | 0,84 | 1,15÷0,22 | 36,56÷5,24 | 13,9 [8,3; 19,4] |
| ПЕ0207 | 0,86 | 1,29÷0,24 | 28,80÷6,20 | 17,6 [12,0; 23,2] |
| ПЕ0307 | 0,93 | 1,61÷0,20* | 27,08÷5,18 | 15,1 [10,9; 19,3] |
| ПЕ0407 | 0,89 | 1,47÷0,20* | 36,72÷4,93 | 11,6 [7,8; 14,8]* |
| ПЕ0507 | 0,95 | 1,49÷0,20* | 38,35÷4,25 | 9,20 [4,7; 13,7]* |
| ПЕ0607 | 0,96 | 1,15÷0,13 | 45,33÷3,56* | 5,6 [3,6; 7,6]* |

* Статистично значущі відмінності показників від таких для 17 β -естрадіолу, $p \leq 0,05$.

- протеинов / И. В. Бабенкова, Ю. О. Теседкин, Г. И. Клебанов [и др.] // Лаб. дело. — 1985. — №2. — С. 59-62.
2. Эпимерные 17-кетостероиды эстранового ряда и их 16-арилиденпроизводные / Ф.Г. Яременко, Ж.А. Кондратюк, Л.Н. Самарина [и др.] // Тез. доп. XXI Укр. конф. з орг. хімії. Чернівці, 1-5 жовт. 2007 р. — К., 2007. — С. 387.
 3. Oestrogen and mitochondria: a new paradigm for vascular protection / S.P. Duckles // Molecular interventions. — 2006. — Vol. 6, №1. — P. 26-35.
 4. Godsland F. Oestrogens and insulin secretion // Diabetologia. — 2005. — Vol. 48, №11. — P. 2213-2220.
 5. King G.L. Hyperglycemia-induced oxidative stress in diabetic complications / G. L. King, M. R. Loeken // Histochem. Cell Biol. — 2004. — Vol. 122, №4. — P. 333-338.
 6. Modification of Estrone at the 6, 16, and 17 Positions: Novel Potent Inhibitors of 17 β -Hydroxysteroid Dehydrogenase Type 1 / [G. M. Allan, H. R. Lawrence, J. Cornet et al.] // J. Med. Chem. — 2006. — Vol. 49. — P. 1325-1345.
 7. Nishikawa T. The missing link: a single unifying mechanism for diabetic complications / T. Nishikawa, D. Edelstein, M. Brownlee // Kidney Int. — 2000. — Vol. 58, Suppl. 77. — P. S26-S30.
 8. Oxidative stress-activated signaling pathways: a unifying hypothesis type 2 diabetes / J. L. Evans, I. D. Goldfine, B. A. Maddux, G. M. Grodsky // Endocrin. Rev. — 2002. — Vol. 23, №5. — P. 599-622.
 9. Risto J. Kaaja. Metabolic syndrome and the menopause / Risto J. Kaaja // Menopause Int. — 2008. — Vol. 14. — P. 21-25.
 10. Saltiki K. Coronary heart disease in postmenopausal women; the role of endogenous estrogens and their receptors / K. Saltiki, M. Alevizaki // Hormones. — 2007. — Vol. 6, №1. — P. 9-24.

УДК 615.256.5:66.094.3.098+615.252

Е.В. Таран, Н.И. Горбенко, Ж.А. Кондратюк, Ф.Г. Яременко
СРАВНИТЕЛЬНЫЙ АНАЛИЗ АНТИОКСИДАНТНЫХ СВОЙСТВ 17 β -ЭСТРАДИОЛА
И ЕГО 16-АРИЛИДЕНПРОИЗВОДНЫХ В УСЛОВИЯХ *IN VITRO*

Изучена антиоксидантная активность оригинальных производных 17 β -эстрадиола в условиях *in vitro*. Установлено, что наличие электронно-акцепторных заместителей в пара-положении бензенового кольца 16-арилиденового фрагмента 17 β -эстрадиола уменьшает, тогда как введение заместителей электронно-донорной природы усиливает антиоксидантную активность соединений. Максимальный антиоксидантный эффект среди изученных производных проявляет 16-*para*-анизилиден-17 β -эстрадиол (ПЕ0607), что обуславливает целесообразность его дальнейшего изучения как перспективного фармакологического средства для коррекции эстрогендефицитных состояний, связанных с нарушением про/антиоксидантного баланса.

Ключевые слова: производные эстрадиола; антиоксидантная активность; дефицит эстрогенов

UDC 615.256.5:66.094.3.098+615.252

К. V. Taran, N. I. Gorbenko, Zh. O. Kondratiuk, F. G. Yaremenko
COMPARATIVE ANALYSIS OF 17 β -ESTRADIOL ANTIOXIDANT ACTIVITY AND ITS
DERIVATIVES UNDER CONDITION *IN VITRO*

The aim of the study was to estimate antioxidant activity of original 17- β estradiol derivatives *in vitro*. It has been established that presence of electron acceptor groups in *para*-position of aryl ring of 17 β -estradiol led to decrease of compound's antioxidant effect. Introduction of electron donor groups into *para*-position of aryl ring of 17 β -estradiol increases antioxidant effect of derivatives. 17 β -Estradiol derivative PE0607 with methoxy group in *para*-position of aryl ring possesses most antioxidant activity. These results justify the perspectives of compound PE0607 as a potential agent for the treatment of estrogen deficiency states connected with oxidative-reductive balance disturbance.

Key words: estradiol derivatives; antioxidant activity; estrogen deficiency

Адреса для листування:
61002, м. Харків,
вул. Артема, 10.
тел. (057) 700 45 36; факс (057) 700 45 38;
e-mail admin@ipep.com.ua

Надійшла до редакції:
01.11.09