

УДК 577.334

N-АЦИЛПРОИЗВОДНЫЕ 2-АМИНО-4,6-ДИ-ТРЕТ-БУТИЛФЕНОЛА – ПОТЕНЦИАЛЬНЫЕ ПРОТЕКТОРЫ ПРИ ИНДУЦИРУЕМОМ НЕЙТРОФИЛАМИ ГАЛОГЕНИРУЮЩЕМ СТРЕССЕ

© 2024 г. Г. Н. Семенкова¹, И. И. Жолнеревич², Е. И. Коваленко², Г. А. Ксендзова³, В. Л. Сорокин², Н. В. Амаэгбери^{2,*}, А. В. Климович²

¹Научно-исследовательская лаборатория Белорусского государственного медицинского университета, Минск, 220083, Белоруссия

²Белорусский государственный университет, Минск, 220030, Белоруссия

³Научно-исследовательский институт физико-химических проблем Белорусского государственного университета, Минск, 220030, Белоруссия

*E-mail: n.amaegberi@gmail.com

Поступила в редакцию 20.11.2023

После доработки 28.11.2023

Принята к публикации 06.12.2023

Изучено влияние N-ацилпроизводных 2-амино-4,6-ди-трет-бутилфенола на функции нейтрофилов. Установлено, что производные со свободной гидроксильной группой в бензольном кольце, в отличие от O-метилированных, модифицируют свойства клеток, снижая генерацию хлорноватистой кислоты в процессе формирования респираторного взрыва. Эти соединения являются перехватчиками HOCl/OCl^- , генерируемых стимулированными нейтрофилами, и снижают секрецию миелопероксидазы (МПО) клетками. Показано, что наиболее эффективным перехватчиком хлорноватистой кислоты является N-(3,5-ди-трет-бутил-2-гидроксифенил)ацетамид. Это вещество значительно подавляет секреторную дегрануляцию нейтрофилов и оказывает цитопротекторное действие в условиях галогенирующего стресса.

Ключевые слова: аминофенолы, нейтрофилы, активные формы кислорода и хлора, секреторная дегрануляция, жизнеспособность

Принятые сокращения: АФКХ — активные формы кислорода и хлора; ДМСО — диметилсульфоксид; МПО — миелопероксидаза; ПМР — протонный магнитный резонанс; СБСРЭ — сбалансированный буферный солевой раствор Эрла; ХЛ — хемилюминесценция, Люм-ХЛ — люминолзависимая хемилюминесценция, Люц-ХЛ — люцигенинзависимая хемилюминесценция; ЯМР — ядерный магнитный резонанс; PBS — фосфатный буферный раствор; PI — йодистый пропиций.

DOI: 10.31857/S0041377124030068, EDN: PEJNHM

Активные формы галогенов образуются в организме человека и животных при активации миелопероксидазы (МПО) нейтрофилов, моноцитов, макрофагов и пероксидазы эозинофилов (Durgé-Crochet et al., 2013; Morris et al., 2022). Наибольшее количество МПО содержится в нейтрофилах. Эти клетки первыми мигрируют в очаг инфицирования, где утилизируют микроорганизмы, продукты цитодеструкции и другие чужеродные для организма объекты посредством респираторного взрыва с участием активных форм кислорода и галогенов (Arnhold, 2020; Rizo-Télez et al., 2022). Активация нейтрофилов сопровождается усилением секреторной дегрануляции, в результате чего во внеклеточное пространство высвобождаются гидролитические ферменты (например, лизоцим, эластаза

и др.), а также МПО (Mayadas et al., 2014). МПО в галогенирующем цикле катализирует реакции образования гипогалогенидов, используя в качестве субстратов пероксид водорода и галогенид-ионы. Поскольку в организме концентрация хлоридов много выше, чем других галогенидов, основным продуктом этих реакций является HOCl/ClO^- . Как и пероксид водорода, хлорноватистая кислота является сильным окислителем и в зависимости от концентрации может стимулировать функциональную активность клеток или вызывать их разрушение (Gamaley et al., 1994; Kuznetsova et al., 2017; Hawkins, 2020).

Известно, что у пожилых людей, пациентов с астмой, ревматоидным артритом, сердечно-сосудистыми, нейродегенеративными и онкологическими

патологиями происходит усиление секреции МПО из нейтрофилов, что приводит к повышению уровня гипохлорита в крови и очаге воспаления и, как следствие, к развитию галогенирующего стресса (Malle et al., 2000; Nussbaum et al., 2013; Tzikas et al., 2014; Davies, Hawkins, 2020; Ramachandra et al., 2020). Поэтому актуальным является поиск веществ, способных с высокой специфичностью предотвращать избыточное образование хлорноватистой кислоты в организме, либо выполнять функцию селективных ловушек HOCl/ClO^- .

К таким соединениям могут относиться синтезированные нами ранее N-ацильные производные 2-амино-4,6-ди-*трет*-бутилфенола (Шадыро и др., 2008), поскольку они являются эффективными регуляторами свободнорадикальных реакций, протекающих с участием кислород- и углеродцентрированных органических радикалов (Shadyro et al., 2008). Наличие N-ацилированной аминогруппы в структуре соединений может приводить к высокой реакционной способности веществ по отношению к HOCl/ClO^- , как это показано для других аминоксодержащих соединений (Hawkins et al., 2003; Shadyro et al., 2015). Дополнительной мотивацией для исследования N-ацильных производных 2-амино-4,6-ди-*трет*-бутилфенола послужило то, что некоторые из них, обладая низкой цитотоксичностью *in vivo* и *in vitro*, проявляют противовирусную активность в отношении вируса гриппа A/FPV/Rostock/34 (H7N1) и вируса простого герпеса 1-го типа (Шадыро и др., 2019).

В настоящей работе с целью поиска потенциальных протекторов для предотвращения последствий галогенирующего стресса исследованы структурные закономерности влияния N-ацилпроизводных 2-амино-4,6-ди-*трет*-бутилфенола на процессы генерации активных форм кислорода и хлора (АФКХ) в нейтрофилах, секреторную дегрануляцию и жизнеспособность клеток в норме и в условиях галогенирующего стресса, индуцируемого гипохлоритом натрия NaClO .

МАТЕРИАЛ И МЕТОДИКА

Реактивы. В работе использовали декстран, гистопак-1077, люминол (5-амино-2,3-дигидро-1,4-фталазиндион), люцигенин (10,10'-диметил-9,9'-биакридиния динитрат), Нерес, RPMI-1640, ДМСО, TritonX-100, пероксид водорода (H_2O_2), гипохлорит натрия (NaOCl), йодистый пропилий (PI), бактерии *Micrococcus lysodeikticus* (Sigma, USA). Компоненты для приготовления

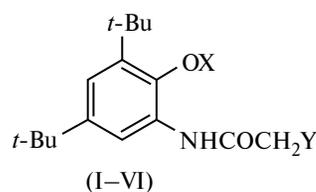
фосфатного буферного раствора (PBS) и сбалансированного буферного солевого раствора Эрла (СБСРЭ) (Анализ X, Белоруссия).

Синтез N-ацилпроизводных 2-амино-4,6-ди-*трет*-бутилфенола. Структурные формулы исследуемых в работе соединений представлены на рис. 1. Синтез N-ацильных производных 2-амино-4,6-ди-*трет*-бутилфенола I–III был осуществлен взаимодействием 2-амино-4,6-ди-*трет*-бутилфенола с уксусным ангидридом (I), а также с хлорангидридами пропановой (II) и н-бутановой (III) кислот в присутствии триэтиламина в качестве акцептора выделяющегося хлороводорода по описанным ранее методикам (Шадыро и др., 2008).

O-метилированные производные 2-амино-4,6-ди-*трет*-бутилфенола IV–VI были получены реакцией метилирования соединений I–III с использованием диметилсульфата, как описано ниже. Структура o-метилированных соединений была подтверждена методами ЯМР ^1H и масс-спектроскопии. Спектральные характеристики для каждого полученного соединения приведены в скобках.

Получение соединения N-(3,5-ди-*трет*-бутил-2-метоксифенил)ацетамид (IV). Смесь 0.1 г (0.38 ммоль) N-(3,5-ди-*трет*-бутил-2-гидроксифенил)ацетамида (I), 0.26 г (1.9 ммоль) карбоната калия и 0.1 г (0.79 ммоль) диметилсульфата в 5 мл сухого ацетона кипятили в течение 6 ч. Затем осадок отфильтровывали, фильтрат упаривали в вакууме, остаток дважды перекристализовывали из водно-этанольной смеси. Получали 0.06 г (57%) соединения IV в виде белого порошка с температурой плавления 190 °С. (Спектр ЯМР ^1H (CDCl_3), δ , м. д.: 8.02 д (1H, CH; J = 2.0), 7.40 уш с (1H, NH), 7.09 д (1H, CH; J = 2.0), 3.73 с (3H, CH_3), 2.20 с (3H, CH_3), 1.31 с (9H, 3CH_3), 1.27 с (9H, 3CH_3). Масс-спектр, m/z ($I_{\text{отн}}$, %): 277 (37) $[\text{M}]^+$. $\text{C}_{17}\text{H}_{27}\text{NO}_2$ — брутто-формула соединения IV).

Получение соединения N-(3,5-ди-*трет*-бутил-2-метоксифенил)пропанамида (V). Раствор 0.5 г (1.8 ммоль) N-(3,5-ди-*трет*-бутил-2-гидроксифенил)



- I: X = H, Y = H;
- II: X = H, Y = CH_3 ;
- III: X = H, Y = CH_2C ;
- IV: X = CH_3 , Y = H;
- V: X = CH_3 , Y = CH;
- VI: X = CH_3 , Y = CH

Рис. 1. Структурная формула N-ацильных производных 2-амино-4,6-ди-*трет*-бутилфенола (I–VI), исследуемых в работе.

пропанамида (II) и 0.45 г (3.60 ммоль) диметилсульфата в 15 мл сухого ацетона кипятили в течение 6 ч с 1.25 г (9.0 ммоль) карбоната калия. Затем реакционную смесь отфильтровывали, фильтрат упаривали в вакууме, а остаток дважды перекристаллизовывали из водно-этанольной смеси. Получали 0.44 г (85 %) соединения V в виде белого порошка с температурой плавления 125—126 °С. (Спектр ЯМР ^1H (CDCl_3), δ , м. д.: 8.17 с (1H, NH), 7.45 с (1H, CH), 7.10 с (1H, CH), 3.73 с (3H, CH_3), 2.45 кв (2H, CH_2), 1.40 с (9H, 3CH_3), 1.26 т (3H, CH_3), 1.26 с (9H, 3CH_3). Масс-спектр, m/z ($I_{\text{отн}}$, %): 291 (43) $[\text{M}]^+$. $\text{C}_{18}\text{H}_{29}\text{NO}_2$ — брутто-формула соединения V).

Получение соединения N-(3,5-ди-трет-бутил-2-метоксифенил)бутанамида (VI). Раствор 0.5 г (1.72 ммоль) N-(3,5-ди-трет-бутил-2-гидроксифенил)бутанамида (III) и 0.43 г (3.44 ммоль) диметилсульфата в 15 мл сухого ацетона кипятили 6 ч с 1.19 г (8.6 ммоль) карбоната калия. Затем реакционную смесь отфильтровывали, фильтрат упаривали в вакууме, а остаток дважды перекристаллизовывали из водно-этанольной смеси. Получали 0.37 г (71 %) соединения VI в виде белого порошка с температурой плавления 118—119 °С. (Спектр ЯМР ^1H (CDCl_3), δ , м. д.: 8.16 с (1H, NH), 7.42 с (1H, CH), 7.15 с (1H, CH), 3.79 с (3H, CH_3), 2.40 т (2H, CH_2), 1.80 кв (2H, CH_2), 1.42 с (9H, 3CH_3), 1.27 с (9H, 3CH_3), 1.10 т (3H, CH_3). Масс-спектр, m/z ($I_{\text{отн}}$, %): 305 (35) $[\text{M}]^+$. $\text{C}_{19}\text{H}_{31}\text{NO}_2$ — брутто-формула соединения VI).

Состав и строение всех полученных соединений подтверждены совокупностью данных ЯМР ^1H - и масс-спектрометрии. Спектры протонного магнитного резонанса растворов веществ в CDCl_3 были сняты на спектрометре Bruker ARX-400 (США) с рабочей частотой 400 МГц, химические сдвиги (δ , м. д.) приведены относительно сигнала тетраметилсилана. Масс-спектры были получены на спектрометре Shimadzu QP-5000 (Япония) с использованием техники прямого ввода образцов в ионный источник при температуре источника 200 °С и энергии ионизации 70 эВ. Температуры плавления определяли на нагревательном столике Voetius (Германия). Контроль за ходом реакций и чистотой полученных соединений осуществляли методом тонкослойной хроматографии на пластинках Silufol UV-254 (Чехия) в системе циклогексан-изопропанол-водный аммиак (4:1:0.001); пластинки проявляли в парах йода.

Рабочие растворы аминифенолов готовили в ДМСО или в 10 %-ном растворе ДМСО в 0.15 моль/л NaCl. Соответствующую смесь ДМСО

в 0.15 М растворе NaCl вносили во все контрольные образцы.

Выделение нейтрофилов из периферической крови. Нейтрофилы выделяли из крови здоровых людей в градиенте плотности гистопак-1077 по стандартной методике (Вюит, 1976). Из осадка, содержащего нейтрофилы, удаляли примесь эритроцитов с помощью гипотонического лизиса, после чего восстанавливали осмотическую активность раствора добавлением 0.3 М раствора NaCl. Суспензию клеток дважды отмывали в 0.15 М растворе NaCl. Полученную фракцию клеток суспензировали в среде RPMI-1640 (pH 7.4). Перед определением функциональных свойств клетки переводили в соответствующий буферный раствор (СБСРЭ или PBS). Содержание нейтрофилов в клеточной суспензии составляло не менее 96 %. Ко всем контрольным образцам добавляли соответствующий для аминифенола растворитель.

Получение из нейтрофилов лизата, содержащего МПО. Суспензию нейтрофилов ($2 \cdot 10^6$ кл/мл) в среде RPMI-1640 подвергали трехкратному замораживанию — размораживанию с целью разрушения клеток. Полученную смесь центрифугировали в течение 20 мин при 3000 об/мин. Супернатант, содержащий МПО, использовали для анализа.

Оценка генерации АФКХ нейтрофилами. Образование АФКХ изучали методом хемилюминесценции (ХЛ) на биохемилюминиметре БХЛ-1 (БГУ, Белоруссия) с использованием системы сбора и обработки данных Юнихром (Новые аналитические системы, Белоруссия). Генерацию АФКХ регистрировали с помощью люминолзависимой хемилюминесценции (Люм-ХЛ), используя 25 мкМ люминола. Образование супероксидных анион-радикалов оценивали по люцигенинзависимой ХЛ (Люц-ХЛ) с использованием люцигенина в концентрации 10 мкМ. Интегральную интенсивность ХЛ определяли как площадь под кинетической кривой ХЛ, зарегистрированной в течение 10 мин, и обозначали $I_{\text{к}}$ и I для контрольного и опытного образцов соответственно. Суммарные (Σ) Люм-ХЛ и Люц-ХЛ представляют собой интегральные интенсивности, выраженные в процентах от интегральной интенсивности ХЛ контрольных образцов. Суспензию клеток предварительно инкубировали в СБСРЭ pH 7.4, 37 °С с растворами аминифенолов в течение 10 мин. Генерацию АФКХ в нейтрофилах индуцировали адгезией клеток к поверхности стекла в СБСРЭ (Liu et al., 1996; Kavalenka et al., 2007).

Влияние производных аминифенола на свободнорадикальные процессы в реакции окисления люминола при действии H_2O_2 или NaOCl. В СБСРЭ (pH 7.4, объем

1 мл) вносили 25 мкМ люминола и 1 мкМ раствора соответствующего производного аминифенола, после чего регистрировали фоновую ХЛ. Затем добавляли в темноте 100 мкМ H_2O_2 или NaOCl и регистрировали ХЛ в течение 7 мин. Интегральную интенсивность ХЛ определяли как $\Sigma I / \Sigma I_k \cdot 100\%$, где ΣI и ΣI_k — интегральная интенсивность ХЛ в реакции окисления люминола H_2O_2 или NaOCl соответственно в присутствии и отсутствие соответствующего аминифенола. Из полученных значений интегральной интенсивности вычитали фоновую интенсивность.

Влияние производных аминифенола на свободнорадикальные процессы в галогенирующем цикле МПО. В СБСРЭ (рН 5.2, 1 мл) добавляли 25 мкМ люминола и 50 мкл супернатанта нейтрофилов, содержащего МПО, вносили исследуемые аминифенолы в соответствующих концентрациях, после чего регистрировали фоновую ХЛ. Затем в кювету в темноте вносили 100 мкМ H_2O_2 и регистрировали кинетическую зависимость интенсивности ХЛ, обусловленную ферментативным окислением люминола H_2O_2 с образованием преимущественно HOCl/OCl^- . Параметры интенсивности ХЛ определяли, как описано выше.

Оценка секреторной дегрануляции нейтрофилов. Секреторную дегрануляцию определяли по выходу лизоцима из клеток (Shugart, 1952). Активность лизоцима в супернатанте оценивали по скорости лизиса клеточных стенок бактерий *Micrococcus lysodeikticus* спектрофотометрически при длине волны 450 нм на спектрофлуориметре СМ 2203 («Солар», Минск, Белоруссия). Предварительно свежеизолированные нейтрофилы обрабатывали растворами аминифенолов или соответствующим растворителем и инкубировали в СБСРЭ рН 7.4, 37 °С в течение 10 мин.

Оценка жизнеспособности клеток. Использовали флуоресцентный метод, спектрофлуориметр СМ 2203 («Солар», Минск, Белоруссия), PI (при длине волны возбуждения и испускания 530 и 640 нм соответственно), молекулы которого проникают в клетку при повреждении цитоплазматических мембран и встраиваются между нуклеотидами в ДНК и РНК (реакция интеркалирования). После выдерживания клеток в растворах анализируемых веществ в стеклянных пробирках в течение 1 ч при 37 °С в суспензию клеток вносили 10 мкМ раствора PI. Клетки перемешивали, выдерживали в течение 5 мин и измеряли интенсивность флуоресценции (при длине волны возбуждения и испускания 532 и 630 нм соответственно). На 5-й мин измерения в кювету вносили 30 мкл 10%-ного Тритона X-100 для разрушения оставшихся клеток (Kato et al., 1999). Жизнеспособность клеток определяли по формуле:

$$\frac{(F_{I1} - F_{I2}) - (F_{d1} - F_{d2})}{(F_{I1} - F_{I2})} \cdot 100\%,$$

где F_{d1} , F_{I1} и F_{d2} , F_{I2} — параметры интенсивности флуоресценции PI в отсутствие и в присутствии Тритона X-100 соответственно.

Жизнеспособность нейтрофилов в условиях галогенирующего стресса определяли методом флуоресцентной микроскопии. Нейтрофилы ресуспендировали в PBS в концентрации $1 \cdot 10^4$ кл./мл. Полученную суспензию разделяли на 4 пробирки. В каждую из пробирок добавляли: 1) растворитель; 2) 3 мкМ соединения I; 3) 300 мкМ NaOCl и 4) 3 мкМ соединения I и 300 мкМ NaOCl совместно. Затем клеткам давали адгезировать на поверхности стекла в течение 10 мин при 37 °С, добавляли 10 мкМ раствора PI и инкубировали ещё 5 мин. Образцы анализировали с помощью конфокального сканирующего микроскопа NanoFinder High End (Tokyo Instruments, Япония—LotisTII, Белоруссия). Обработку данных проводили при помощи программного обеспечения NanoFinder Data Viewer (Tokyo Instruments, Япония—LotisTII, Белоруссия) для определения интегральной интенсивности флуоресценции PI. Интегральную интенсивность PI определяли, сканируя не менее 20 клеток для каждого варианта.

Статистическая обработка результатов. Использовали однофакторный дисперсионный анализ (one-way ANOVA). Различия между контрольной и экспериментальной группой анализировали с помощью теста Даннета. Данные представлены как среднее значение из трех и более независимых экспериментов и стандартного отклонения. Результаты считали достоверными при $P < 0.05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Мы изучили влияние N-ацильных производных 2-амино-4,6-ди-*трет*-бутилфенола (I—VI) на генерацию АФКХ нейтрофилами, стимулированными к фагоцитозу адгезией на поверхности стекла (рис. 2). Известно, что люминол является ХЛ-индикатором всех типов АФКХ, однако он наиболее эффективно взаимодействует с HOCl/OCl^- (Рошупкин и др., 2006). Люцигенин широко используется для ХЛ-детектирования супероксидных анион-радикалов (Li et al., 1998).

Из рис. 2а видно, что соединение I в диапазоне концентраций 0.1—1 мкМ, а аминифенолы II и III в концентрации от 0.01 до 1 мкМ дозозависимо уменьшают интенсивность Люм-ХЛ и, как след-

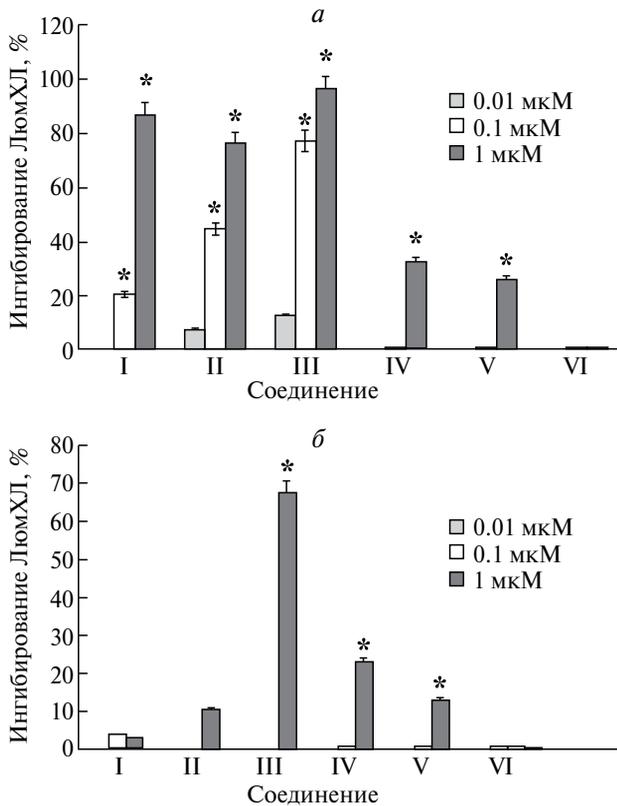


Рис. 2. Ингибирующее действие (в %) соединений I—V на люминолзависимую (Люм-ХЛ, *а*) и люцигенинзависимую (Люц-ХЛ, *б*) хемилюминесценцию стимулированных нейтрофилов. Ингибирования Люм-ХЛ и Люц-ХЛ в контрольных образцах не наблюдали. Концентрация клеток: 1 млн/мл, раствор СБСРЭ (рН 7.4). Концентрация люминола и люцигенина — 25 и 10 мкМ соответственно. Время инкубирования с добавками — 10 мин. Здесь и на рис. 3, 5: (*) — Различия с контролем (К) достоверны при $P < 0.05$ (тест Даннета).

ствие, продукцию хлорноватистой кислоты. Причем степень ингибирования Люм-ХЛ максимальна для соединений I, II, III в концентрации 1 мкМ. Влияние аминифенолов на интенсивность Люц-ХЛ нейтрофилов, обусловленную образованием клетками супероксидных анион-радикалов, представлено на рис. 2б. Видно, что вещества I, II, III в концентрациях 0.01 и 0.1 мкМ практически не ингибируют продукцию нейтрофилами $O_2^{\cdot -}$. Только в концентрации 1 мкМ соединение II и в большей степени соединение III снижают этот параметр. Соединения IV и V (метилированные производные I и II соответственно) в концентрации 1 мкМ практически в 3 раза слабее, чем I и II, ингибируют Люм-ХЛ клеток и в меньшей степени подавляют Люц-ХЛ, тогда как 1 мкМ соединения VI (метилированное производное вещества III) не влияет на исследуемый процесс.

Известно, что формирование респираторного взрыва в нейтрофилах инициируется сборкой НАДФН-оксидазного комплекса, в результате чего происходит генерация супероксидных анион-радикалов (Babior, 2000; Zeng et al., 2019). Под действием супероксиддисмутазы эти радикальные частицы дисмутируют с образованием H_2O_2 , который является субстратом МПО, катализирующей образование $HOCl$ в галогенирующем цикле этого фермента (Arnhold, 2020). Из данных, представленных на рис. 2, следует, что аминифенолы I—III дозозависимо снижают образование хлорноватистой кислоты. Причём ингибирующее действие этих соединений повышается с увеличением алкильного радикала в N-ацильной группе. Подобная зависимость от структуры бокового заместителя этих соединений в концентрации 1 мкМ наблюдается при изучении образования $O_2^{\cdot -}$ клетками. При более низких концентрациях аминифенолы I—III не оказывали влияния на выход этих радикалов. O-метилированные производные IV—VI ингибировали образование хлорноватистой кислоты в меньшей степени, а их влияние на продукцию $O_2^{\cdot -}$ и $HOCl$ уменьшалось с увеличением алкильного радикала. Причём ингибирующее действие веществ IV—VI было зарегистрировано нами при концентрации этих соединений не ниже 1 мкМ.

Ранее нами показано, что производные аминифенолов со свободной гидроксильной группой в отличие от их O-метилированных производных эффективно ингибируют радикальные реакции с участием кислород- и углеродцентрированных органических радикалов (Shadyro et al., 2008). Было также установлено, что ряд производных 2-амино-4,6-ди-трет-бутилфенола, включая I и III, в интервале концентраций 0.001—10 мкМ практически не оказывает влияния на ХЛ перитонеальных макрофагов крысы (Shadyro et al., 2008; Бизунок и др., 2011). Следует отметить, что в этих клетках образование АФКХ осуществляется преимущественно за счет активации НАДФН-оксидазы, так как МПО в них присутствует в незначительных количествах. Поскольку в нейтрофилах МПО содержится в высокой концентрации, мы предположили, что аминифенолы I—III способны взаимодействовать с хлорноватистой кислотой, влиять на активность МПО, уменьшать количество пероксида водорода, как главного субстрата этого фермента.

Для проверки этого предположения было изучено влияние соединений I—V на свободнорадикальные реакции в системах люминол — $NaOCl$, люминол — H_2O_2 и МПО — люминол — H_2O_2 (табл. 1).

Таблица 1. Степень ингибирования суммарной интенсивности ХЛ в модельных системах при действии аминофенолов I–V

Соединение	Ингибирование в системе, %		
	Люминол—NaOCl	Люминол—H ₂ O ₂	МПО—люминол—H ₂ O ₂
I	78.1 ± 1.0	3.8 ± 4.8	54.2 ± 5.1
II	58.3 ± 2.1	5.2 ± 4.2	42.8 ± 3.5
III	48.3 ± 2.6	8.5 ± 4.6	68.4 ± 5.5
IV	0	2.3 ± 0.4	12.7 ± 4.1
V	0	6.3 ± 2.3	3.8 ± 1.2
VI	0	4.5 ± 1.2	6.7 ± 2.8

Примечание. Концентрация: люминола — 25 мкМ, NaOCl и H₂O₂ — 100 мкМ, соединений I–V — 1 мкМ.

Из результатов, представленных в табл. 1, видно, что соединения I, II и III в концентрации 1 мкМ эффективно подавляют Люм-ХЛ под действием NaOCl (I > II > III), незначительно ингибируют образование свободных радикалов при добавлении к люминолу H₂O₂ и снижают выход радикальных промежуточных продуктов в галогенирующем цикле МПО (в системе МПО—люминол—H₂O₂). В то же время соединения IV, V и VI не влияют на свободнорадикальные процессы в системе люминол—NaOCl, слабо ингибируют реакцию люминола с H₂O₂ и ферментативную реакцию с участием МПО. Из этих данных следует, что соединения I—III можно рассматривать в качестве высокоэффективных ловушек HOCl/OCl⁻, причем уменьшение алкильного фрагмента в боковой цепи N-ацилпроизводных аминофенолов приводит к увеличению степени ингибирования радикальных продуктов в реакциях с участием NaOCl. Уменьшение выхода свободных радикалов после введения соединений I—III в систему, содержащую МПО, может быть обусловлено как утилизацией основного продукта этой реакции — NaOCl, так и способностью этих веществ ингибировать фермент.

Важным свойством активированных фагоцитов является секреторная дегрануляция, в результате которой во внеклеточное пространство наряду с гидролазами высвобождается МПО (Bedouhène et al., 2020; Lacy, 2006). Избыточное количество МПО вне клеток может приводить к гиперпродукции хлорноватистой кислоты и, как следствие, к цитодеструкции и разрушению тканей (Davies, Hawkins, 2020). На рис. 3 показано влияние соединений I–V на секреторную дегрануляцию нейтрофилов, которую мы оценивали по выходу лизоцима из клеток. Видно, что при действии на клетки аминофенолов со свободной

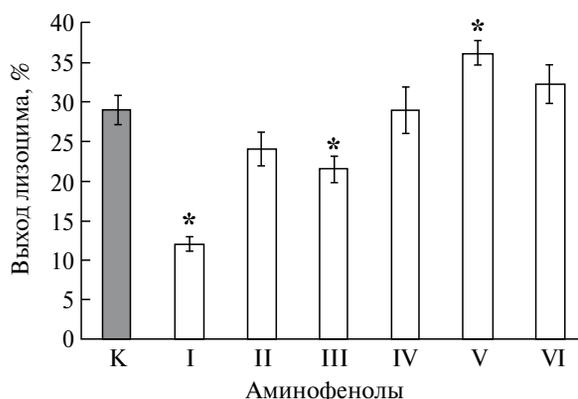


Рис. 3. Влияние соединений I–V на секреторную дегрануляцию нейтрофилов.

Концентрация клеток 1 млн/мл в расворе СБСРЭ (рН 7.4), аминофенолов — 1 мкМ. Время действия соединений 10 мин при 37 °С.

ОН-группой выход лизоцима снижается, причем вещество I подавляет секрецию лизоцима в 2.4 раза. Соединения IV–VI либо не влияют, либо усиливают секрецию этого фермента из нейтрофилов.

Результаты, полученные при изучении секреторной дегрануляции, позволили предположить, что соединение I, в отличие от II и III, способно увеличивать выживаемость клеток в условиях окислительного стресса. Для проверки этого предположения мы определили жизнеспособность нейтрофилов с помощью PI после действия на них соединений I–III в течение 1 ч с (рис. 4). Выявлено, что вещество I в диапазоне концентраций 0.01–1 мкМ увеличивает жизнеспособность клеток на 20%. Соединение II практически не влияет, а III уменьшает на 17% количество живых нейтрофилов. Следует отметить, что инкубирование нейтрофилов сопровождается адгезией клеток к поверхности стекла, в результате чего происходит

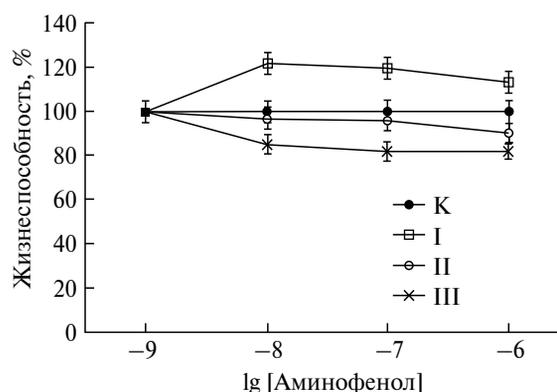


Рис. 4. Влияние соединений I–III на жизнеспособность нейтрофилов.

Концентрация клеток 1 млн/мл в расворе СБСРЭ (рН 7.4). Время действия соединений 1 ч при 37 °С.

генерация АФКХ и усиливается секреторная дегрануляция (Kavalenka et al., 2007; Kuznetsova et al., 2017). Очевидно, что при адгезии в течение 1 ч часть клеток разрушается от последствий окислительного стресса. В нашем случае количество PI-позитивных клеток в контрольном образце составляло 24%. Вероятно, соединение I за счёт высокоэффективной утилизации HOCl/OCl^- и значительного подавления секреторной дегрануляции способствует увеличению выживаемости нейтрофилов.

По данным авторов (da Cruz Nizer et al., 2020) 1 млн нейтрофилов в физиологических условиях продуцирует 0.1 мкМ/ч хлорноватистой кислоты. Скорость образования HOCl/OCl^- в очаге воспаления достигает 25–50 мМ/ч (Ulfig, Leichert, 2021). Нами проанализировано влияние вещества I на жизнеспособность нейтрофилов в условиях галогенирующего стресса, смоделированного добавлением в среду инкубирования (PBS, pH 7.4) 300 мкМ NaOCl (рис. 5).

На рис. 5а представлены микроскопические изображения нейтрофилов, предварительно обработанных 300 мкМ аминофенола I и/или 300 мкМ NaOCl и адгезированных к поверхности стекла, а затем обработанных PI. На рис. 5б приведены количественные данные суммарной интенсивности флуоресценции PI в каждом из четырёх типов образцов.

Видно, что действие на клетки клетки 300 мкМ соединения I приводит к повышению интенсивности флуоресценции PI, что свидетельствует о токсичности этого вещества. Обработка клеток NaOCl в эквимолярной концентрации (300 мкМ) вызывает снижение жизнеспособности нейтрофилов в 2.4 раза. Однако после сочетанной обработки клеток аминофенолом I и NaOCl изучаемый параметр приближается к контрольным значениям, что свидетельствует о высокой выживаемости нейтрофилов.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В нашем исследовании показано, что N-ацильные производные 2-амино-4,6-ди-трет-бутилфенола со свободной гидроксильной группой в бензольном кольце, в отличие от O-метилированных, модифицируют свойства нейтрофилов, что приводит к снижению генерации хлорноватистой кислоты в процессе формирования респираторного взрыва. Эти соединения являются перехватчиками HOCl/OCl^- , генерируемых нейтрофилами в процессе активации к фагоцитозу, и снижают секрецию МПО из клеток. Наиболее эффективным перехватчиком хлорноватистой кислоты является N-(3,5-ди-трет-бутил-2-гидроксифенил)ацетамид. Это вещество значительно подавляет секреторную дегрануляцию нейтрофилов и оказывает цитопротекторное действие в условиях галогенирующего стресса. Таким образом, N-(3,5-ди-трет-бутил-2-гидроксифенил)ацетамид можно рассматривать в качестве потенциального средства для снижения последствий галогенирующего стресса.

ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ

Данная работа финансировалась за счет средств бюджета государственной программы научных исследований «Биотехнологии-2» Министерства образования Республики Белоруссии (задание 1.6.2). Никаких дополнительных грантов на проведение или руководство данным конкретным исследованием получено не было.

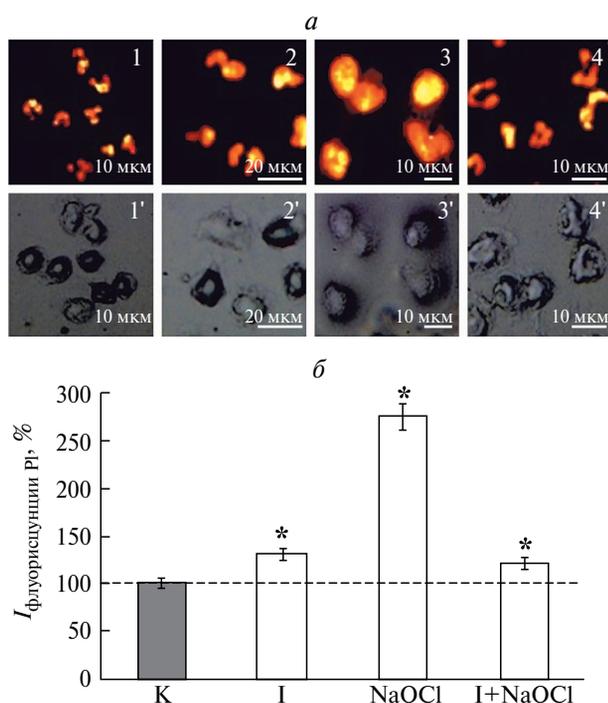


Рис. 5. Флуоресцентные изображения нейтрофилов, окрашенных йодистым пропидием (PI), необработанных (1, 2) и обработанных (3, 4) 300 мкМ NaOCl в отсутствие (1, 3) и присутствии (2, 4) 300 мкМ соединения I (а) и количественная оценка интенсивности (I) флуоресценции PI в нейтрофилах (б). Время действия вещества I и/или NaOCl 20 мин при 37 °С в растворе СБСРЭ (pH 7.4). а — Изображения 1–4 получены при длине волны возбуждения и эмиссии 532 и 630 нм соответственно, 1–4 — в проходящем свете.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Все исследования проводились в соответствии с принципами биомедицинской этики, изложенными в Хельсинкской декларации 1964 г. и последующих поправках к ней. Каждый участник исследования дал добровольное письменное информированное согласие после получения разъяснений о потенциальных рисках и преимуществах, а также о характере предстоящего исследования.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы данной работы заявляют, что у них нет конфликта интересов.

ВКЛАД АВТОРОВ

С.Г.Н.: оригинальная идея и схема экспериментов, анализ и интерпретация полученных данных, написание рукописи. Ж.И.И.: изучение генерации АФКХ нейтрофилами и секреторной дегрануляции, флуоресцентная микроскопия, интерпретация результатов. К.Е.И.: исследование жизнеспособности нейтрофилов, обсуждение результатов. С.В.Л. и К.Г.А.: химический синтез N-ацилпроизводных пространственно экранированного амина фенола. А.Н.В.: изучение влияния амина фенолов на свободнорадикальные процессы в модельных системах. К.А.В.: выделение клеток, подготовка образцов для анализа, проведение измерений. Все авторы прочитали окончательную версию рукописи и согласились с ней.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Бизунок Н. А., Дубовик Б. В., Ксендзова Г. А., Сорокин В. Л., Шадыро О. И. 2011. Антиоксидантный потенциал аминсодержащих производных фенола на модели генерации активных форм кислорода фагоцитами. Известия НАН Беларуси, серия мед. наук. Т. 2011. № 4. С. 61. (Bizunok N. A., Dubovik B. V., Ksendzova G. A., Sorokin V. L., Shadyro O. I. 2011. Antioxidant potential of amino-containing phenol derivatives on the model on of reactive oxygen species generation by phagocytes. № 4. P. 61.)
- Рощупкин Д. И., Белакина Н. С., Мурина М. А. 2006. Усиленная люминолом хемилуминесценция полиморфноядерных лейкоцитов кролика: природа оксидантов, непосредственно вызывающих окисление люминола. Биофизика. Т. 51. № 1. С. 99. (Roshchupkin D. I., Belakina N. S., Murina M. A. 2006. Luminal-enhanced chemiluminescence of rabbit polymorphonuclear leukocytes: the nature of oxidants directly responsible for luminal oxidation, Biofizika. V. 51. № 1. P. 99.)
- Шадыро О. И., Сорокин В. Л., Ксендзова Г. А., Савинова О. В., Самович С. Н., Бореко Е. И. 2019. Сравнительная оценка противогерпетической активности веществ с различным механизмом действия. Химико-фарм. ж. Т. 53. № 7. С. 45. (Shadyro O. I., Sorokin V. L., Ksendzova G. A., Savinova O. V., Samovich S. N., Boreko E. I. 2019. Comparative evaluation of the antiherpes activity of compounds with different mechanisms of action. Pharm. Chem. J. V. 53. P. 646.)
- Arnhold J. 2020. The dual role of myeloperoxidase in immune response. Int. J. Mol. Sci. V. 21: 8057.
- Babior B. M. 2000. Phagocytes and oxidative stress. Am. J. Med. V. 109. P. 33.
- Bedouhène S, Dang P. M., Hurtado-Nedelec M., El-Benna J. 2020. Neutrophil degranulation of azurophil and specific granules. Methods Mol. Biol. V. 2087. P. 215.
- Böyum A. 1976. Isolation of lymphocytes, granulocytes and macrophages. Scand. J. Immunol. V. 5. P. 9.
- Da Cruz Nizer W. S., Inkovskiy V., Overhage J. 2020. Surviving reactive chlorine stress: responses of gram-negative bacteria to hypochlorous acid. Microorganisms. V. 8: 1220.
- Davies M. J., Hawkins C. L. 2020. The role of myeloperoxidase in biomolecule modification, chronic inflammation, and disease. Antioxid. Redox. Signal. V. 32. P. 957.
- Dupré-Crochet S., Erard M., Nüße O. 2013. ROS production in phagocytes: why, when, and where? J. Leukoc. Biol. V. 94. P. 657.
- Gamaley I. A., Kirpichnikova K. M., Klyubin I. V. 1994. Activation of murine macrophages by hydrogen peroxide. Cell Signal. V. 6. P. 949.
- Hawkins C. L. 2020. Hypochlorous acid-mediated modification of proteins and its consequences. Essays Biochem. V. 64. P. 75.
- Hawkins C. L., Pattison D. I., Davies M. J. 2003. Hypochlorite-induced oxidation of amino acids, peptides and proteins. Amino Acids. V. 25. P. 259.
- Kato F., Tanaka M., Nakamura K. 1999. Rapid fluorometric assay for cell viability and cell growth using nucleic acid staining and cell lysis agents. Toxicol. in Vitro. V. 13. P. 923.
- Kavalenka A. I., Semenkova G. N., Cherenkevich S. N. 2007. Effects of hydrogen peroxide on neutrophil ability to generate reactive oxygen and chlorine species and to secrete myeloperoxidase in vitro. Cell Tiss. Biol. V. 1. P. 551.
- Kuznetsova T., Kulahava T., Zholnerevich I., Amaegberi N., Semenkova G., Shadyro O., Arnhold J. 2017. Morphometric characteristics of neutrophils stimulated by adhesion and hypochlorite. Mol. Immunol. V. 87. P. 317.
- Lacy P. 2006. Mechanisms of degranulation in neutrophils. Allergy Asthma Clin. Immunol. V. 2. P. 98.
- Li Y., Zhu H., Kuppasamy P., Roubaud V., Zweier J. L., Trush M. A. 1998. Validation of lucigenin (bis-N-methylacridinium) as a chemiluminescent probe for detecting superoxide anion radical production by enzymatic and cellular systems. J. Biol. Chem. V. 273. P. 2015.
- Liu L., Dahlgren C., Elwing H., Lundqvist H. 1996. A simple chemiluminescence assay for the determination of reactive oxygen species produced by human neutrophils. J. Immunol. Meth. V. 192. P. 173.
- Malle E., Waeg G., Schreiber R., Gröne E. F., Sattler W., Gröne H. J. 2000. Immunological evidence for the my-

- eloperoxidase/H₂O₂/halide system in human atherosclerotic lesions. *Eur. J. Biochem.* V. 267. P. 4495.
- Mayadas T. N., Cullere X., Lowell C. A. 2014. The multifaceted functions of neutrophils. *Annu. Rev. Pathol. Mech. Dis.* V. 9. P. 181.
- Morris G., Gevezova M., Sarafian V. Maes M. 2022. Redox regulation of the immune response. *Cell Mol. Immunol.* V. 19. P. 1079.
- Nussbaum C., Klinke A., Adam M., Baldus S., Sperandio M. 2013. Myeloperoxidase: a leukocyte-derived protagonist of inflammation and cardiovascular disease. *Antioxid. Redox Signal.* V. 18. P. 692.
- Ramachandra C. J. A., Ja K. P. M. M., Chua J., Cong S., Shim W., Hausenloy D. J. 2020. Myeloperoxidase as a multifaceted target for cardiovascular protection. *Antioxid. Redox Signal.* V. 32(15). P. 1135.
- Rizo-Téllez S. A., Sekheri M., Filep J. G. 2022. Myeloperoxidase: Regulation of neutrophil function and target for therapy. *Antioxidants.* V. 11(11). P. 2302.
- Shadyro O., Lisovskaya A., Semenkova G., Edimecheva I., Amaegberi N. 2015. Free-radical destruction of sphingolipids resulting in 2-hexadecenal formation. *Lipid Insights.* V. 8. P. 1.
- Shadyro O. I., Ksendzova G. A., Polozov G. I., Sorokin V. L., Boreko E. I., Savinova O. V., Dubovik B. V., Bizunok N. A. 2008. Synthesis and study of anti-radical and antiviral properties of aminophenol derivatives. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* V. 18. P. 2420.
- Shugar D. 1952. The measurement of lysozyme activity and the ultra-violet inactivation of lysozyme. *Biochim. Biophys. Acta.* V. 8. P. 302.
- Tzikas S., Schlak D., Sopova K., Gatsiou A., Stakos D., Stamatelopoulos K., Stellos K., Laske C. 2014. Increased myeloperoxidase plasma levels in patients with Alzheimer's disease. *J. Alzheimers Dis.* V. 39. P. 557.
- Ulfig A., Leichert L. I. 2021. The effects of neutrophil-generated hypochlorous acid and other hypohalous acids on host and pathogens. *Cell. Mol. Life Sci.* V. 78. P. 385.
- Zeng M. Y., Miralda I., Armstrong C. L., Uriarte S. M., Bagaitkar J. 2019. The roles of NADPH oxidase in modulating neutrophil effector responses. *Mol. Oral Microbiol.* V. 34(2). P. 27.

N-ACYL DERIVATIVES OF 2-AMINO-4,6-DI-TERT-BUTYLPHENOL — POTENTIAL PROTECTORS UNDER NEUTROPHIL-INDUCED HALOGENATING STRESS

G. N. Semenkova^a, I. I. Zholnerevich^b, E. I. Kovalenko^b, G. A. Ksendzova^c, V. L. Sorokin^b,
N. V. Amaegberi^b*, A. V. Klimovich^b

^a Research Laboratory of the Belarusian State Medical University, Minsk, 220083, Belarus

^b Belarusian State University, Minsk, 220030, Belarus

^c Research Institute for Physical Chemical Problems, Belarusian State University, Minsk, 220030, Belarus

*e-mail: n.amaegberi@gmail.com

The effect of N-acyl derivatives of 2-amino-4,6-di-tert-butylphenol on the functions of neutrophils was studied. It has been established that these derivatives with a free hydroxyl group in the benzene ring, in contrast to O-methylated ones, modify the properties of cells, which is expressed in a decrease in hypochlorous acid generation during the "respiratory burst" formation. These compounds are scavengers of HOCl/OCl⁻ generated by activated neutrophils and reduce the secretion of myeloperoxidase (MPO) from cells. N-(3,5-di-tert-butyl-2-hydroxyphenyl)acetamide has been shown to be the most effective hypochlorous acid scavenger. This substance significantly suppresses the secretory degranulation of neutrophils and has a cytoprotective effect under conditions of halogenating stress.

Keywords: aminophenols, neutrophils, reactive oxygen and chlorine species, secretory degranulation, viability