

Antiradikálová aktivita látek s potenciálním účinkem na kardiovaskulární systém

OPATŘILOVÁ R., KUPKOVÁ Z., CSÖLLEI J.

Veterinární a farmaceutická univerzita Brno, Farmaceutická fakulta, Ústav chemických léčiv

Došlo: 24. června 2008 / Přijato: 1. července 2008

SOUHRN

Antiradikálová aktivita látek s potenciálním účinkem na kardiovaskulární systém

Po objevení antioxidační ochrany biologických systémů se volné radikály a jejich účinky staly předmětem intenzivního výzkumu v procesu různých typů onemocnění. Práce je zaměřena na studium antiradikálové aktivity látek ze skupiny heteroarylethanolaminů. Místem působení těchto látek je kardiovaskulární systém, kde mohou vznikat endotelové dysfunkce, probíhá oxidace cholesterolu aj. Vysocí reaktivním volným radikálem je oxid dusnatý (NO.), vznikající endogenně působením enzymu NO-syntasy (NOS). Hlavním rozkladným produktem vodného roztoku oxidu dusnatého jsou dusitany, které se v přítomnosti hemoproteinů oxidují až na dusičnany. Základní metodou detekce oxidačních produktů oxidu dusnatého je Griessova metoda založená na spektrofotometrickém stanovení dusitanů po diazotaci sulfanilamidu a kopulaci s *N*-(1-naftyl)-etylendiaminem s detekcí v oblasti při 540 nm. Antioxidanty, látky, které organismus využívá k neutralizaci některých volných radikálů, reagují na principu oxidace – redukce. Pro průkaz antioxidační aktivity byla zvolena metoda bromometrie. V bromometrii po reakci bromidu a bromičnanu vzniká elementární brom, který je vlastním oxidačním činidlem. Tento vzniklý brom se může, v našich laboratorních podmínkách, považovat za „volný radikál“ schopný oxidovat další systémy. Na tomto modelu lze stanovit, jak velkou antioxidační kapacitu má sledovaná látka. Obě metody byly porovnány s metodou pro hodnocení antiradikálové aktivity pomocí stabilního radikálu 2,2-difenyl-1-pikrylhydrazylu (DPPH).

Klíčová slova: antioxidační aktivita – Griess – DPPH – bromometrie

Čes. slov. Farm., 2008; 57, 177–180

SUMMARY

Antiradical activity of substances with a potential effect on the cardiovascular system

After the discovery of the antioxidant protection of biological systems, free radicals and their effects became the subject of intensive research in the process of various types of diseases. The paper focuses on the study of antiradical activity of substances from the group of heteroarylethanolamines. The site of action of these substances is the cardiovascular system, where endothelial dysfunctions may develop, oxidation of cholesterol takes place, etc. A highly reactive free radical is dinitrogen oxide (NO.), developing endogenously by the action of NO-synthase (NOS) enzyme. The principal disintegration product of an aqueous solution of nitrogen oxide are nitrites, which in the presence of hemoproteins oxidize to produce nitrates. The principal method of detection of the oxidative products of nitrogen oxide is the Griess method based on spectrophotometric determination of nitrites after diazotation of sulfanilamide and copulation with *N*-(1-naphthyl)-ethylene diamine with detection in the region at 540 nm. Antioxidants, substances which the organism uses to neutralize some free radicals, react on the principle of oxidation–reduction. The method of bromometry was selected to demonstrate antioxidative activity. In bromometry, the reaction of bromide and bromate gives rise to elementary bromine, which is the oxidative reagent itself. This developed bromine may, under our laboratory conditions, be considered to be “a free radical” capable of oxidizing other systems. This model makes it possible to determine how large the antioxidative capacity of the substance under study is. Both methods

Adresa pro korespondenci:

Ing. PharmDr. Radka Opatřilová, Ph.D.
Ústav chemických léčiv FaF VFU
Palackého 1–3, 612 42 Brno
e-mail: opatrilovar@vfu.cz

were compared with the method for the evaluation of antiradical activity by means of the stable radical 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH).

Key words: antioxidant activity – Griess – DPPH – bromometry

Čes. slov. Farm., 2008; 57, 177–180

Má

Úvod

Volné radikály, jejich účinky a antioxidační ochrana biologických systémů se staly předmětem intenzivního výzkumu v procesu různých typů onemocnění nejenom kardiovaskulárního systému, vzniku aterosklerotických plaků, ale i diabetes mellitus a mnoha dalších. Oxidační stres může být vyvolán nedostatečnou funkcí buněčného ochranného systému, ischemií (nedostatkem kyslíku), UV zářením, metabolickým stresem, zánětem, otravou, věkem nebo kouřením. Tyto změny následně vedou například ke zvýšenému ukládání cholesterolu do cévní stěny a k rozvoji druhotných onemocnění – např. hypertenze ¹⁾.

Práce je zaměřena na studium antioxidační a antiradikálové aktivity látek potenciálně vhodných pro použití v terapii hypertenze, ischemické choroby srdeční a infarktu myokardu ze skupin aryloxyaminopropanolů, heteroarylethanolaminů a heteroarylethanonaminů s potenciálním antiadrenergním a antidysrhythmickým účinkem. Místem působení těchto látek je kardiovaskulární systém, kde mohou vznikat endotelové dysfunkce vlivem porušení rovnováhy mezi vznikem a odstraňováním volných radikálů.

Oxid dusnatý (NO.) je vysoce reaktivním volným radikálem, vzniká endogenně působením enzymu NO-syntasy (NOS) spolu s L-citrullinem z L-argininu. Účastní se regulace hemodynamiky, působí při neurotransmisí, v modulaci zánětu aj. Hlavním rozkladným produktem vodného roztoku oxidu dusnatého jsou dusitany, které se v přítomnosti hemoproteinů oxidují až na dusičnany. Látky reagující s NO, kompeticí s kyslíkem, snižují produkci dusitanů ²⁾.

Griessova reakce je základní metodou detekce oxidačních produktů oxidu dusnatého. Je založena na spektrofotometrickém stanovení dusitanů po diazotaci sulfanilamidu a kopulaci s *N*-(1-naftyl)ethylendiaminem s detekcí v oblasti při vlnové délce 540 nm ³⁾.

Významné je postupné přidávání obou složek Griessova činidla pro dosažení maximální citlivosti testu. Pokud reaguje postupně kyselý roztok sulfanilamidu a pak teprve sůl *N*-(1-naftyl)ethylendiaminu je reakce téměř třikrát citlivější, než v případě, kdy se obě složky smíchají před přidáním do reakční směsi ⁴⁾.

Antioxidanty, látky, které organismus využívá k neutralizaci některých volných radikálů, mohou reagovat na principu oxidace – redukce. Pro průkaz antioxidační aktivity byla zvolena modifikovaná analytická oxidačně-redukční metoda bromometrie, kdy reakčním činidlem je brom ve stavu zrodu, vznikající v kyselém prostředí bromičnanu draselného za přítomnosti bromidu draselného jako urychlovače reakce. Touto reakcí vzniká elementární brom, z toho název bromometrie, který je vlastním oxidačním činidlem a může se, v našich laboratorních podmínkách, považovat za „volný radikál“ schopný oxidovat další systémy. Na tomto modelu lze stanovit, jak velkou antioxidační kapacitu má sledovaná látka ⁵⁾.

Obě metody byly porovnány s metodou pro hodnocení antiradikálové aktivity pomocí stabilního radikálu 2,2-difenyl-1-picrylhydrazylu (DPPH) ⁶⁾.

Studované látky s pracovními názvy 4/1M až 4/6M a 4E/1 až 4E/6 byly syntetizovány dr. Kurfürstem ⁷⁾ jako potenciální antagonisté β -adrenergních receptorů. Jsou to deriváty ze skupiny heteroarylaminoethanolu. Aromatickou částí je 3-alkylbenzofuran, báze pak aryl-

Tab. 1. 2-[4-(4-aryl)piperazin-1-yl]-1-(3-alkylbenzofuran -2-yl) ethan-1-ol ve formě hydrochloridů

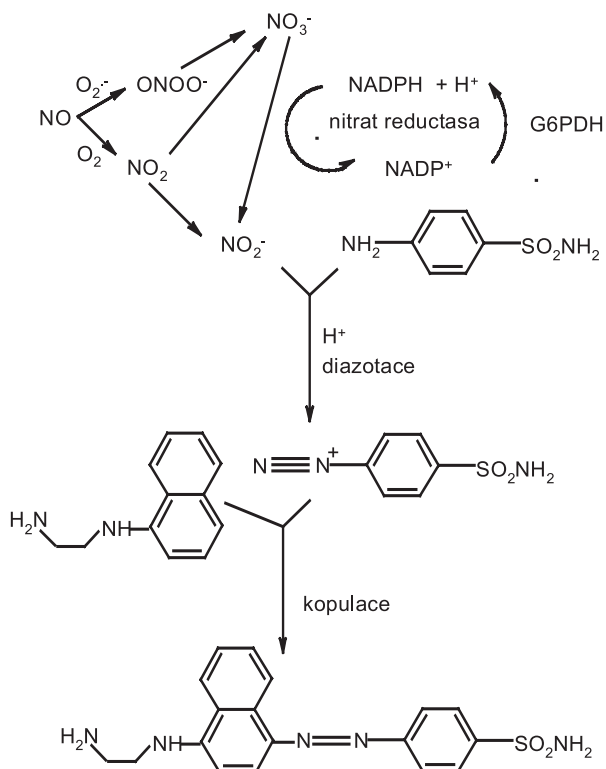
| Látka | R ¹ | R ² | sumární vzorec | molekulová hmotnost |
|-------|---------------------------------|---------------------|--|---------------------|
| 4/1M | CH ₃ - | 4 -F | C ₂₁ H ₂₃ N ₂ O ₂ F | 354,43 |
| 4/2M | CH ₃ - | 2 -OCH ₃ | C ₂₂ H ₂₆ N ₂ O ₃ | 366,46 |
| 4/3M | CH ₃ - | 2 -F | C ₂₁ H ₂₃ N ₂ O ₂ F | 354,43 |
| 4/4M | CH ₃ - | 2 -CH ₃ | C ₂₃ H ₂₆ N ₂ O ₂ | 350,46 |
| 4/5M | CH ₃ - | 3 -CF ₃ | C ₂₂ H ₂₃ N ₂ O ₂ F ₃ | 404,44 |
| 4/6M | CH ₃ - | -H | C ₂₁ H ₂₃ N ₂ O ₂ | 336,44 |
| 4/1E | C ₂ H ₅ - | 4 -F | C ₂₂ H ₂₅ N ₂ O ₂ F | 368,46 |
| 4/2E | C ₂ H ₅ - | 2 -OCH ₃ | C ₂₃ H ₂₈ N ₂ O ₃ | 380,49 |
| 4/3E | C ₂ H ₅ - | 2 -F | C ₂₂ H ₂₅ N ₂ O ₂ F | 368,46 |
| 4/4E | C ₂ H ₅ - | 2 -CH ₃ | C ₂₃ H ₂₈ N ₂ O ₂ | 364,49 |
| 4/5E | C ₂ H ₅ - | 3 -CF ₃ | C ₂₃ H ₂₅ N ₂ O ₂ F ₃ | 418,46 |
| 4/6E | C ₂ H ₅ - | -H | C ₂₂ H ₂₆ N ₂ O ₂ | 350,46 |

piperazin. Oba fragmenty spojuje ethanolový můstek. Na tyto látky lze pohlížet jako na analogy aryloxyaminopropanolu, u kterého se oxymethylenová část spojovacího řetězce stala součástí furanového kruhu kondenzovaného s benzenem. Struktura studovaných látek a jejich sumární vzorec a molekulová hmotnost jsou uvedeny v tabulce 1.

POKUSNÁ ČÁST

Griessova reakce (obr. 1) – oxid dusnatý byl vyroben reakcí 3 mol.l⁻¹ roztoku kyseliny sírové s dusitanem sodným v inertní atmosféře (argon). Vzniklé vyšší oxidy dusíku zachyceny v koncentrovaném roztoku hydroxidu sodného a po vysušení koncentrovanou kyselinou sírovou získán čistý oxid dusnatý, kterým je sycena odplyněná voda. Vodný roztok oxidu dusnatého (0,5 ml) a stejné množství vodného roztoku zkoumané látky o koncentraci 1 mmol.l⁻¹ je inkubováno při 30 °C po dobu 45 min. Po ukončení inkubace jsou do roztoku přidána Griessova činidla – 0,5 ml roztoku 2% sulfanilamidu rozpuštěného v 4% kyselině fosforečné a 0,5 ml vodného 0,2% roztoku *N*-(1-naftyl)etylendiaminu. Po 10 minutách ve tmě je měřena absorbance při 540 nm na přístroji spektrofotometr HP 8453. Koncentrace NO jako nitritu je počítána z kalibrační křivky dusitanu sodného ($y = 485,64x - 0,0001$; $R^2 = 0,9999$).

Brom – reakcí bromičnanu draselného s bromidem draselným v kyselém prostředí kyseliny sírové 0,8 mol.l⁻¹ vzniká ekvivalentní množství bromu. V přítomnosti stu-



Obr. 1. Griessova reakce

dované látky může reagovat vznikající brom radikálově, substitučně anebo adičně. Průběh reakce – množství nespotřebovaného bromu v čase je zjišťováno z kalibrační křivky $A = f(c)$ spektrofotometricky při 360 nm, kde $y = 19131x - 0,0923$; $R^2 = 0,9879$.

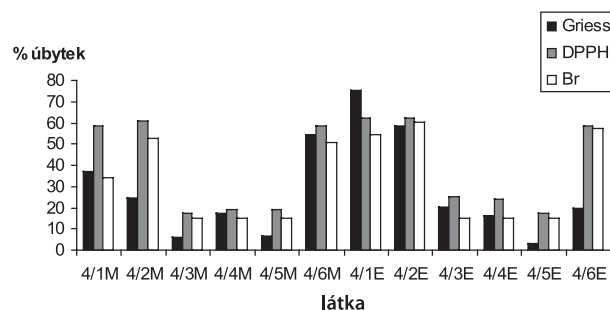
DPPH – stabilní radikál 2,2-difeny-1-pikrylhydrazyl byl připraven v koncentraci 1.10⁻⁴ mol.l⁻¹ rozpuštěním v methanolu. Pro sledování antiradikálové aktivity byla opět použita spektrofotometrie ve viditelné oblasti ($\gamma = 517$ nm), kde byl úbytek radikálu sledován po přidání roztoku studované látky ve stejné koncentraci. Výsledky byly korigovány slepým pokusem. Rovnice přímky $y = 12650x + 0,005$; $R^2 = 0,9997$.

VÝSLEDKY A DISKUZE

Pomocí tří metod se spektrofotometrickou detekcí byla hodnocena antiradikálová a antioxidační aktivita série dvanácti derivátů 2-(4-arylpiperazin-1-yl)-1-(3-alkylbenzofuran-2-yl)ethanolu, připravených v Ústavu chemických léčiv ve formě soli (hydrochloridu) ⁷⁾.

Griessovou reakcí (hodnocení aktivity látek vychytáváním oxidu dusnatého), bromometricky (brom ve stavu zrodu) a metodou pomocí stabilního radikálu DPPH, vykazovala nejvyšší aktivitu, látka s pracovním označením 4/1E, dále silnou antiradikálovou aktivitu vykazovaly i látky pracovním označením 4/2E a 4/6M. Pro účinek je patrně více důležitá substituce na arylpiperazinu než na benzofuranovém jádře, kde je navázána v poloze 3 methyl- nebo ethyl- skupina.

Na arylu v poloze 4- na piperazin je u 4/1 a 4/1E v poloze vázán fluor. Pokud je v poloze 2- (4/3M; 4/3E), aktivita výrazně klesá. V případě substituce methoxyem do polohy 2- (4/2M a 4/2E) je účinek vyšší, než pokud je zde navázán pouhý methyl (4/4, 4/4E). Látky 4/6 a 4/6E nemají na arylu substituent a jejich antiradikálový efekt patří k nejméně výrazným. Deriváty substituované v poloze 3-trifluormethylem mají účinnost nejnižší (obr. 2).



Obr. 2. Srovnání účinnosti zhašení radikálů

Pravděpodobně z hlediska strukturálních vztahů a účinku sehrává příznivou roli kladný mezomerní efekt elektronegativních substituentů navázaných na aromatickém jádře. Pro maximální účinek je tedy důležitá volná hydroxylová skupina a nesubstituovaný arylpiperazinový

zbytek nebo substituce arylu fluorem navázaným v poloze 4, případně methoxyskupinou v poloze 2.

Látky nerozpustné ve vodě byly rozpuštěny v methanolu, který ale vykazoval vlastní vysokou antioxidační aktivitu v Griessově reakci. Proto bylo prováděno měření u kontrolního roztoku obsahujícího pouze methanol a byla zjištěna antioxidační aktivita ($A_{\text{methanolu}}$) a zjištěný účinek pak byl odečten od aktivity získané při stanovení v něm rozpuštěných látek ($A_{\text{celková}}$). Rozdílem je vlastní aktivita stanovované látky ($A_{\text{celková}} - A_{\text{methanolu}}$) = $A_{\text{testované látky}}$.

Při bromometrickém stanovení nebyl zaznamenána žádná výrazná změna aktivity látek při použití vody nebo methanolu jako rozpouštědla.

Hodnocení pomocí DPPH je již v základu ovlivněno methanolem – DPPH je prakticky nerozpustný ve vodě. Žádný z kontrolních vzorků nevykazoval výraznou aktivitu, která by prokazovala vychytávání DPPH methanolem.

Pro objasnění mechanismu nitridace (Griess) byl průběh reakce s oxidem dusnatým a látkou 4/1E změřen pomocí LC-MS spektroskopie (Agilent Technologies HP 1100 LC-MSD VL Trap spektrometr). Na hmotnostním spektru nejsou vidět molekuly s hmotností menší jak 80, proto nebyl NO detegovatelný. Při nitrosaci docházelo k rozštěpení molekuly na 1-(3-alkylbenzofuran-2-yl)ethanol a příslušný derivát 4-arylpiperazinu.

Při bromometrickém stanovení vznikaly mono-, di-, tribrom deriváty látek a proběhla i adice na dvojnou vazbu benzofuranu.

Pro metodu DPPH nebyla LC-MS provedena, ale předpokládáme různé radikálové reakce, štěpení a spojení molekul aj.

ZÁVĚR

Procentuální srovnání úbytku radikálu – účinnosti potenciálního lapače radikálu všech tří metod (obr. 2) ukazuje až na malé výjimky, že látky vykazují nevýznamný rozdíl v aktivitě při použitých metodách. Tato série testovaných látek má srovnatelnou aktivitu pro tři typy radikálů, což je pravděpodobně ovlivněno jejich podobnou chemickou strukturou. Předpokládáme, že tyto metody by bylo možné využít nejen pro testování nově připravovaných látek i látek různých chemických struktur, již v klinické praxi využívaných.

LITERATURA

1. **Štípek, S.:** Antioxidanty a volné radikály ve zdraví a v nemoci. Praha, Grada, 2000.
2. **Rapisarda, P., Tomaino, A. Cascio, R.:** J Agric Food Chem., 1999; 77, 4748.
3. **Green, L. C., Wagner, A., Glogowski, J.:** Anal. Biochem., 1982; 126, 131.
4. **Crkovská, J., Štípek, S.:** Klin. Biochem. Metab., 1998; 6, 82.
5. **López-Cueto, G., Ostra, M., Ubide, C.:** Anal. Chim. Acta, 2001, 445, 117.
6. **Dovolil, J., Beneš, L.:** Čes. Slov. Farm., 2001; 50, 203.
7. **Kurfürst, P., Marek, J., Vančo, J., Csöllei, J.:** Acta Cryst., 2004; C60, 494.