

[https://doi.org/10.33380/2305-2066-2022-11-4\(1\)-27-30](https://doi.org/10.33380/2305-2066-2022-11-4(1)-27-30)
УДК 615.31



Оригинальная статья / Research article

Исследование антиоксидантной активности и квантово-химические расчеты 2-аминопирролов

С. С. Зыкова¹✉, К. Л. Ганькова¹, М. В. Шустов¹, Н. М. Игидов¹, С. С. Борисевич², М. Г. Ильина²

¹ ФГБОУ ВО «Пермская государственная фармацевтическая академия» Министерства здравоохранения Российской Федерации (ФГБОУ ВО ПГФА Минздрава России), 614990, Россия, г. Пермь, ул. Полевая, д. 2

² ФГБНУ «Уфимский федеральный исследовательский центр Российской академии наук» (Уфимский Институт химии УФИЦ РАН), 450054, Россия, Республика Башкортостан, г. Уфа, пр-т. Октября, д. 71

✉ Контактное лицо: Зыкова Светлана Сергеевна. E-mail: zykova.sv@rambler.ru

ORCID: С. С. Зыкова – <https://orcid.org/0000-0002-7395-4951>; К. Л. Ганькова – <https://orcid.org/0000-0002-7605-6129>; М. В. Шустов – <https://orcid.org/0000-0002-3379-3065>; Н. М. Игидов – <https://orcid.org/0000-0003-0976-9951>; С. С. Борисевич – <https://orcid.org/0000-0001-8481-0470>; М. Г. Ильина – <https://orcid.org/0000-0002-5552-9353>.

Статья поступила: 07.10.2022

Статья принята в печать: 23.11.2022

Статья опубликована: 27.12.2022

Резюме

Введение. Современная терапия констатирует окислительный стресс как одно из ключевых звеньев патогенеза целого ряда заболеваний, что делает поиск новых низкомолекулярных антиоксидантов актуальным [1]. Распространенные методики несовершенны, поскольку отражают реакционную способность пробы в искусственных условиях [2–4]. Предлагаемая методика применения биосенсора «Эколюм» позволяет сохранить преимущества *in vitro* методик и повысить точность определения путем использования биологических реакций клеток [5, 6].

Цель. Исследование антирадикальной и антиоксидантной активности 2-аминопирролов с применением методик *in vitro*, квантово-химических расчетов.

Материалы и методы. Ранее получены производные 2-аминопирролов. Исследование антирадикальной активности соединений осуществлялось с помощью тестаДФПГ (2,2-дифенил-1-пикрилгидразил). Антиоксидантная активность оценивалась на модели окислительного стресса с использованием биосенсора «Эколюм». Квантово-химические расчеты для оценки электронных параметров молекул проводились в газовой фазе.

Результаты и обсуждение. Данные теста антиоксидантной активности свидетельствуют о более выраженном антиокислительном потенциале вещества 2a, поскольку его применение вызвало значительное снижение уровня стресса клеточной культуры по сравнению с веществом 2b. Тестирование антирадикальной активности соединений выявило больший антирадикальный потенциал вещества 2b, что раскрывает тезис авторов об ограниченности распространенных методик исследования антиоксидантов. Квантово-химические расчеты показали, что соединение 2b характеризуется более высоким значением потенциала ионизации, что может свидетельствовать о его большей стойкости к окислению, по сравнению с 2a.

Заключение. Исследование антирадикальной и антиоксидантной активности 2-аминопирролов показало актуальность разработки методики для поиска новых антиоксидантов, поскольку тест антирадикальной активности не отразил воздействие 2-аминопирролов на культуру биосенсора. Применение квантово-химических расчетов позволило оценить реакционную способность исследуемых соединений.

Ключевые слова: антиоксиданты, культура клеток, компьютерная симуляция, *Escherichia coli*, окислительный стресс, DFT-расчеты

Конфликт интересов. Авторы декларируют отсутствие явных и потенциальных конфликтов интересов, связанных с публикацией настоящей статьи.

Вклад авторов. Н. М. Игидов, К. Л. Ганькова синтезировали соединения. С. С. Зыкова, М. В. Шустов проводили исследование активности соединений *in vitro*, С. С. Борисевич, М. Г. Ильина проводили квантово-химические расчеты.

Финансирование. Исследование проведено при финансовой поддержке Пермского научно-образовательного центра «Рациональное недропользование», 2022 год.

Для цитирования: Зыкова С. С., Ганькова К. Л., Шустов М. В., Игидов Н. М., Борисевич С. С., Ильина М. Г. Исследование антиоксидантной активности и квантово-химические расчеты 2-аминопирролов. *Разработка и регистрация лекарственных средств*. 2022;11(4–1):27–30. [https://doi.org/10.33380/2305-2066-2022-11-4\(1\)-27-30](https://doi.org/10.33380/2305-2066-2022-11-4(1)-27-30)

Study of Antioxidant Activity and Quantum-chemical Calculations of 2-aminopyrroles

Svetlana S. Zykova¹✉, Kseniya L. Gankova¹, Maxim V. Shustov¹, Nazim M. Igidov¹, Sophia S. Borisevich², Margarita G. Ilyina²

¹ Federal State Budgetary Educational Institution of Higher Education "Perm State Pharmaceutical Academy" of the Ministry of Health of the Russian Federation, 2, Polevaya str., Perm, 614990, Russia

² Ufa Institute of Chemistry, Ural Federal Research Center, Russian Academy of Sciences, 71, Oktyabrya ave., Ufa, Republic of Bashkortostan, 450054, Russia

✉ Corresponding author: Svetlana S. Zykova. E-mail: zykova.sv@rambler.ru

ORCID: Svetlana S. Zykova – <https://orcid.org/0000-0002-7395-4951>; Kseniya L. Gankova – <https://orcid.org/0000-0002-7605-6129>; Maxim V. Shustov – <https://orcid.org/0000-0002-3379-3065>; Nazim M. Igidov – <https://orcid.org/0000-0003-0976-9951>; Sophia S. Borisevich – <https://orcid.org/0000-0001-8481-0470>; Margarita G. Ilyina – <https://orcid.org/0000-0002-5552-9353>.

Received: 07.10.2022

Revised: 23.11.2022

Published: 27.12.2022

© Зыкова С. С., Ганькова К. Л., Шустов М. В., Игидов Н. М., Борисевич С. С., Ильина М. Г., 2022

© Zykova S. S., Gankova K. L., Shustov M. V., Igidov N. M., Borisevich S. S., Ilyina M. G., 2022

Abstract

Introduction. Modern therapy defines oxidative stress as one of the key links in the pathogenesis of different diseases, which makes the search for new low molecular weight antioxidants actual [1]. The widely used methods are imperfect, since they reflect reactivity of the sample under artificial conditions [2–4]. The proposed technique of using the "Ecolum" biosensor makes it possible to preserve the advantages of *in vitro* methods and improve the accuracy of determination through the use of biological reactions of cells [5, 6].

Aim. Studying of the antiradical and antioxidant activity of 2-aminopyrroles, using *in vitro* methods and quantum-chemical calculations.

Materials and methods. Earlier, derivatives of 2-aminopyrroles were obtained. Antiradical activity of the compounds was studied using the DPPH test (2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl). Antioxidant activity was evaluated on the model of oxidative stress using the «Ecolum» biosensor. The calculation data of the indices of reactivity in the approximation of the gas phase were obtained using quantum-chemical methods.

Results and discussion. The antioxidant activity test indicated a higher antioxidant potential of 2a, compared to 2b. Antiradical activity test revealed a greater antiradical potential of 2b. Quantum-chemical calculations showed that 2b is characterized by a higher ionization potential, which may indicate its greater resistance to oxidation compared to 2a.

Conclusion. The study of the antiradical and antioxidant activity of 2-aminopyrroles showed the importance of developing a methodology for the search for new antioxidants, because of antiradical activity test deviations, compared to living cell reactions.

Keywords: Antioxidants, Cells, Cultured, Computer Simulation, *Escherichia coli*, Oxidative Stress

Conflict of interest. The authors declare that they have no obvious and potential conflicts of interest related to the publication of this article.

Contribution of the authors. Nazim M. Igidov, Kseniya L. Gankova synthesized compounds. Svetlana S. Zykova, Maxim V. Shustov studied the activity of compounds *in vitro*, Sophia S. Borisevich, Margarita G. Ilyina carried out quantum chemical calculations.

Funding. The study was carried out with the financial support of the Perm Scientific and Educational Center "Rational Subsoil Use", 2022.

For citation: Zykova S. S., Gankova K. L., Shustov M. V., Igidov N. M., Borisevich S. S., Ilyina M. G. Study of antioxidant activity and quantum-chemical calculations of 2-aminopyrroles. *Drug development & registration*. 2022;11(4–1):27–30. (In Russ.) [https://doi.org/10.33380/2305-2066-2022-11-4\(1\)-27-30](https://doi.org/10.33380/2305-2066-2022-11-4(1)-27-30)

ВВЕДЕНИЕ

Современная терапия констатирует окислительный стресс как одно из ключевых звеньев патогенеза целого ряда заболеваний, что делает поиск новых низкомолекулярных антиоксидантов актуальным [1]. Широко используемые методики определения антиоксидантной активности рассматривают оценку антиоксидантного потенциала на основе одной химической реакции, что позволяет ускорить процесс определения и эффективно сравнивать в рамках метода различные соединения, однако, фактически результат отражает лишь реакционную способность пробы в определенных, сугубо искусственных условиях [2–4]. Нами предложена методика применения биосенсора «Эколюм», представляющего собой культуру *E. coli*, обладающую биолюминесценцией, зависящей от токсического воздействия на биосенсор, при определении антиоксидантного потенциала соединений путем воздействия на культуру биосенсора исследуемого вещества и раствора перекиси водорода. Применение биосенсора позволяет сохранить преимущества *in vitro* методик и повысить точность определения за счет использования биологических реакций клеток, расширяя спектр изучаемых механизмов антиоксидантной активности [5, 6]. При разработке нового метода определения антиоксидантной активности *in vitro* использовались результаты ДФПГ-теста антирадикальной активности для определения сходимости с результатами классических *in vitro* тестов антиоксидантной активности, а также квантово-химические расчеты, позволяющие оценить реакционную способность соединений в биологических системах за счет определения физико-химических параметров мо-

лекулы. Исследование антиоксидантной и антирадикальной активности 2-аминопирролов дополняет актуальность исследования, поскольку позволяет раскрыть возможности перспективной группы веществ-цитостатиков, действие которых на опухолевую ткань может быть дополнено нарушением патологического баланса свободных форм кислорода [7–10].

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Синтетическая часть

Для проведения данного исследования были получены производные 2-аминопирролов (рисунок 1).

К раствору 1,71 г (0,005 моль) N-[5-(нафталин-2-ил)-2-оксофуран-3 (2 H)-илиден]бензогидразида в 40 мл безводного толуола добавляли 0,56 г (0,005 моль) этилового эфира или 0,42 г (0,005 моль) амида циануксусной кислоты, и 0,5 г (0,005 моль) триэтиламина. Полученную смесь нагревали в течение 30–120 мин, затем охлаждали до 0 °С. Осадок отфильтровывали и перекристализовывали из этанола (2a), из метанола (2b).

Фармакологическая часть

Антирадикальную активность исследовали с помощью метода связывания стабильного радикала 2,2-дифенилпикрил-1-гидразилом (ДФПГ или DPPH), связывание радикалов которого исследуемыми соединениями определяли по величине оптической плотности, которую устанавливали спектрофотометрически. Концентрация ДФПГ в 96%-м этаноле составляла $6,5 \times 10^{-5}$ М. В кювету СФ-2000 объемом 3 мл добавляли смесь 10 мкл раствора исследуемого ве-

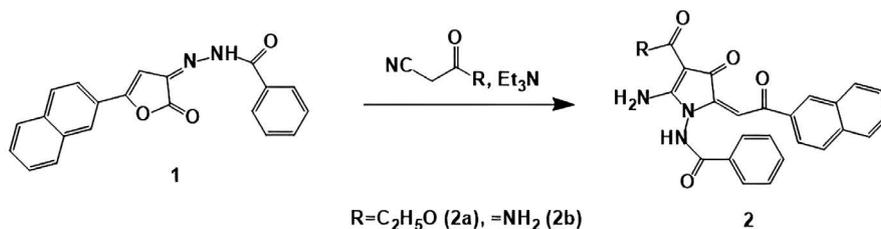


Рисунок 1. Общий путь синтеза производных 2-аминопирролов

Figure 1. General route for the synthesis of 2-aminopyrrole derivatives

щества в диметилсульфоксиде (ДМСО) (1 мМ в 1 мл), 1 мл ТРИС-буферного раствора, 1 мл этанола 95 %. После измерения оптической плотности исследуемого вещества при длине волны 517 нм к смеси добавляли 1 мл раствора ДФПГ, перемешивали и выдерживали в темном прохладном месте в течение 30 минут, после чего проводили повторное измерение оптической плотности. Ингибирующий эффект рассчитывали по формуле:

$$Q = 100 (D_0 - D_x) / D_0 \quad (1)$$

где D_0 – оптическая плотность контрольного раствора ДФПГ; D_x – оптическая плотность раствора ДФПГ в присутствии исследуемого вещества либо раствора эталона сравнения за вычетом оптической плотности раствора, измеренной до добавления ДФПГ. В качестве эталона сравнения использовался тролокс (Trolox) – водорастворимая форма витамина E (Sigma-Aldrich, США).

Ингибирование флуоресцентной активности при окислительном стрессе биосенсора «Эколюм» в присутствии перекиси водорода проводилось с использованием ридера для микропланшет Synergy™ H1 (BioTek, США). В лунку 96-луночного планшета помещались 100 мкл. среды ГРМ № 3 (ФБУН ГНЦ ПМБ, Россия), 50 мкл. культуры клеток биосенсора «Эколюм», 25 мкл раствора исследуемого вещества в ДМСО (5 мг вещества растворялось в 1 мл ДМСО), либо контрольный объем ДМСО, а также 25 мкл 3 % раствора перекиси водорода. Определение флуоресценции проводили после экспозиции 40 мин при температуре 37 °C при длине волны возбуждения 490 нм и длине волны флуоресценции 585 нм. Определялось среднее значение трех повторностей, полученные значения использовались в формуле:

$$\text{ИФА} = (X_1 - X_2) / X_1 \times 100 \%, \quad (2)$$

где X_1 – флуоресценция лунки контроля ДМСО; X_2 – флуоресценция лунки с исследуемым веществом.

Квантово-химическая часть

Все квантово-химические расчеты проводились на кластерном суперкомпьютере Уфимского института химии УФИЦ РАН. Использовали программное обеспечение Gaussian 16 rev., revision C.01, C.09 (Gaus-

sian Inc., США). Для оптимизации и решения колебательной задачи использовали метод M06-2X [11] с базисным набором cc-pVTZ [12]. Расчеты для определения электронных параметров исследуемых соединений проводили в приближении газовой фазы. Потенциал ионизации (IP) оценивался как разница в значениях энтальпий зарытой нейтральной (close-shell) и открытой (open-shell) оболочек атомно-молекулярных систем. Сродство к электрону (EA) похожим способом. Значение HOMO-LUMO gap оценивается как разница в значениях сродства к электрону и потенциала ионизации. Величина энергетического зазора используется для нахождения связи между электронной структурой и активностью молекул, а также характеризует их донорно-акцепторные и окислительно-восстановительные свойства. Значения IP и EA позволили оценить индексы реакционной способности молекул: «жесткость», «мягкость» и значения электроотрицательности и индекса электрофильности.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Фармакологическая часть

Как видно из таблицы 1, вещества не оказали антиокислительного влияния, проявив цитотоксическое действие. Как видно из таблицы, вещества оказали умеренное антирадикальное действие.

Таблица 1. Результаты антиоксидантной и антирадикальной активности производных 2-аминопиррола

Table 1. Results of antioxidant and antiradical activity of 2-aminopyrrole derivatives

№	Соединения Compounds	Ингибирование флуоресцентной активности, % Fluorescent activity inhibition, %	Убыль радикалов, % Loss of radicals, %
1	2a	4,65	10,27
2	2b	15,09	15,84
3	Тролокс Trolox	-0,30	43,65

Квантово-химическая часть

Геометрические параметры соединений 2a и 2b различаются природой заместителя. Вероятно, по этой причине практически все индексы реакционной способности молекул схожи (таблица 2). Замет-

ные различия наблюдаются лишь в значениях потенциала ионизации. Большее значение IP характерно для 2b (на 0,22 эВ), что позволяет предположить большую стойкость к окислению.

Таблица 2. Рассчитанные значения электронных параметров изучаемых соединений

Table 2. Calculated values of the electronic parameters of the studied compounds

ID	IP, eV	EA, ev	H-L gap	η	S	χ	ω
2a	7,82	1,35	–,47	3,24	0,15	4,59	34,02
2b	8,04	1,49	–6,55	3,28	0,15	4,76	37,16

Молекулярный электростатический потенциал (MEP) [13] широко используется для предсказания нуклеофильных и электрофильных сайтов, а также молекулярного распознавания, поскольку молекулы всегда стремятся комплементарно сближаться друг с другом согласно величинам ESP (рисунок 2).

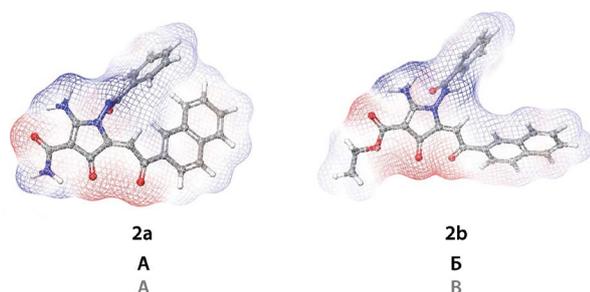


Рисунок 2. Локальные минимумы (на рисунке отображены, синим цветом) и максимумы (на рисунке отображены красным цветом) электростатического потенциала (ESP) на Ван-дер-Ваальсовой поверхности для соединений 2a и 2b

Figure 2. Local minima (shown in blue in the figure) and maxima (shown in red in the figure) of the electrostatic potential (ESP) on the van der Waals surface for compounds 2a and 2b

Для соединения 2a минимум ESP составляет –78,69 ккал/моль, для соединения 2b – –87,45 ккал/моль. Что касается максимумов на поверхности Ван-дер-Ваальса, здесь для 2a составляет 81,32 ккал/моль, для 2b – 79,98 ккал/моль.

ОБСУЖДЕНИЕ

Таким образом, исследуемые вещества 2a и 2b в тесте антиоксидантной активности с использованием биосенсора «Эколюм» показали наличие цитотоксического действия, выраженного в угнетении флуоресценции биосенсора по сравнению с веществом сравнения, однако, данные свидетельствуют о более выраженном антиокислительном потенциале вещества 2a, поскольку его применение вызвало трехкратное снижение уровня стресса клеточной культуры по сравнению с веществом 2b. Тестирование антирадикальной активности соединений выявило больший антирадикальный потенциал вещества 2b, что раскрывает тезис авторов о ограниченности распространенных методик исследования антиоксидантов. Согласно данным квантово-химических расчетов можно

предположить, что реакционная способность молекул 2a и 2b в целом схожая. Однако соединение 2b характеризуется более высоким значением потенциала ионизации, что может свидетельствовать об его большей стойкости к окислению, по сравнению с 2a.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Исследование антирадикальной и антиоксидантной активности 2-аминопирролов *in vitro* показало актуальность разработки методики для поиска новых низкомолекулярных антиоксидантов, поскольку применение распространенных *in vitro* методик для скрининга не отразило воздействие 2-аминопирролов на уровне взаимодействия с живыми клетками, что свидетельствует о протекании иных процессов, обуславливающих антиоксидантный потенциал образцов. Квантово-химические расчеты показали возможную причину различной активности соединений.

ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

1. Forman H. J., Zhang H. Targeting oxidative stress in disease: promise and limitations of antioxidant therapy. *Nature Reviews Drug Discovery*. 2021;20(9):689–709. DOI: 10.1038/s41573-021-00233-1.
2. Munteanu I. G., Apetrei C. Analytical Methods Used in Determining Antioxidant Activity: A Review. *International Journal of Molecular Sciences*. 2021;22(7):3380. DOI: 10.3390/ijms22073380.
3. Nwachukwu I. D., Sarteshnizi R. A., Udenigwe C. C., Aluko R. E. A Concise Review of Current In Vitro Chemical and Cell-Based Antioxidant Assay Methods. *Molecules*. 2021;26(16):4865. DOI: 10.3390/molecules26164865.
4. Gulcin I. Antioxidants and antioxidant methods: an updated overview. *Archives of Toxicology*. 2020;94(3):651-715. DOI: 10.1007/s00204-020-02689-3.
5. Cruz R. G., Beney L., Gervais P., Lira S. P., Vieira T. M. F. S., Dupont S. Comparison of the antioxidant property of acerola extracts with synthetic antioxidants using an in vivo method with yeasts. *Food Chemistr*. 2019;277:698–705. DOI: 10.1016/j.foodchem.2018.10.099.
6. Tzankova D., Vladimirova S., Aluani D., Yordanov Y., Peikova L., Georgieva M. Synthesis, in vitro safety and antioxidant activity of new pyrrole hydrazones. *Acta Pharmaceutica*. 2020;70(3):303–324. DOI: 10.2478/acph-2020-0026.
7. Boichuk S., Bikinieva F., Mustafin I., Galembikova A., Ryzkin S., Zykova S. 2-Amino-Pyrrole-Carboxylate Attenuates Homology-Mediated DNA Repair and Sensitizes Cancer Cells to Doxorubicin. *Biochemistry*. 2022;87(5):391–399. DOI: 10.1134/S0006297922050017.
8. Boichuk S., Galembikova A., Syuzov K., Dunaev P., Bikinieva F., Aukhadieva A., Zykova S., Igidov N., Gankova K., Novikova M., Kopnin P. The Design, Synthesis, and Biological Activities of Pyrrole-Based Carboxamides: The Novel Tubulin Inhibitors Targeting the Colchicine-Binding Site. *Molecules*. 2021;26(19):5780. DOI: 10.3390/molecules26195780.
9. Moloney J. N., Cotter T. G. ROS signalling in the biology of cancer. *Seminars in Cell and Developmental Biology*. 2018;80:50–64. DOI: 10.1016/j.semcdb.2017.05.023
10. Harris I. S., DeNicola G. M. The Complex Interplay between Antioxidants and ROS in Cancer. *Trends in Cell Biology*. 2020;30(6):440–451. DOI: 10.1016/j.tcb.2020.03.002.
11. Zhao Y., Truhlar D. G. The M06 suite of density functionals for main group thermochemistry, thermochemical kinetics, noncovalent interactions, excited states, and transition elements: two new functionals and systematic testing of four M06-class functionals and 12 other functionals. *Theoretical Chemistry Accounts*. 2008;120(1–3):215–241. DOI: 10.1007/s00214-007-0310-x.
12. Dunning T. H. Gaussian basis sets for use in correlated molecular calculations. I. The atoms boron through neon and hydrogen. *The Journal of Chemical Physics*. 1989;90(2):1007–1023. DOI: 10.1063/1.456153.
13. Tomasi J., Mennucci B., Cammi R. MEP: a tool for interpretation and prediction. From molecular structure to solvation effects. *Journal of Theoretical and Computational Chemistry*. 1996;3:1–103. DOI: 10.1016/S1380-7323(96)80041-0.