

✓
АКАДЕМИЯ НАУК БЕЛОРУССКОЙ ССР
ИНСТИТУТ БИООРГАНИЧЕСКОЙ ХИМИИ

На правах рукописи

Для служебного пользования

Экз. №

7

ЛЕОНТЬЕВ Виктор Николаевич

УДК 577.152:547.99

ВЗАИМОДЕЙСТВИЕ ПРОИЗВОДНЫХ
О-БЕНЗОХИНОНА
С БЕЛКАМИ И КЛЕТОЧНЫМИ СТРУКТУРАМИ

02.00.10 — Биоорганическая химия, химия природных
и физиологически активных веществ

А В Т О Р Е Ф Е Р А Т

диссертации на соискание ученой степени
кандидата химических наук

М и н с к 1988

ИНСТИТУТ БОХ АН БССР

инв. № 96-904

„ 25 “ апреля 1988

СК

Работа выполнена в НИИ биоэнергетики при кафедре физиологии человека и животных Белорусского государственного Ордена Трудового Красного Знамени университета имени В.И.Ленина

НАУЧНЫЕ РУКОВОДИТЕЛИ: доктор химических наук,
профессор СТАНИШЕВСКИЙ Л.С.;
доктор биологических наук,
профессор ПИКУЛЕВ А.Т.

ОФИЦИАЛЬНЫЕ ОППОНЕНТЫ: доктор биологических наук
ТИТОВЕЦ Э.П.;
кандидат химических наук
АВБАКУМОВ Г.В.

ВРУЧАЮЩАЯ ОРГАНИЗАЦИЯ: Институт биологической и медицинской химии АН СССР.

Защита диссертации состоится " 26 " мая 1988 г.
в _____ час. на заседании специализированного совета Д 006.22.01
по защите диссертаций на соискание ученой степени доктора наук при
Институте биорганической химии АН СССР по адресу:
220600, г. Минск, Академгородок, Мадзинская, 5/2.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке Института
биорганической химии АН СССР.

Автореферат разослан " 25 " апреля 1988 г.

Ученый секретарь
специализированного совета
кандидат химических наук

А.Б.АДАМОВИЧ

Актуальность. Разработке научных основ создания физиологически активных веществ в последнее время уделяется особое внимание. Необходимость проведения работ в этом направлении обусловлена потребностями медицины в новых эффективных лекарственных препаратах. Изучение биологической активности аминокислотных производных 1,2-бензохинона позволило выявить у них комплекс свойств, обусловленных уникальной для органических соединений способностью к обратимым окислительно-восстановительным превращениям. Однако, соединения этого ряда остаются малоизученными как в отношении механизмов их действия, так и в отношении связи химической структуры с биологической активностью, что не позволяет вести целенаправленный синтез новых высокоактивных соединений и препятствует их использованию на практике. Помимо фармакологического аспекта, несомненный практический интерес представляет использование этих веществ для изучения ферментных редокс-систем. Таким образом, производные 1,2-бензохинона выступают и как объект и как инструмент исследований. Поскольку эти вещества являются аналогами природных хинонов, то исследования их взаимодействий с биологическими макромолекулами приобретают и теоретическое, общенаучное значение.

Настоящая работа выполнена в рамках Всесоюзной научно-технической программы ГКНТ СМ СССР - 0.74.05 и является составной частью исследований биологической активности производных 1,2-бензохинона, проводимых в НИИ биоэнергетики Белгосуниверситета имени В.И.Ленина.

Цель работы. На основании изучения взаимодействий синтезированных нами новых производных 1,2-бензохинона с пептидами, белками и клеточными структурами выявить возможность прогнозирования их биологической активности.

Научная новизна. Бензохиноны, использованные в работе, являются оригинальными, не описанными в литературе соединениями, способ синтеза которых защищен авторским свидетельством СССР.

Установлено, что в зависимости от структуры заместителя производные 1,2-бензохинона способны во-первых, взаимодействовать с сульфгидрильными группами глутатиона по двум различным механизмам, во-вторых, вступать в ковалентные или гидрофобные взаимодействия с белками, в-третьих, в различной степени проникать через биологические мембраны.

Обнаружены различия во взаимодействиях производных 1,2-бензохинона с различными по структурной организации белками.

Выявлена противогемолитическая активность синтезированных соединений, зависящая от их липофильности.

Практическая ценность. Полученные результаты позволяют проводить целенаправленный синтез новых соединений в ряду производных 1,2-бензохинона с заданными свойствами.

Исследования, проведенные в Институте проблем онкологии имени Р.Е.Кавецкого АН УССР, выявили противоопухолевую и анти-метастатическую активность у двух из синтезированных соединений.

Противогемолитическая активность синтезированных соединений, обусловленная их мембраностабилизирующим действием, может оказаться полезной при консервации крови.

Разработанные методики химической модификации хинонами белков могут найти применение в области исследований структуры ферментов, для создания высокочувствительных биосенсорных систем, а также систем для регенерации некоторых кофакторов.

Апробация работы. Основные положения диссертации доложены на I Всесоюзном биофизическом съезде (Москва 1982), на Всесоюзном семинаре "Кислородные радикалы в химии и биологии" (Минск 1983, 1984), на VII съезде Белорусского физиологического общества имени И.П.Павлова (Витебск, 1987).

Публикации. Основные результаты диссертационной работы изложены в 6 публикациях.

Объем и структура работы. Диссертация содержит 159 страниц машинописного текста, состоит из 5 глав, включает 22 таблицы, 48 рисунков и список цитированной литературы (141 ссылка).

В главе I приведены сведения литературы о биохимических основах физиологической активности хиноидных соединений. Во второй главе представлены результаты исследований по взаимодействию аминопроизводных 1,2-бензохинона с тиолами. Третья глава содержит данные о механизмах взаимодействий синтезированных соединений с белками. В четвертой главе приведены результаты исследований проявления взаимодействий синтезированных хинонов с белками на клеточном и организменном уровнях. Пятая глава включает методики проведения экспериментов, сведения об использованных в работе приборах и реактивах, методы выделения и очистки белков, синтеза исследованных соединений и их физико-химические характеристики.

Объекты и методы исследования. Химическая структура и некоторые физико-химические характеристики синтезированных соединений представлены в таблице I.

Индивидуальность и чистоту контролировали методами тонкослойной хроматографии и электронной спектрофотометрии, а также данными элементного анализа.

В работе использованы: сывороточный альбумин человека (Reanal, ВНР), мономерную фракцию которого получали гелехроматографией на колонке с носителем сефадекс G-100, пепсин (Олайна, СССР), миозин (выделяли из мышц кролика и очищали гелехроматографией на колонке с сефадексом G-200), гемоглобин (выделяли из эритроцитов кролика ионообменной хроматографией на CM-сефадексе A-25 с дополнительной очисткой на колонке с носителем TOYOPEARL HW-55).

Взаимодействие синтезированных соединений с белками изучали с помощью методов гелехроматографии, электронной спектрофотометрии и электрофореза в ПААГ, а с глутатионом и другими тиолами (β -меркаптоэтанол и дитиотреитол) — методами электронной спектрофотометрии, гелехроматографии и полярографии.

Противогемолитическую активность синтезированных соединений изучали на модели кислотного гемолиза. Интенсивность гемолиза оценивали по окрашиванию гемоглобином супернатанта, после осаждения центрифугированием осадка эритроцитов и неразрушенных эритроцитов.

Эксперименты *in vivo* выполнены на 24 кроликах.

Препараты вводили внутривенно на растворах 5 % глюкозы. Заборы крови осуществляли из сонной артерии под местной анестезией 0,5 % раствором новокаина.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

I. Взаимодействие производных о-бензохинона с глутатионом и другими тиолами.

Производные о-бензохинона, будучи восстановленными до о-диоксибензолов, являются эффективными ингибиторами перекисного окисления липидов. В качестве восстановителей могут выступать аскорбиновая кислота (неферментативно) и НАД(Ф)Н (ферментативно, в присутствии некоторых редуктаз и дегидрогеназ).

Однако, наличие в высоких концентрациях и причем практи-

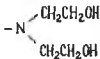
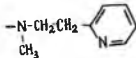
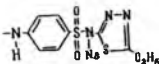
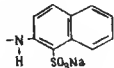
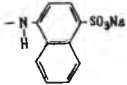
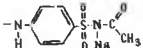
Таблица I

Структура и характеристики синтезированных производных
о-бензоксинона общей формулы



№ соединения	R	$\nu_{\text{C=O}}$ см ⁻¹	$\nu_{\text{N-H}}$ см ⁻¹	λ_{max} нм	P
I	2	3	4	5	6
<u>1</u>	-OCH ₃	-	-	289; 422	1,84
<u>2</u>		1640	3465	324; 514	18,30
<u>3</u>		1640	3460	322; 508	1,67
<u>4</u>		1640	3370	313; 498	20,10
<u>5</u>		1648	-	337; 523	8,21
<u>6</u>		1645	-	338; 521	2,52
<u>7</u>		1645	-	333; 522	26,50

Продолжение таблицы I

I	2	3	4	5	6
<u>8</u>		I640	-	332; 520	I,24
<u>9</u>		I640	-	333; 528	3,65
<u>10</u>		I665	3485	327; 49I	6,50
<u>11</u>		I658	3480	340; 514	0,38
<u>12</u>		I655	3480	340; 514	0,06
<u>13</u>		I660	3485	325; 510	I,10

чески во всех животных клетках мощного восстанавливающего агента — глутатиона, способного, исходя из его окислительно-восстановительного потенциала также восстанавливать о-хиноны, побудило нас изучить взаимодействия аминокпроизводных о-бензохинона с этим трипептидом.

Кинетические исследования, в условиях реакции псевдопервого порядка, о чем свидетельствует линейность полулогарифмических анаморфоз (рис. 1), позволили определить из зависимости $\lg k_{\text{каж}} = \lg k_{\text{ист}} + n \lg [\text{GSH}]$, представленной на Рис. 2, порядок реакций по глутатиону (n) и истинные константы скоростей реакций ($k_{\text{ист}}$).

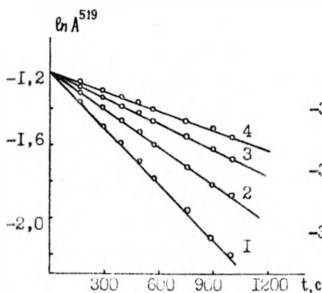


Рис. 1. Полулогарифмические анаморфозы кинетических кривых реакций хинона 5 с глутатионом. Концентрации хинона $7,1 \cdot 10^{-5}$ М, глутатиона $7,7 \cdot 10^{-4}$ М (1), $5,1 \cdot 10^{-4}$ М (2), $3,8 \cdot 10^{-4}$ М (3), $2,5 \cdot 10^{-4}$ М (4).

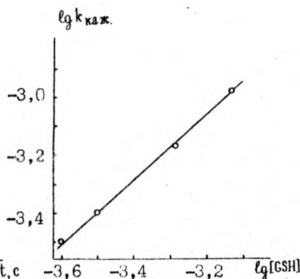


Рис. 2. Зависимость константы скорости $k_{\text{каж}}$ от концентрации глутатиона в логарифмических координатах.

Отсутствие корреляции между константами скоростей реакций ($k_{\text{ист.}}$) и потенциалами полуволн восстановления ($E_{I/2}$) (см. табл. 2) свидетельствует о протекании побочных реакций.

Таблица 2

Соед. №	n	$k_{\text{ист.}}$ (л/моль · с)	$E_{I/2}$ (мВ)
<u>5</u>	0,96	0,95	- 30
<u>6</u>	0,94	0,92	- 52
<u>7</u>	0,96	$3,55 \cdot 10^{-2}$	- 98
<u>8</u>	0,91	$7,18 \cdot 10^{-3}$	-150
<u>9</u>	0,80	$1,07 \cdot 10^{-2}$	- 62
<u>13</u>	1,17	0,25	- 79

С помощью гель-хроматографии на колонке (1,2 x 40 см) с носителем Акрилекс Р-2, уравновешенной 0,15 М фосфатным буфером (рН 7,0), были выделены продукты реакций хинонов с глутатионом. Поскольку скорости окисления о-диоксибензолов достаточно высоки, то уже при разделении на колонке происходило превращение диоксибензолов в хиноны. Анализ электронных спектров поглощения исходных и полученных после хроматографического разделения хинонов показал, что соединение 13 не претерпело изменений в ходе реакции, тогда как из хинонов 5, 6, 7, 8 и 9 образовался хиноидный продукт реакции с максимумами поглощения при 295 и 432 нм.

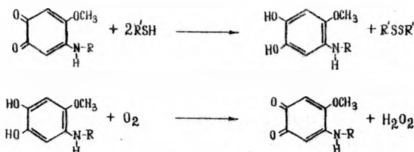
Продукты, имеющие такие же спектральные характеристики, были выделены при проведении реакций этих же хинонов и с другими тиолами (β -меркаптоэтанолом и дитиотреитолом).

Появление продукта реакции с одинаковыми спектрами поглощения, образующегося из различных хинонов и тиолов, вероятно возможно при реакции нуклеофильного замещения амина в структуре хинона тиолом. Подтверждением этого предположения служит факт увеличения рН реакционной среды при взаимодействии хинонов 5, 6, 7, 8 и 9 с дитиотреитолом (0,1 М) соответственно на 0,715; 0,875; 0,33; 0,54 и 0,45 ед. рН, тогда как для хинона 13 в этих же условиях рН увеличивалось лишь на 0,09 ед. рН. Значительное увеличение рН в результате реакции хинонов 5 - 9 с тиолами объясняется появлением в растворе свободных аминов.

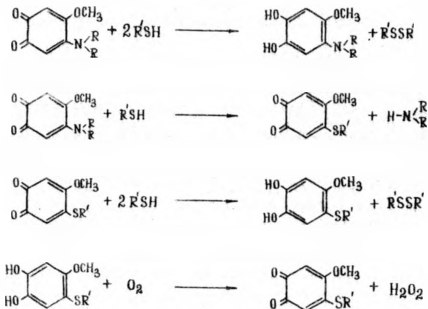
Хинон 13, таким образом, вступает только в окислительно-восстановительные превращения с тиолами.

С помощью платинового электрода закрытого типа обнаружили, что скорость потребления кислорода в присутствии дитиотре-итола или глутатиона ($1 \cdot 10^{-4}$ M) при 20° C была 1–5 нМ/мин. Добавление в полярографическую ячейку растворов хинонов ($1 \cdot 10^{-5}$ M) приводило к увеличению скорости потребления кислорода до уровня 15–40 нМ/мин. Определив стехиометрию реакции хинона 6 с глутатионом в аэробных ($4,27 \pm 0,27$) и анаэробных ($3,33 \pm 0,16$) условиях, пришли к заключению, что в зависимости от наличия или отсутствия подвижного протона у атома азота, возможны два различных механизма реакций хинонов с глутатионом и другими тиолами.

Механизм I



Механизм 2



Наличие подвижного протона у атома азота, вероятно, препятствует нуклеофильной атаке тиолятного иона в положении 4 хиноидного кольца, поскольку возможна следующая реакция:



вследствие чего такие хиноны не могут реагировать с тиолами по механизму 2.

2. Взаимодействие производных о-бензохинона с белками

С использованием метода электрофореза в недиссоциирующих условиях было обнаружено, что инкубация мономерных фракций сывороточного альбумина человека (САЧ) или миозина из мышц кролика (5 мг/мл) в течение 1 ч при 20° С в присутствии синтезированных соединений ($1 \cdot 10^{-3}$ М) приводит к появлению димеров миозина, тогда как димеров альбумина не образуется, однако хиноны 1, 5 и 6 увеличивали электрофоретическую подвижность макромолекул САЧ.

Поскольку электрофореграммы нативного и обработанных хинонами миозинов, полученные при SDS – электрофорезе, были полностью идентичны, а также учитывая, что димеры миозина не образовывались в присутствии дитиотреитола, пришли к заключению, что димеризация происходит за счет образования межмолекулярных дисульфидных связей.

Повышение электрофоретической подвижности мономера альбумина под действием хинонов 1, 5 и 6, как мы предполагали, обусловлено химической модификацией, приводящей к увеличению суммарного отрицательного заряда белковой макромолекулы.

Модифицированные хиноном 1 миозин, пепсин и альбумин, электронные спектры которых представлены на рис. 3, были выделены с помощью гель-хроматографии. В спектрах поглощения всех модифицированных белков появились две новые полосы с максимумами в областях 310 и 500 нм, которые характерны для 4-алкиламино- и 4-ариламинопроизводных 1,2-бензохинона. Коэффициент молярной экстинкции хиноидного хромофора в модифицированных белках оказался равным $\epsilon^{496} = 1780 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$, эта величина близка к величине $\epsilon^{496} = 1800 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ для продуктов реакции хинона 1 с аминокислотами глицином и β -аланином. Расчетные параметры связывания хинона 1 с белками приведены в табл.3.

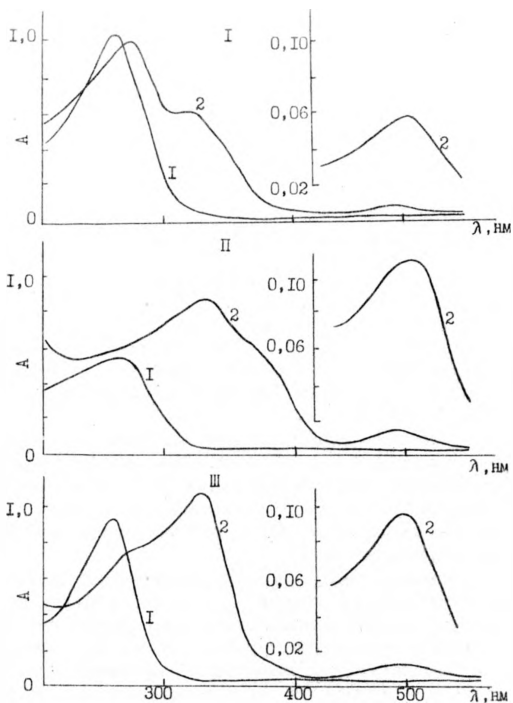


Рис. 3 Электронные спектры поглощения
 I - лепсин, II - миозин, III - альбумин
 1) - нативные, 2) - модифицированные хиазоном I

Таблица 3

Расчетные параметры связывания хинона I с белками

белок	Мол.масса белка (кДа)	[белок] · 10 ⁻⁵ (М)	A ⁴⁹⁶	C · 10 ⁻⁵ (М)	n	Мол.масса модифициро- ванного белка(кДа)
пепсин	32,70	2,446	0,0620	3,420	1,4	32,89
миозин	493,00	0,103	0,1123	6,322	61,4	501,35
альбумин	68,00	0,206	0,0968	5,449	26,4	71,59

Примечания: 1) C – концентрация хиноидного хромофора

2) n – число молей хинона, прореагировавших с молем белка

3) Молекулярная масса присоединяемой хиноидной группы равна 136 Да.

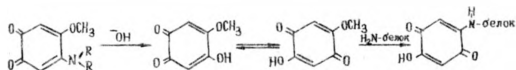
Анализ полученных данных позволяет заключить, что происходит модификация N-концевых и ε-лизиновых аминогрупп белка и уравнение реакции можно представить в следующем виде:



Методом электрофореза в ПААГ в недиссоциирующих условиях с использованием различной пористости разделяющего геля (T = 6 %, 8 % или 10 %) из графика Фергюссона определили, что хиноном I в макромолекуле альбумина модифицируется 29,4 аминогрупп. Таким образом, спектральный и электрофоретический методы дают близкие значения.

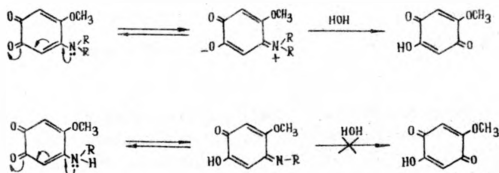
Взаимодействие хинонов 5 и 6 с белками при pH 7,4 также приводит к модификации последних. Выделенные с помощью гель-хроматографии модифицированные белки имеют в электронных спектрах поглощения две полосы с максимумами в областях 360 нм и 520 нм. Проведение модельных реакций хинонов 5 и 6 с β-аланином при различных значениях pH и изучение продуктов щелочно-

го гидролиза исходных хинонов позволили прийти к выводу, что хиноны 5 и 6 также модифицируют свободные аминогруппы белков. Однако реакция протекает с изомеризацией о-хинона в п-хинон, согласно следующему уравнению:



Коэффициент молярной экстинкции хиноидного хромофора $\epsilon_{518} = 730 \text{ M}^{-1} \text{ см}^{-1}$.

Другие аминопроизводные 1,2-бензохинона с третичным атомом азота способны аналогичным образом модифицировать свободные аминогруппы белков только при pH 8-9, тогда как хиноны с подвижным протоном у атома азота даже в щелочной среде не модифицируют белки. Более высокая реакционная способность соединений с третичным атомом азота по сравнению с другими аминопроизводными о-бензохинона, вероятно, обусловлена большей способностью к гидролизу их хинониминных таутомерных форм.



Нам представлялось необходимым изучить взаимодействия синтезированных соединений с белками более сложной организации. Свой выбор мы остановили на гемоглобине по нескольким причинам: во-первых, он легко доступен, во-вторых, существует возможность непосредственного контакта с ним хинонов при внутривенном введении препаратов и в третьих, известно, что нафтохинон - менадион способен окислять оксигемоглобин. С использованием электронной спектрофотометрии и SDS - электрофореза в ПААГ мы обнаружили, что аминопроизводные 1,2-бензохинона

помимо окисления оксигемоглобина вызывают образование сшивок между субъединицами. На электрофореграммах появляются димеры, тримеры и тетрамеры гемоглобина. Причем метгемоглобинообразование и сшивание субъединиц гемоглобина протекают фактически по одному кинетическому закону.

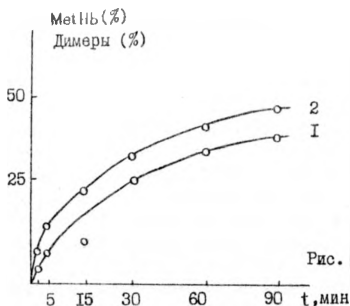


Рис. 4. Кинетика образования метгемоглобина (2) и димеров гемоглобина (1) под действием хинона 5 в цельных эритроцитах.

Поскольку окисление гемоглобина хинонами может быть описано следующими уравнениями:



то, вероятно, сшивание субъединиц белка вызывается образующимися высоко реакционноспособными радикальными частицами супероксиданионрадикалом или семихиноном.

Сшивание субъединиц гемоглобина оказалось весьма полезным для тестирования способности синтезированных соединений проникать через биологические мембраны. Проводя инкубацию цельных эритроцитов и их лизата с хинонами последующим SDS-электрофорезом в ПААГ легко определить, проникает ли и в какой степени

данное соединение через эритроцитарную мембрану по наличию или отсутствию полос полимеров гемоглобина и по их интенсивности. Исследования показали, что все соединения, за исключением хинонов I0, II, I2, I3, хорошо проникают через мембрану.

Наличие в структуре хинонов способных к диссоциации $-SO_2NNa$ и $-SO_3Na$ группировок делает невозможным их прохождение через эритроцитарную мембрану.

Однако все синтезированные соединения вступают во взаимодействие с белками эритроцитарной мембраны. Инкубация цельных эритроцитов или их теней с хинонами приводит к появлению на электрофореграммах новой полосы на старте геля и к уменьшению интенсивности полос 1, 2 и 3, а в случае хинонов 5 и 6 к практически полному исчезновению полосы 4.2.

Известно, что помимо взаимодействий, приводящих к образованию новых ковалентных связей в макромолекулах белков, возможны обратимые взаимодействия между низкомолекулярными веществами и белками за счет Ван-дер-Ваальсовых и электростатических сил.

Для того, чтобы охарактеризовать и количественно оценить взаимодействия синтезированных соединений, имеющих подвижный протон у атома азота, с сывороточным альбумином человека (САЧ) и выяснить связь со структурой хинонов методом хроматографии на сефадексе G-25, исследовали равновесную систему $САЧ + Q \rightleftharpoons САЧ-Q$ при различных температурах.

Основным критерием количественной оценки этих взаимодействий является константа ассоциации данного хинона с белком

$$K_a = \frac{[САЧ-Q]}{[САЧ][Q]}$$

Для экспериментального определения K_a строили графики Скэтчарда в координатах Y/C от Y (см. рис. 5), где Y — отношение общего количества молей хинона, связанного с молем САЧ, к общему количеству молей САЧ, а C — начальная и уравнивающая концентрация хинона.

Константы ассоциации зависят от температуры. На Рис. 6 представлен график зависимости констант ассоциации хинона II с САЧ от температуры.

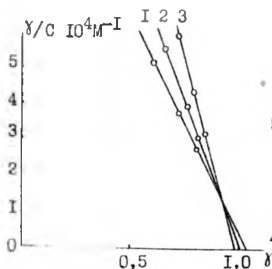


Рис. 5 График зависимости Y/C от γ (метод Скетчарда) для хинона II
 1 - при 40° С;
 2 - при 30° С;
 3 - при 20° С.

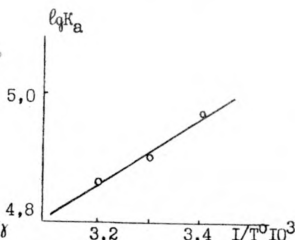


Рис. 6 График зависимости $\lg K_a$ от $1/T^\circ$ для хинона II

Из графика легко вычислить константу ассоциации при 25° С, а также изменение стандартной свободной энергии:

$$\Delta G^\circ = -RT \cdot 2,303 \cdot \lg K_a$$

Представленные в таблице 4 данные свидетельствуют, что хиноны II, I2 и I3, имеющие в структуре способные к диссоциации функциональные группы $-SO_2NNa$ и $-SO_3Na$ имеют более высокие константы связывания, что, вероятно, обусловлено появлением электростатических сил при взаимодействии этих хинонов с альбумином.

Таблица 4
 Характеристики связывания хинонов с сывороточным альбумином человека при 25° С

№ соединения	$K_a \cdot 10^4 (M^{-1})$	n	ΔG° (ккал/моль)
<u>2</u>	2,45	0,64	- 6,03
<u>4</u>	3,80	0,47	- 6,29
<u>II</u>	9,66	1,02	- 6,84
<u>I2</u>	9,66	1,03	- 6,84
<u>I3</u>	8,71	0,93	- 6,78

n - количество мест связывания хинона на молекуле белка.

Таким образом, проведенные эксперименты свидетельствуют, что взаимодействия о-хинонов с белками различаются в зависимости как от структуры хинонов, так и от структурной организации белков.

Для того, чтобы проследить реализацию взаимодействий хинонов с белками на уровне клеток и в экспериментах *in vivo*, исследовали влияние синтезированных соединений на кислотный гемолиз эритроцитов, а также на осмотическую резистентность эритроцитов после внутреннего введения растворов хинонов кроликам.

3. Противогемолитическая активность производных о-бензохинона

Предварительная инкубация суспензии цельных эритроцитов ($6 \cdot 10^6$ клеток/мл) с растворами синтезированных соединений ($5 \cdot 10^{-5}$ М) приводила к замедлению гемолиза, индуцируемого соляной кислотой ($2 \cdot 10^{-3}$ М). В контрольных экспериментах полный гемолиз (100 %) проходил за 15 минут при 37°C . Для количественной оценки защитного действия хинонов использовали величину J_{100} , которую вычисляли отношением экстинкций ($\lambda = 576 \text{ нм}$) контроль/опыт в супернатантах после осаждения неразрушенных эритроцитов и теней центрифугированием при 15 мин. гемолиза.

Обнаружено, что противогемолитическая активность зависит от липофильности синтезированных соединений (см. рис. 7). В качестве параметра, количественно характеризующего липофильность, применяли коэффициент распределения хинонов в системе пентанол/вода. Такого же типа зависимость противогемолитического эффекта от липофильности для производных 1,4-дигидропиридина описано в литературе.

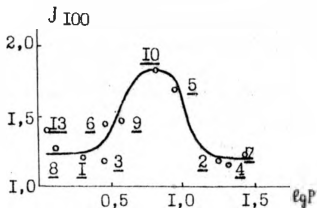


Рис. 7. Зависимость противогемолитического эффекта J_{100} от липофильности производных о-бензохинона. Номера соответствуют номерам соединений в таблице I.

Представленные данные свидетельствуют, что липофильность синтезированных соединений является определяющим фактором, влияющим на противогемолитическую активность, поскольку наиболее активные соединения 5 и 10 резко отличаются друг от друга по своей реакционной способности с глутатионом и белками.

При внутривенном введении растворов хинонов кроликам, для хинонов 5 и 10 наблюдалось достоверное увеличение осмотической резистентности эритроцитов через 60 и 120 минут после введения при дозах 20 мг/кг и 80 мг/кг соответственно.

Таблица 5

Влияние хинонов 5, 10 и 13 на осмотическую резистентность эритроцитов

№ соединения	Доза мг/кг	Оптическая плотность гемолизата ($\lambda=576\text{nm}$)	
		60 мин.	120 мин.
<u>13</u>	80	$0,315 \pm 0,009$	$0,308 \pm 0,005$
	100	$0,278 \pm 0,035$	$0,273 \pm 0,033$
<u>10</u>	20	$0,292 \pm 0,015$	$0,292 \pm 0,025$
	80	$0,265 \pm 0,006$	$0,248 \pm 0,005$
<u>5</u>	10	$0,302 \pm 0,022$	$0,278 \pm 0,033$
	20	$0,265 \pm 0,005$	$0,262 \pm 0,008$

* В контроле $0,307 \pm 0,008$

Таким образом, хиноны 5 и 10 обладают наиболее выраженным противогемолитическим действием как в экспериментах *in vitro*, так и *in vivo*.

ВЫВОДЫ

1. Установлено, что аминопроизводные 1,2-бензохинона с третичным атомом азота вступают с тиолами в реакции нуклеофильного замещения, тогда как наличие подвижного протона у атома азота препятствует этой реакции.

2. Обнаружено, что 4,5-диметокси-, 4-метокси-5-N-пиперидино- и 4-метокси-5-N-морфолино-1,2-бензохиноны вступают в реакции нуклеофильного замещения с концевыми и ϵ -лизиновыми аминогруппами белков, приводящие к их химической модификации и проявляющиеся в изменении спектральных и электрофоретических характеристик.

3. Показано, что независимо от структуры заместителя, исследованные соединения вызывают полимеризацию фибриллярного белка - миозина за счет образования межмолекулярных дисульфидных связей. Полимеризации глобулярного белка - альбумина под действием этих соединений не обнаружено.

4. Установлено, что соединения, имеющие подвижный протон у атома азота, вступают с белками в обратимые, нековалентные взаимодействия и не обладают способностью модифицировать концевые и ϵ -лизинные аминогруппы белков.

5. Обнаружено, что все исследованные соединения способны окислять оксигемоглобин до метгемоглобина, при этом наблюдается сшивание субъединиц гемопroteина за счет анион-радикалов кислорода или хинона. Наиболее сильным метгемоглобинообразующим и сшивающим действием обладают соединения, имеющие в структуре $-SO_2NNa$ и $-SO_3Na$ группировки. Сшивающим действием не обладает 4-метокси-5-N-диэтаноламино-1,2-бензохинон.

6. Показано, что наличие в структуре заместителей $-SO_2NNa$ и $-SO_3Na$ группировок препятствует проникновению этих соединений через биологические мембраны.

7. Выявлена противогемолитическая активность аминоксидных 1,2-бензохинона в условиях кислотного гемолиза эритроцитов, зависящая от липофильности соединений и реализующаяся через их мембраностабилизирующее действие.

Основное содержание диссертации опубликовано в следующих работах:

1. Лунец Е.Ф., Володько Л.В., Станишевский Л.С., Ковган Т.А., Маслова Г.Т., Харламова А.И., Леонтьев В.Н. и др. // А.с. № 124337 (СССР) - В открытой печати не публикуется.

2. Лунец Е.Ф., Кушнер Т.В., Леонтьев В.Н. Влияние супероксид-анион-радикала и диметокси-о-бензохинона на дыхание и фосфорилирование митохондрий // Тез. докл. I Всес. биофизического съезда. - М., 1982. - Т. I. - С. 280.

3. Леонтьев В.Н., Зеленкевич Т.А., Кунцевич Л.И. Исследование физико-химических свойств сократительных белков немешечного происхождения // Тез. докл. I Всес. биофизического съезда. - М., 1982. - Т. II. - С. 73.

4. Маслова Г.Т., Леонтьев В.Н., Адамович Т.С. Влияние

антиоксидантного препарата ОI7 на метгемоглобинообразование и гемолиз эритроцитов // В сб.: Кислородные радикалы в химии и биологии. - Мн., 1984. - С.147-153.

5. Леонтьев В.Н., Кунцевич Л.И., Гусаревич Н.В. Изучить влияние биологически активных веществ на физико-химические свойства белков мышечного происхождения. Отчет о НИР (заключительный). ВНИЦентр, № гос. регистрации ОI822032200, 87 стр.

6. Кунцевич Л.И., Гусаревич Н.В., Леонтьев В.Н. Влияние производных о-бензохинона на сократительные белки головного мозга // Тез. докл. VII съезда Белорусского физиологического общества имени И.П.Павлова. - Витебск, 1987. - С.125-126.

В/м

