

УДК 542.06:542.46:543.64:542.9

АНТИОКСИДАНТНЫЕ СВОЙСТВА И ЭФФЕКТЫ АПОРФИНОВЫХ АЛКАЛОИДОВ И ИХ ФЕНАНТРЕНОВЫХ СЕКО-ИЗОМЕРОВ НА АЦЕТИЛХОЛИНЭСТЕРАЗНУЮ АКТИВНОСТЬ

© С.С. Хизриева, С.Н. Борисенко, Е.В. Максименко, Е.В. Ветрова, Н.И. Борисенко*, В.И. Минкин

НИИ физической и органической химии Южного федерального
университета, пр. Стачки, 194/2, Ростов-на-Дону, 344090 (Россия),
e-mail: boni1912@gmail.com

Впервые модельные фенантреновые секо-алкалоиды (секо-глауцин и секо-болдин), полученные в среде субкритической воды (СБВ) из растительных апорфиновых алкалоидов, изучены как антиоксиданты и ингибиторы ацетилхолинэстеразы (АХЭ). Антиоксидантную активность (*in vitro*) модельных апорфиновых и фенантреновых алкалоидов: болдина, секо-болдина, глауцина и секо-глауцина (БД, с-БД, ГЛ и с-ГЛ) исследовали в реакции со стабильным свободным радикалом ДФПГ (1,1-дифенил-2-пикрилгидразил). *In vivo* антиоксидантную активность определяли в биолюминесцентной тест-системе с использованием генетически модифицированных штаммов *E. coli*. В экспериментах *in vitro* (ДФПГ-тест) и *in vivo* (биотест) фенантреновые алкалоиды с-ГЛ и с-БД демонстрируют более высокую антиоксидантную активность, чем их апорфиновые предшественники ГЛ и БД.

Для исследования (*in vitro*) антихолинэстеразной активности алкалоидов и их фенантреновых секо-изомеров использован метод Элмана с небольшими модификациями. Данные по ингибирующей активности фермента АХЭ апорфиновыми и фенантреновыми алкалоидами, выраженные в виде значений IC_{50} , полученных из зависимостей кривых «доза-ответ», демонстрируют, что ингибирующая активность для секо-болдина ($IC_{50}=0.21$ мМ) и секо-глауцина ($IC_{50}=0.04$ мМ) выше, чем для исходных апорфиновых алкалоидов болдина ($IC_{50}=0.29$ мМ) и глауцина ($IC_{50}=0.44$ мМ), соответственно.

Таким образом, показано, что полученные в СБВ фенантреновые алкалоиды проявляют более высокую антиоксидантную активность и лучшую ингибирующую АХЭ-активность, чем их апорфиновые предшественники.

Ключевые слова: субкритическая вода, апорфиновые алкалоиды, глауцин, болдин, антиоксидантная активность, антихолинэстеразная активность, фенантреновые алкалоиды, секо-глауцин, секо-болдин, ацетилхолинэстераза, болезнь Альцгеймера.

Работа выполнена при финансовой поддержке Министерства науки и высшего образования РФ (Государственное задание в области научной деятельности, Южный федеральный университет, 2020 г. № БАЗ0110/20-3-09ИХ) и гранта РФФИ № 19-33-90211-Аспиранты.

Введение

В последнее десятилетие лавинообразно растет число работ, направленных на синтез новых фарма-

Хизриева Салима Салимовна – аспирант,
e-mail: hizrieva@sfedu.ru

Борисенко Сергей Николаевич – кандидат химических наук, старший научный сотрудник,
e-mail: sergio_rnd@mail.ru

Максименко Елена Владимировна – научный сотрудник,
e-mail: maksimenko@sfedu.ru

Ветрова Елена Владимировна – кандидат биологических наук, доцент, старший научный сотрудник,
e-mail: vetrova-ev@yandex.ru

Борисенко Николай Иванович – главный научный сотрудник, e-mail: boni1912@gmail.com

Минкин Владимир Исаакович – научный руководитель университета, e-mail: viminkin@sfedu.ru

цевтических субстанций, исходя из растительных метаболитов, успешно применяемых в народной медицине. Одной из перспективных групп растительных метаболитов являются апорфиновые алкалоиды. Апорфиновые алкалоиды I (рис. 1) демонстрируют широкий спектр биологической и антиоксидантной активности [1, 2]. Показано [3], что растительные и получаемые полусинтетическим путем из апорфинов I фенантреновые производные II (секо-алкалоиды) проявляют зачастую более высокие показатели антиоксидантной активности и

* Автор, с которым следует вести переписку.

Глауцин-(S)-N-метил-1,2,7,8-тетраметоксибензо [de, g] октагидро-хинолин, выделяемый из мачка желтого, обладает широким спектром биологической активности [13, 14]. Доступность глауцина делает его удобной моделью для химических модификаций. Болдин-[(S)-2,9-дигидрокси-1, 10-диметоксиапорфин] широко известен как мощный растительный антиоксидант и демонстрирует противовоспалительное, противоопухолевое, антидиабетическое и цитопротекторное действие. В исследованиях, направленных на выяснение механизма антиоксидантного действия болдина, было установлено, что молекула болдина действует как эффективный поглотитель гидроксильных радикалов – (НО). Согласно литературным данным, болдин и секо-болдин способны ингибировать АФК, генерируемые в эндотелиальных клетках ангиотензином-II [15]. В литературе отмечается, что важной является способность полученных полусинтетическим путем секо-алкалоидов предотвращать перекисное окисление липидов и повреждение белков и/ или выполнять роль поглотителя свободных радикалов [16].

Известно, что генерализованный воспалительный ответ связан с патогенезом различных нейродегенеративных заболеваний, например атеросклероза и болезни Альцгеймера, которые, как теперь полагают, имеют воспалительную основу, что может составить новые терапевтические стратегии для борьбы с этими заболеваниями [17]. Одной из таких стратегий является поиск растительных метаболитов, способных оказывать нейропротекторное действие путем ингибирования АХЭ или ингибирования окислительного стресса. Такой перспективной группой растительных метаболитов могут стать апорфиновые (глауцин, болдин) и полученные на их основе фенантроновые алкалоиды (секо-глауцин и секо-болдин). Анализ литературных данных показал, что лишь в нескольких научных работах исследована ингибирующая активность этих соединений [18, 19].

Так, в работе [20] была исследована активность алкалоидов болдина ($IC_{50}=8.6$ мкМ) и секо-болдина ($IC_{50}=10$ мкМ), извлеченных из метанольного экстракта растений *B. alloiophylla* и *B. Kunstleri* рода Бейлшмидия (*Beilschmiedia*), сем. Лавровые (*Lauraceae*). Другой группой исследователей были изучены ингибирующие свойства болдина в отношении АХЭ и бутирилхолинэстеразы (БуХЭ) и показано, что он способен подавлять оба фермента, причем демонстрируя неконкурентоспособный механизм ингибирования, который является наиболее распространенным механизмом ингибирования для холинэстераз [18]. Недавно [21, 22] в опытах *in vivo* показано, что болдин, вводимый перорально в течение 12 недель мышам APP / PS1 (мышинная модель болезни Альцгеймера), оказывал противовоспалительное действие в отношении нейронов гиппокампа. Помимо снижения маркеров окислительного стресса и площади инфаркта, мышцы продемонстрировали улучшенную исследовательскую активность с уменьшением дефицита пространственного распознавания объектов и дефицита рабочей памяти. Обучение и память были значительно улучшены с помощью болдина, вводимого внутривентриально в течение 7 дней подряд как у молодых, так и у старых мышей, не влияя на локомоцию (перемещение животных в пространстве). Он ослаблял окислительный стресс в мозге, снижал уровни малонового диальдегида и нитрита, повышал глутатион и подавлял активность ацетилхолинэстеразы [23]. Таким образом, апорфиновые алкалоиды (глауцин, болдин) и их фенантроновые производные (секо-глауцин, секо-болдин) могут быть новым интересным фармакологическим инструментом для ослабления развития патологий при болезни Альцгеймера.

В этой связи целью данной работы является изучение и сравнение антиоксидантных и антихолинэстеразных свойств апорфиновых и фенантроновых алкалоидов для поиска новых ингибиторов АХЭ на основе растительных метаболитов, нацеленных на лечение болезни Альцгеймера.

Экспериментальная часть

Химические вещества (реактивы): Фермент ацетилхолинэстераза (АХЭ) из *Electrophorus electricus* (*electric eel*) (АХЭ, тип VI-S, 3.1.1.7, 200-1000 единиц / мг белка), ацетилтиохолин йодид (АТХй) ($\geq 98\%$, США), 5,5'-дителиобис (2-нитробензойная) кислота (ДТНБ) (99%, США, ReagentPlus®: ReagentPlus является зарегистрированной торговой маркой Sigma-Aldrich Co. LLC), болдин (аналитический стандарт, США), 1,1-дифенил-2-пикрилгидразила (ДФПГ) были приобретены у Sigma-Aldrich. Глауцина гидрохлорид ч.д.а. был произведен Чимкентским химфармацевтическим заводом (Казахстан) и представляет собой рацемическую смесь.

Определение антиоксидантной активности (АОА) алкалоидов в тесте с ДФПГ (in vitro) и в биолюминесцентном тесте (in vivo). Антиоксидантную активность (*in vitro*) апорфиновых и фенантроновых алкалоидов: болдина, секо-болдина, глауцина и секо-глауцина (БД, с-БД, ГЛ и с-ГЛ) исследовали в реакции со стабильным свободным радикалом ДФПГ (1,1-дифенил-2-пикрилгидразил) [24, 25], как описано ранее [26].

In vivo антиоксидантную активность исследуемых алкалоидов в условиях окислительного стресса, индуцированного H_2O_2 определяли в билюминесцентной тест-системе [27, 28] с использованием генетически модифицированного штамма *E. coli* (MG1655 pKatG-lux), разработанного в Государственном НИИ генетики и селекции промышленных микроорганизмов (Москва) [27]. Перекись водорода H_2O_2 была использована как удобный источник гидроксильных радикалов – наиболее реакционноспособных свободных радикалов кислорода. Перекись добавляли в концентрации 10^{-2} М. Измерение интенсивности билюминесценции культур, содержащих анализируемые соединения, а также контрольных культур проводили в течение 2–3 ч на 96-луночном микропланшетном люминометре LM-01A («Immunotech», Чехия).

В работе [26] ранее изучена АОА алкалоидов глауцина и секо-глауцина с использованием приведенных выше тест-систем, а данные по антиоксидантной активности, полученные в биотесте и в тесте с ДФПГ для болдина и секо-болдина, приводятся впервые.

Определение антихолинэстеразных свойств алкалоидов. Для исследования антихолинэстеразной активности (*in vitro*) был использован метод Элмана [29] с небольшими модификациями, описанный в работе [30]. Для кинетических исследований использовали коммерческий фермент АХЭ из электрического угря (лиофилизированный порошок, содержащий трис-буферные соли) фирмы *Sigma*.

Рабочий раствор фермента (2 ед/мл) готовили в фосфатном буфере с рН=7.0 (0.02 М). Для стабилизации растворов фермента и реактивов использовали фосфатные буферы с рН 7.0 и 7.4 (0.1 М). *Рабочие растворы* ДТНБ (С=0.25 мМ) и АТХй (С=1.88 мМ) приготовлены в фосфатном буфере рН=7.4. Основные растворы алкалоидов (2 мМ) готовили в этаноле и затем разбавляли до рабочих концентраций фосфатным буфером (рН=7.4).

Для определения активности ингибирования АХЭ исследуемыми соединениями готовили серию растворов алкалоидов с различной концентрацией (от 0.1 мМ до 1.7 мМ). Реакционную систему готовили при комнатной температуре 25 °С в 1 см кварцевой кювете. Реакция была инициирована после добавления фермента. Реакционная система состояла из 0.6 мл раствора алкалоида, 0.36 мл субстрата ацетилтиохолина йодида (1.88 мМ) и 1.44 мл реагента Элмана-ДТНБ (0.25 мМ), к которой после 5 мин инкубации добавляли 0.12 мл раствора фермента АХЭ (2 ед/мл). Бланк для холостой пробы (контроля) состоял из всех химических веществ, кроме ингибитора. Смесь перемешивали и измеряли оптическую плотность на длине волны 412 нм в течение 6 минут от начала реакции (после добавления фермента) на спектрофотометре СПЕКС ССП 705 (УФ-Вид, 190–1100 нм) (производитель ЗАО «Спектроскопические системы», РФ). Гидролиз иодид ацетилтиохолина контролировали по образованию желтого аниона 5-тио-2-нитробензоата в результате реакции ДТНБ с тиохолинами, катализируемой АХЭ. Измерения и расчеты оценивались с использованием программного обеспечения UV-VIS analyst. Анализ проводят трижды (n = 3). Результаты представлены как среднее значение. Процент ингибирования рассчитывают по формуле:

$$\% \text{ингибирования} = 1 - \left[\frac{\text{Поглощение опытной пробы при 412 нм}}{\text{Поглощение контроля при 412 нм}} \right] \times 100.$$

Результаты были выражены как значения IC_{50} , рассчитанные как концентрация алкалоидов, которая приводит к 50% ингибированию активности ацетилхолинэстеразы.

Обсуждение результатов

В соответствии с задачами работы на начальном этапе была изучена АОА болдина (БД) и секо-болдина (с-БД) для прямого сравнения антиоксидантной активности апорфиновых и фенантреновых алкалоидов на примере БД и с-БД.

На рисунке 3 представлена зависимость антиоксидантной активности АОА от концентрации алкалоидов в реакции с ДФПГ (рис. 3а) и в билюминесцентном тесте (биотесте) (рис. 3б) для БД и с-БД.

Из результатов следует (рис. 3а), что у БД в отличие от с-БД наблюдается увеличение антиоксидантной активности с повышением концентрации. В случае фенантренового с-БД, при больших концентрациях (более 0.1 мМ) уменьшение величины АОА (RSA) может быть связано с низкой растворимостью алкалоида в этаноле. В области малых концентраций БД и с-БД демонстрирует высокую антиоксидантную активность в нейтрализации радикальных состояний. Как и в тесте с ДФПГ, в биотесте *in vivo* значения АОА (в %) с увеличением концентрации алкалоидов для растворов БД были выше, чем для с-БД.

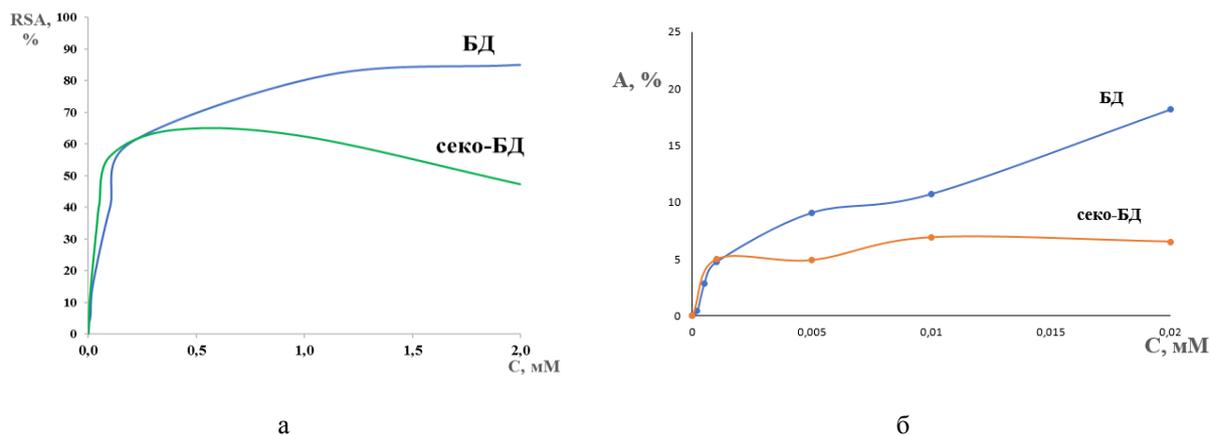


Рис. 3. Зависимость антиоксидантной активности АОА (RSA) от концентрации алкалоидов БД и с-БД ($C = 0.001 \text{ мМ} - 2 \text{ мМ}$) в реакции с ДФПГ (а) и значения АОА, определенные в тесте *in vivo* на штамме *E. coli* MG1655 (pKatG-lux) в условиях окислительного стресса (б)

На следующем этапе сравнили антиоксидантную активность (RSA) четырех исследуемых алкалоидов в концентрации $7 \cdot 10^{-4} \text{ М}$. Результаты показывают, что наибольшую активность в ДФПГ-тесте, как и в тесте на биосенсорных штаммах, проявил фенантреновый алкалоид секо-глауцин (рис. 4).

На следующем шаге были изучены характеристики ингибирующей активности выбранных модельных соединений.

На рисунке 5 приведены типичные гистограммы ингибирующей активности для 1 мМ растворов глауцина и болдина.

Как следует из рисунка 5, процент ингибирования растворов глауцина и болдина достигает максимальных значений на 3 мин реакции с ферментом. Поэтому кривые «доза-эффект» строили исходя из значений ингибирования алкалоидами (в %), полученными на 3 мин реакции с АХЭ (рис. 6).

Результаты изучения ингибирующей активности фермента АХЭ апорфиновых и фенантреновых алкалоидов, выраженные в виде значений IC_{50} , полученных из зависимостей кривых «доза-ответ», демонстрируют, что ингибирующая активность для секо-болдина ($IC_{50} = 0.21 \text{ мМ}$) и секо-глауцина ($IC_{50} = 0.04 \text{ мМ}$) выше, чем для болдина ($IC_{50} = 0.29 \text{ мМ}$) и глауцина ($IC_{50} = 0.44 \text{ мМ}$) соответственно.

Кривые «доза-эффект» для секо-глауцина и секо-болдина также строили исходя из значений ингибирования алкалоидами (в %), полученными на 3 мин реакции с АХЭ (рис. 6).

Анализ литературных данных показал, что апорфиновые алкалоиды (глауцин, болдин) и их фенантреновые производные (секо-глауцин, секо-болдин) могут быть новым интересным фармакологическим инструментом для ослабления развития патологий при болезни Альцгеймера. В связи с этим в данной работе изучено и проведено сравнение антиоксидантной и антихолинэстеразной активности апорфиновых алкалоидов болдина и глауцина и их фенантреновых секо-производных. Результаты представлены в таблице.

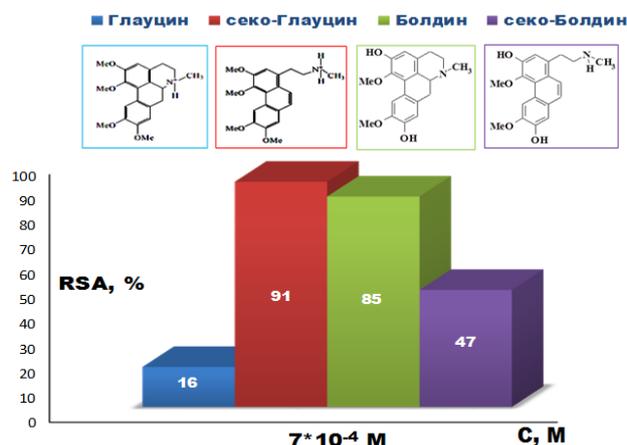


Рис. 4. Сравнение антиоксидантной активности ГЛ, с-ГЛ, БД и с-БД в ДФПГ-тесте

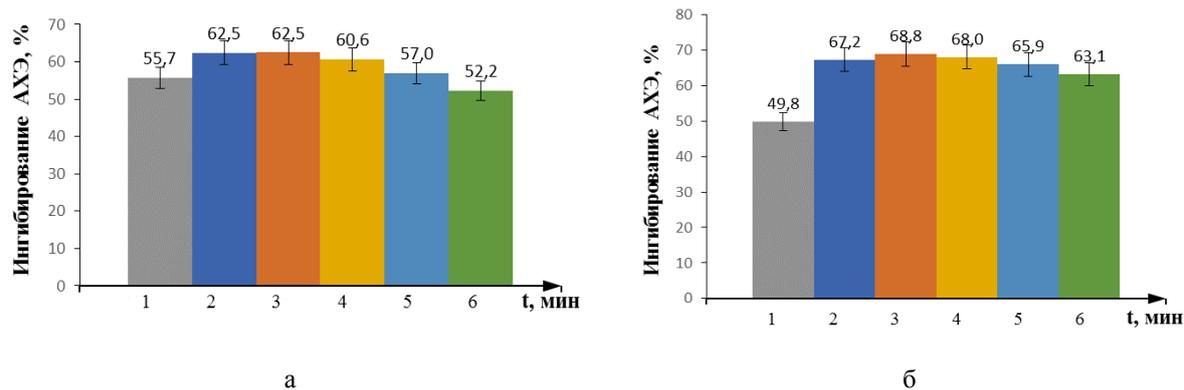


Рис. 5. Значения % ингибирования АХЭ для 1 мМ растворов глауцина (а) и болдина (б) в зависимости от времени реакции с ферментом

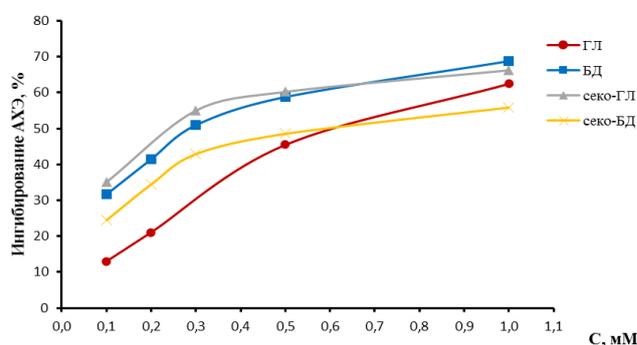


Рис. 6. Кривые (доза-эффект) % ингибирования АХЭ для растворов алкалоидов (С, 0,1–1 мМ)

Значения антихолинэстеразной (анти-АХЭ) и антиоксидантной активности (АОА) для апорфиновых и фенантреновых алкалоидов, полученных в данной работе, и данные по биоактивности этих соединений, приведенные в литературе

Химическое соединение	IC ₅₀ (в мМ) для ингибирования АХЭ			Эффективные концентрации EC ₅₀ (в мМ) для АОА алкалоидов	
	Результаты данной работы	[20]	[18]	ДФПГ-тест (<i>in vitro</i>)	Антиоксидантная активность в биолюминесцентном тесте (<i>in vivo</i>)
Источник данных		Результаты данной работы	[20]	[18]	Результаты данной работы
Болдин	0.29	0.0086	0.37	0.035	–
Секо-болдин	0.21	0.01	–	0.012	–
Источник данных		[19]		[26]	[26]
Глауцин	0.44	0,089		5.3	0.9
Секо-глауцин	0.04	–	–	0.3	0.05

*Значения IC₅₀ и EC₅₀ для алкалоидов определены по кривым «доза-ответ».

Таким образом, показано, что полученные в СБВ фенантреновые секо-алкалоиды проявляют лучшую ингибирующую активность в отношении фермента ацетилхолинэстеразы (АХЭ), чем исходные апорфиновые алкалоиды.

Из полученных зависимостей установлено «эффективное содержание» алкалоида (EC₅₀), которое необходимо для уменьшения количества свободных радикалов ДФПГ в 2 раза (табл.). Величина EC₅₀ для с-ГЛ составила 0.3 мМ, для ГЛ – 5.3 мМ, как было описано ранее в работе [26]. Из данных, приведенных в таблице, определено, что наиболее эффективной концентрацией обладает секо-болдин (EC₅₀=0.012 мМ), т.е. 50% протекторный эффект достигается при очень малой концентрации секо-болдина.

Здесь следует отметить, что согласно ранее опубликованным литературным данным [18], значения эффективной концентрации (IC₅₀) для фенантренового алкалоида секо-болдина были меньше, чем для апорфинового алкалоида болдина, протестированных на АОА в системах с генерацией активных форм кислорода АФК (окислительный стресс), что согласуется с нашими результатами.

В таблице также приведены 50% эффективные концентрации (EC_{50}) алкалоидов, то есть концентрации, при которых продуцирование АФК перекисью водорода уменьшалось в два раза в биоломинесцентном тесте. Как описано в работе [26], величины EC_{50} , полученные для антиоксидантной активности ГЛ, с-ГЛ, в биоломинесцентной тест-системе (*in vivo*), были в 6 раз ниже, чем в тесте с ДФПГ, что указывает на более высокую чувствительность биотеста.

Для болдина и секо-болдина не удалось определить значения EC_{50} в изученном диапазоне концентраций, так как не был достигнут 50% протекторный эффект для этих соединений в биоломинесцентном тесте.

Таким образом, в опытах *in vitro* (ДФПГ-тест) и *in vivo* (биотест), а также в тесте Элмана определено, что фенантроновые алкалоиды обладают лучшими антиоксидантными и антихолинэстеразными свойствами, чем их апорфиновые аналоги.

Заключение

1. Антиоксидантную активность (*in vitro*) модельных апорфиновых и фенантроновых алкалоидов БД, с-БД, ГЛ и с-ГЛ исследовали в реакции со стабильным свободным радикалом ДФПГ (1,1-дифенил-2-пикрилгидразил). *In vivo* антиоксидантную активность определяли в биоломинесцентной тест-системе с использованием генетически модифицированных штаммов *E. coli*. В экспериментах *in vitro* (ДФПГ-тест) и *in vivo* (биотест) фенантроновые алкалоиды с-ГЛ и с-БД демонстрируют более высокую антиоксидантную активность, чем их апорфиновые предшественники ГЛ и БД.

2. Для исследования (*in vitro*) антихолинэстеразной активности алкалоидов и их фенантроновых секо-изомеров использован метод Элмана с небольшими модификациями. Данные по ингибирующей активности фермента АХЭ апорфиновыми и фенантроновыми алкалоидами, выраженные в виде значений IC_{50} , полученных из зависимостей кривых «доза-ответ», демонстрируют, что ингибирующая активность для секо-болдина ($IC_{50}=0.21$ мМ) и секо-глауцина ($IC_{50}=0.04$ мМ) выше, чем для исходных апорфиновых алкалоидов болдина ($IC_{50}=0.29$ мМ) и глауцина ($IC_{50}=0.44$ мМ) соответственно.

3. Таким образом, показано, что полученные в СБВ фенантроновые алкалоиды проявляют более высокую антиоксидантную активность и лучшую ингибирующую АХЭ-активность, чем их апорфиновые предшественники. Представленные результаты послужат основой для поиска новых ингибиторов АХЭ на основе растительных метаболитов, нацеленных на лечение болезни Альцгеймера.

Список литературы

1. Shamma M., Moniot J.I. Isoquinoline alkaloids research 1972–1977. New York: Plenum Press, 1978. 425 p.
2. Gabbasov T.M., Tsyrlina E.M., Yunusov M.S., Teslenko V.V., Salokhin A.V., Sabutskii Y.E., Gorovoi P.G. Alkaloids from *Aconitum neosachalinense* // Chemistry of natural compounds. 2014. Vol. 50. N6. Pp. 1156–1157. DOI: 10.1007/s10600-014-1190-7.
3. O'Brien P., Carrasco-Pozo C., Speisky H. Boldine and its antioxidant or health-promoting properties // Chemico-biological interactions. 2006. Vol. 159. N1. Pp. 1–17. DOI: 10.1016/j.cbi.2005.09.002.
4. Vitorović-Todorović M.D., Juranic' I.O., Mandić' L.M., Drakulić' B.J. 4-Aryl-4-oxo-N-phenyl-2-aminybutyramides as acetyl- and butyrylcholinesterase inhibitors. Preparation, anticholinesterase activity, docking study, and 3D structure-activity relationship based on molecular interaction fields // Bioorganic & medicinal chemistry. 2010. Vol. 18. N3. Pp. 1181–1193. DOI: 10.1016/j.bmc.2009.12.042.
5. Teng C.M., Hsueh C.M., Chang Y.L., Ko F.N., Lee S.S., Liu K.C.S. Antiplatelet effects of some aporphine and phenanthrene alkaloids in rabbits and man // Journal of pharmacy and pharmacology. 1997. Vol. 49. N7. Pp. 706–711. DOI: 10.1111/j.2042-7158.1997.tb06096.x.
6. Huang C.H., Huang W.J., Wang S.J., Wu P.H., Wu W.B. Litebamine, a phenanthrene alkaloid from the wood of *Litsea cubeba*, inhibits rat smooth muscle cell adhesion and migration on collagen // European journal of pharmacology. 2008. Vol. 596. N1-3. Pp. 25–31. DOI: 10.1016/j.ejphar.2008.08.013.
7. Chiou C.M., Kang J.J., Lee S.S. Litebamine N-homologues: preparation and anti-acetylcholinesterase activity // Journal of natural products. 1998. Vol. 61. N1. Pp. 46–50. DOI: 10.1021/np970298f.
8. Zubenko A.A., Morkovnik A.S., Divaeva L.N., Kartsev V.G., Kuzmina L.G., Borodkin G.S., Klimenko A.I. Recyclization of glaucine as a new route to litebamine derivatives // Mendeleev Communications. 2018. Vol. 28. N1. Pp. 58–60. DOI: 10.1016/j.mencom.2018.01.019.
9. Vetrova E.V., Kurbatov S.V., Borisenko S.N., Lekar A.V., Khizrieva S.S., Borisenko N.I., Minkin V.I. Synthesis of Phenanthrene Alkaloids from Herbal Aporphine Alkaloids in Subcritical Water Using Synthesis of Seco-Glaucine as an Example // Russian Journal of Physical Chemistry B. 2017. Vol. 11. N8. Pp. 1255–1259. DOI: 10.1134/S1990793117080140.

10. Borisenko S.N., Lekar A.V., Maksimenko E.V., Khizrieva S.S., Borisenko N.I., Minkin V.I. Synthesis of Phenanthrene Alkaloids in Subcritical Water Using Secoboldine as an Example // Chemistry of Natural Compounds. 2020. Vol. 56. N1. Pp. 183–184. DOI: 10.1007/s10600-020-02981-9.
11. Ветрова Е.В., Курбатов С.В., Борисенко С.Н., Лекарь А.В., Хизриева С.С., Борисенко Н.И., Минкин В.И. Синтез фенантроновых алкалоидов из растительных апорфиновых алкалоидов в среде субкритической воды на примере получения секо-глауцина // Сверхкритические флюиды: Теория и практика. 2017. Т. 12. №2. С. 19–25.
12. Лекарь А.В., Максименко Е.В., Борисенко С.Н., Хизриева С.С., Борисенко Н.И., Минкин В.И. «One-pot»-метод трансформации апорфинового растительного алкалоида болдина в фенантроновый секо-болдин в субкритической воде // Сверхкритические флюиды: теория и практика. 2019. Т. 14. №4. С. 34–41. DOI: 10.34984/SCFTP.2019.14.4.005.
13. Турмухамбетов А.Ж., Мукушева Г.К., Сейдахметова Р.Б., Шульц Э.Э., Шакиров М.М., Багрянская И.Ю., Гатиллов Ю.В., Адекенов С.М. Синтез и антимикробная активность четвертичных солей алкалоида глауцина // Химико-фармацевтический журнал. 2009. Т. 43. №5. С. 24–27. DOI: 10.30906/0023-1134-2009-43-5-24-27.
14. Spasova M., Philipov S., Milkova T. Amino acid Derivatives of Aporphinic Alkaloid Glaucine and their antioxidant activity // Peptides for Youth. New York: Springer, 2009. Pp. 267–268. DOI: 10.1007/978-0-387-73657-0_120.
15. Estelles R., Milian L., Nabah Y.N.A., Mateo T., Cerdá-Nicolás M., Losada M., Ivorra M.D., Issekutz A.C., Cortijo J., Morcillo E.J., Blázquez M.A., Sanz M.-J. Effect of boldine, secoboldine, and boldine methine on angiotensin II-induced neutrophil recruitment in vivo // Journal of leukocyte biology. 2005. Vol. 78. N3. Pp. 696–704. DOI: 10.1189/jlb.0105048.
16. Hostalkova A., Siatka T., Chlebek J., Opletal L., Drasar P., Cahlikova L. Boldine Alkaloids and Prospects of Their Utilization // Chemicke Listy. 2015. Vol. 109. N11. Pp. 846–855.
17. Milian L., Estelles R., Abarca B., Ballesteros R., Sanz M.J., Blázquez M.A. Reactive Oxygen Species (ROS) Generation Inhibited by Aporphine and Phenanthrene Alkaloids Semi-Synthesized from Natural Boldine // Chem. Pharm. Bull. 2004. Vol. 52. N6. Pp. 696–699. DOI: 10.1248/cpb.52.696.
18. Kostelnik A., Pohanka M. Inhibition of acetylcholinesterase and butyrylcholinesterase by a plant secondary metabolite boldine // BioMed research international. 2018. Vol. 2018. Article ID 9634349. 5 p. DOI: 10.1155/2018/9634349.
19. Hung T.M., Thuong P.T., Nhan N.T., Mai N.T.T., Quan T.L., Choi J.S., Woo M.H., Min B.S., Bae K. Cholinesterase inhibitory activities of alkaloids from *Corydalis tuber* // Natural Product Sciences. 2011. Vol. 17. N2. Pp. 108–112.
20. Mollataghi A., Coudiere E., Hadi A.H.A., Mukhtar M.R., Awang K., Litaudon M., Ata A. Anti-acetylcholinesterase, anti- α -glucosidase, anti-leishmanial and anti-fungal activities of chemical constituents of *Beilschmiedia* species // Fitoterapia. 2012. Vol. 83. N2. Pp. 298–302. DOI: 10.1016/j.fitote.2011.11.009.
21. de Lima N.M.R., Ferreira E.D.O., Fernandes M.Y.S., Lima F.A.V., Neves K.R.T., do Carmo M.R.S., de Andrade G.M. Neuroinflammatory response to experimental stroke is inhibited by boldine // Behavioural pharmacology. 2017. Vol. 28. N2. Pp. 223–237. DOI: 10.1097/FBP.0000000000000265.
22. Yi C., Ezan P., Fernandez P., Schmitt J., Saez J.C., Giaume C., Koulakoff A. Inhibition of glial hemichannels by boldine treatment reduces neuronal suffering in a murine model of Alzheimer's disease // Glia. 2017. Vol. 65. N10. Pp. 1607–1625. DOI: 10.1002/glia.23182.
23. Cassels B.K., Fuentes-Barros G., Castro-Saavedra S. Boldo, Its Secondary Metabolites and their Derivatives // Current Traditional Medicine. 2019. Vol. 5. N1. Pp. 31–65. DOI: 10.2174/2215083804666181113112928.
24. Sharma O.P., Bhat T.K. DPPH antioxidant assay revisited // Food chemistry. 2009. Vol. 113. N4. Pp. 1202–1205. DOI: 10.1016/j.foodchem.2008.08.008.
25. Хасанов В.В., Рыжова Г.Л., Мальцева Е.В. Методы исследования антиоксидантов // Химия растительного сырья. 2004. №3. С. 63–75.
26. Ветрова Е.В., Борисенко Н.И., Хизриева С.С., Бугаева А.Ф. Изучение антиоксидантной активности апорфинового алкалоида глауцина и полученного в субкритической воде фенантронового алкалоида дес-глауцина // Химия растительного сырья. 2017. №1. С. 85–91. DOI: 10.14258/jcprm.2017011383.
27. Zavilgelsky G.B., Kotova V.Y., Manukhov I.V. Action of 1, 1-dimethylhydrazine on bacterial cells is determined by hydrogen peroxide // Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis. 2007. Vol. 634. N1-2. Pp. 172–176. DOI: 10.1016/j.mrgentox.2007.07.012.
28. Чистяков В.А., Празднова Е.В., Гутникова Л.В., Сазыкина М.А., Сазыкин И.С. Супероксидустраняющая активность производного пластохинона 10-(6'-пластохинонил) децил-трифенилфосфония (SkQ1) // Биохимия. 2012. Т. 77. №7. С. 932–935.
29. Ellman G.L., Courtney K.D., Andres Jr.V., Featherstone R.M. A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity // Biochemical pharmacology. 1961. Vol. 7. N2. Pp. 88–95. DOI: 10.1016/0006-2952(61)90145-9.
30. Omar S.H., Scott C.J., Hamlin A.S., Obied H.K. Biophenols: Enzymes (β -secretase, Cholinesterases, histone deacetylase and tyrosinase) inhibitors from olive (*Olea europaea* L.) // Fitoterapia. 2018. Vol. 128. Pp. 118–129. DOI: 10.1016/j.fitote.2018.05.011.

Поступила в редакцию 23 октября 2020 г.

После переработки 19 февраля 2021 г.

Принята к публикации 26 февраля 2021 г.

Для цитирования: Хизриева С.С., Борисенко С.Н., Максименко Е.В., Ветрова Е.В., Борисенко Н.И., Минкин В.И. Антиоксидантные свойства и эффекты апорфиновых алкалоидов и их фенантроновых секо-изомеров на ацетилхолинэстеразную активность // Химия растительного сырья. 2021. №2. С. 237–246. DOI: 10.14258/jcprm.2021028752.

*Khizrieva S.S., Borisenko S.N., Maksimenko E.V., Vetrova E.V., Borisenko N.I.**, Minkin V.I. ANTIOXIDANT PROPERTIES AND EFFECTS OF APORPHINE ALKALOIDS AND THEIR PHENANTHRENE SECO-ISOMERS ON ACETYLCHOLINESTERASE ACTIVITY

Research Institute of Physical and Organic Chemistry, Southern Federal University, pr. Stachki, 194/2, Rostov-on-Don, 344090 (Russia), e-mail: boni1912@gmail.com

For the first time, model's phenanthrene seco-alkaloids (seco-glucine and seco-boldine) obtained in the medium of subcritical water SBW) from plant aporphine alkaloids were studied as antioxidants and inhibitors of acetylcholinesterase (AChE). Antioxidant activity (in vitro) of model's aporphine and phenanthrene alkaloids: boldine, seco-boldine, glucine and seco-glucine, (BD, s-BD, GL and s-GL) was studied in the reaction with a stable free radical DPPH (1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl). In vivo, antioxidant activity was determined in a bioluminescent test system using genetically modified *E. coli* strains. In experiments in vitro (DPPH-test) and in vivo (biotest) phenanthrene alkaloids s-GL and s-BD demonstrate the higher antioxidant activity than their aporphine precursors GL and BD. For the study (in vitro) of the anticholinesterase activity of alkaloids and their phenanthrene seco-isomers used the "Ellman's method" with minor modifications. The data on the inhibitory activity of the AChE enzyme with aporphine and phenanthrene alkaloids, expressed as IC₅₀ values obtained from dose-response curves, demonstrate that the inhibitory activity for seco-boldine (IC₅₀ = 0.21 mM) and seco-glucine (IC₅₀ = 0.04 mM) is higher than for the initial aporphine alkaloids boldine (IC₅₀ = 0.29 mM) and glucine (IC₅₀ = 0.44 mM), respectively. Thus, it has been shown that phenanthrene alkaloids obtained in SBW exhibit higher antioxidant activity and better inhibiting AChE-activity than their aporphine precursors.

Keywords: subcritical water, aporphine alkaloids, glucine, boldine, antioxidant activity, anticholinesterase activity, phenanthrene alkaloids, seco-glucine, seco-boldine, acetylcholinesterase, Alzheimer's disease.

References

1. Shamma M., Moniot J.I. *Isoquinoline alkaloids research 1972–1977*. New York: Plenum Press, 1978, 425 p.
2. Gabbasov T.M., Tsyrlina E.M., Yunusov M.S., Teslenko V.V., Salokhin A.V., Sabutskii Y.E., Gorovoi P.G. *Chemistry of natural compounds*, 2014, vol. 50, no. 6, pp. 1156–1157. DOI: 10.1007/s10600-014-1190-7.
3. O'Brien P., Carrasco-Pozo C., Speisky H. *Chemico-biological interactions*, 2006, vol. 159, no. 1, pp. 1–17. DOI: 10.1016/j.cbi.2005.09.002.
4. Vitorović-Todorović M.D., Juranic' I.O., Mandić' L.M., Drakulic' B.J. *Bioorganic & medicinal chemistry*, 2010, vol. 18, no. 3, pp. 1181–1193. DOI: 10.1016/j.bmc.2009.12.042.
5. Teng C.M., Hsueh C.M., Chang Y.L., Ko F.N., Lee S.S., Liu K.C.S. *Journal of pharmacy and pharmacology*, 1997, vol. 49, no. 7, pp. 706–711. DOI: 10.1111/j.2042-7158.1997.tb06096.x.
6. Huang C.H., Huang W.J., Wang S.J., Wu P.H., Wu W.B. *European journal of pharmacology*, 2008, vol. 596, no. 1-3, pp. 25–31. DOI: 10.1016/j.ejphar.2008.08.013.
7. Chiou C.M., Kang J.J., Lee S.S. *Journal of natural products*, 1998, vol. 61, no. 1, pp. 46–50. DOI: 10.1021/np970298f.
8. Zubenko A.A., Morkovnik A.S., Divaeva L.N., Kartsev V.G., Kuzmina L.G., Borodkin G.S., Klimentko A.I. *Mendeleev Communications*, 2018, vol. 28, no. 1, pp. 58–60. DOI: 10.1016/j.mencom.2018.01.019.
9. Vetrova E.V., Kurbatov S.V., Borisenko S.N., Lekar A.V., Khizrieva S.S., Borisenko N.I., Minkin V.I. *Russian Journal of Physical Chemistry B*, 2017, vol. 11, no. 8, pp. 1255–1259. DOI: 10.1134/S1990793117080140.
10. Borisenko S.N., Lekar A.V., Maksimenko E.V., Khizrieva S.S., Borisenko N.I., Minkin V.I. *Chemistry of Natural Compounds*, 2020, vol. 56, no. 1, pp. 183–184. DOI: 10.1007/s10600-020-02981-9.
11. Vetrova Ye.V., Kurbatov S.V., Borisenko S.N., Lekar' A.V., Khizriyeva S.S., Borisenko N.I., Minkin V.I. *Sverkhkriticheskiye flyuidy: Teoriya i praktika*, 2017, vol. 12, no. 2, pp. 19–25. (in Russ.).
12. Lekar' A.V., Maksimenko Ye.V., Borisenko S.N., Khizriyeva S.S., Borisenko N.I., Minkin V.I. *Sverkhkriticheskiye flyuidy: teoriya i praktika*, 2019, vol. 14, no. 4, pp. 34–41. DOI: 10.34984/SCFTP.2019.14.4.005. (in Russ.).
13. Turmukhambetov A.Zh., Mukusheva G.K., Seydakhmetova R.B., Shul'ts E.E., Shakirov M.M., Bagryanskaya I.Yu., Gatilov Yu.V., Adekenov S.M. *Khimiko-farmatsevticheskiy zhurnal*, 2009, vol. 43, no. 5, pp. 24–27. DOI: 10.30906/0023-1134-2009-43-5-24-27. (in Russ.).
14. Spasova M., Philipov S., Milkova T. *Peptides for Youth*. New York: Springer, 2009, pp. 267–268. DOI: 10.1007/978-0-387-73657-0_120.
15. Estelles R., Milian L., Nabah Y.N.A., Mateo T., Cerdá-Nicolás M., Losada M., Ivorra M.D., Issekutz A.C., Cortijo J., Morcillo E.J., Blázquez M.A., Sanz M.-J. *Journal of leukocyte biology*, 2005, vol. 78, no. 3, pp. 696–704. DOI: 10.1189/jlb.0105048.
16. Hostalkova A., Siatka T., Chlebek J., Opletal L., Drasar P., Cahlikova L. *Chemicke Listy*, 2015, vol. 109, no. 11, pp. 846–855.
17. Milian L., Estelles R., Abarca B., Ballesteros R., Sanz M.J., Blázquez M.A. *Chem. Pharm. Bull.*, 2004, vol. 52, no. 6, pp. 696–699. DOI: 10.1248/cpb.52.696.
18. Kostelnik A., Pohanka M. *BioMed research international*, 2018, vol. 2018, article ID 9634349, 5 p. DOI: 10.1155/2018/9634349.
19. Hung T.M., Thuong P.T., Nhan N.T., Mai N.T.T., Quan T.L., Choi J.S., Woo M.H., Min B.S., Bae K. *Natural Product Sciences*, 2011, vol. 17, no. 2, pp. 108–112.

* Corresponding author.

20. Mollataghi A., Coudiere E., Hadi A.H.A., Mukhtar M.R., Awang K., Litaudon M., Ata A. *Fitoterapia*, 2012, vol. 83, no. 2, pp. 298–302. DOI: 10.1016/j.fitote.2011.11.009.
21. de Lima N.M.R., Ferreira E.D.O., Fernandes M.Y.S., Lima F.A.V., Neves K.R.T., do Carmo M.R.S., de Andrade G.M. *Behavioural pharmacology*, 2017, vol. 28, no. 2, pp. 223–237. DOI: 10.1097/FBP.0000000000000265.
22. Yi C., Ezan P., Fernandez P., Schmitt J., Saez J.C., Giaume C., Koulakoff A. *Glia*, 2017, vol. 65, no. 10, pp. 1607–1625. DOI: 10.1002/glia.23182.
23. Cassels B.K., Fuentes-Barros G., Castro-Saavedra S. *Current Traditional Medicine*, 2019, vol. 5, no. 1, pp. 31–65. DOI: 10.2174/2215083804666181113112928.
24. Sharma O.P., Bhat T.K. *Food chemistry*, 2009, vol. 113, no. 4, pp. 1202–1205. DOI: 10.1016/j.foodchem.2008.08.008.
25. Khasanov V.V., Ryzhova G.L., Mal'tseva Ye.V. *Khimiya rastitel'nogo syr'ya*, 2004, no. 3, pp. 63–75. (in Russ.).
26. Vetrova Ye.V., Borisenko N.I., Khizriyeva S.S., Bugayeva A.F. *Khimiya rastitel'nogo syr'ya*, 2017, no. 1, pp. 85–91. DOI: 10.14258/jcprm.2017011383. (in Russ.).
27. Zavilgelsky G.B., Kotova V.Y., Manukhov I.V. *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, 2007, vol. 634, no. 1-2, pp. 172–176. DOI: 10.1016/j.mrgentox.2007.07.012.
28. Chistyakov V.A., Prazdnova Ye.V., Gutnikova L.V., Sazykina M.A., Sazykin I.S. *Biokhimiya*, 2012, vol. 77, no. 7, pp. 932–935. (in Russ.).
29. Ellman G.L., Courtney K.D., Andres Jr.V., Featherstone R.M. *Biochemical pharmacology*, 1961, vol. 7, no. 2, pp. 88–95. DOI: 10.1016/0006-2952(61)90145-9.
30. Omar S.H., Scott C.J., Hamlin A.S., Obied H.K. *Fitoterapia*, 2018, vol. 128, pp. 118–129. DOI: 10.1016/j.fitote.2018.05.011.

Received October 23, 2020

Revised February 19, 2021

Accepted February 26, 2021

For citing: Khizrieva S.S., Borisenko S.N., Maksimenko E.V., Vetrova E.V., Borisenko N.I., Minkin V.I. *Khimiya Rastitel'nogo Syr'ya*, 2021, no. 2, pp. 237–246. (in Russ.). DOI: 10.14258/jcprm.2021028752.