

Д. И. Поздняков (к.фармацевт.н., доц., зав.каф.), С. Л. Аджирахметова (к.фармацевт.н., доц.),
Н. М. Червонная (к.фармацевт.н., доц.), Э. Т. Оганесян (д.фармацевт.н., проф., зав.каф.)

ХИМИЧЕСКАЯ МОДИФИКАЦИЯ *EX PLANTA* ФЛАВОНОИДА ФЛОРИДЗИНА РЕАКЦИЕЙ ОКСИМИРОВАНИЯ И ОЦЕНКА ЕГО НЕЙРОПРОТЕКТОРНОЙ АКТИВНОСТИ

Пятигорский медико-фармацевтический институт – филиал ФГБОУ ВО ВолгГМУ МЗ РФ,
кафедра органической химии
357532, г. Пятигорск, пр. Калинина, 11; e-mail: similla503@mail.ru

D. I. Pozdnyakov, S. L. Adzhiakhmetova, N. M. Chervonnaya, E. T. Oganessian

CHEMICAL MODIFICATION OF THE FLAVONOID FLORIDZINE BY *EX PLANTA* BY OXYMINATION REACTION AND EVALUATION OF ITS NEUROPROTECTIVE ACTIVITY

Pyatigorsk Medical and Pharmaceutical Institute, Branch of Volgograd State Medical University
11, Kalinin Ave., 357532, Pyatigorsk, Russia; e-mail: similla503@mail.ru

В ходе работы проведен гидролиз гликозида (флоридзин) и синтез оксима на основе агликона (флоретина). Полученные вещества идентифицировали по данным ТСХ, УФ, ИК, ЯМР ^1H и ^{13}C . Предварительно нами был проведен анализ на соответствие исследуемых соединений критериям лекарствовождения по правилам Липински, Ghose, Veber, Egan и Muegge с использованием веб-сервиса SwissADME. Флоретин и его оксим характеризуются высокой степенью лекарствовождения, так как соответствуют всем требованиям пяти правил. Данное исследование показало, что оксим флоретина обладает более выраженным нейропротекторным действием, чем исходное соединение флоретин. При этом, учитывая характер наблюдаемых изменений, а именно, метаболический профиль действия, выражаемый в виде улучшения аэробных реакций обмена, можно предположить, что введение оксимной группы в структуру флоретина значительно увеличивает его липофильность и, соответственно, не только системную, но и клеточную биодоступность.

Ключевые слова: лекарствовождение; нейропротекторная активность; оксим флоретина; реакция оксимирования; синтез; флоретин; флоридзин.

В настоящее время все большее внимание научного сообщества приковано к проблеме доклинического изучения новых нейропротекторных средств и экстраполяции полученных результатов в клиническую практику. *In vivo* на моделях ише-

In the course of the work, the hydrolysis of a glycoside (floridzin) was carried out and an oxime synthesis was carried out on the basis of aglycone (floretime). The obtained substances were identified by TLC, UV, IR, ^1H - and ^{13}C NMR spectroscopy data. Previously, we carried out an analysis for compliance of the studied compounds with the drug-like criteria according to the rules of Lipinski, Ghose, Veber, Egan and Muegge using the SwissADME web service. Floretime and its oxime are characterized by a high degree of drug-likeness and meet all the requirements of the five rules. This study showed that floretime oxime has a more pronounced neuroprotective effect, whose parent compound is floretime. At the same time, taking into account the nature of the observed changes, namely the metabolic profile of action, expressed as an improvement in aerobic metabolic reactions, it can be assumed that the introduction of an oxime group into the structure of floretime significantly increases its lipophilicity and, accordingly, not only systemic, but also cellular bioavailability.

Key words: floretime; floridzin; medicine-like; neuroprotective activity oxime; oxymination reaction; synthesis.

мического инсульта у лабораторных животных было изучено большое число потенциально эффективных нейропротекторных средств, среди которых особое место занимают вещества растительного происхождения и, в частности, флавоноиды и их производные¹.

Дата поступления 07.07.23

Флавоноиды представляют собой хорошо изученные вторичные метаболиты растений, снижающие уровень окислительного стресса. В тоже время спектр биологической активности флавоноидов достаточно широк и не ограничивается только их антиоксидантным действием. В исследованиях *in vivo* и *ex vivo* флавоноиды демонстрировали противоопухолевую, антиишемическую, антиаллергическую и противовоспалительную активность, обладают радиопротекторными свойствами, также они воздействуют на ферментные системы, иммунные и обменные процессы в организме, вызывая гиполипидемический, гипоазотемический и гипогликемический эффекты².

Интересны и целенаправленные химические модификации молекул флавоноидов, проводимые с целью улучшения их фармакокинетических и/или фармакодинамических свойств. Например, недавно продемонстрировано, что метилирование флавоноидов улучшает их метаболическую стабильность³. Известно, что флавоноиды являются соединениями с множеством плейотропных эффектов.

Одним из представителей указанного класса является гликозид – флоридзин, оказывающий гипогликемическое действие. В обзоре⁴ обобщены данные по использованию в качестве ингибитора опосредованного транспорта глюкозы *in vitro* флоридзина в концентрации 10^{-4} М глюкозы. Однако нативные гликозиды флавоноидов обладают низкой системной биодоступностью, что ограничивает их широкое применение в медицинской практике⁵.

Флавоноиды вступают в реакции оксимирования по механизму нуклеофильного присоединения с образованием оксимов^{6–9}. Оксимы карбонильных соединений проявляют более высокую биологическую активность, чем исходные вещества^{10–12}.

В связи с этим цель работы заключалась в получении оксима на основе агликаона флоридзина и изучении его нейропротекторной активности.

Для синтеза оксима на основе агликаона, предварительно был осуществлен кислотный гидролиз искомого гликозида – флоридзина **1** (рис. 1).

Для того чтобы химическое вещество потенциально могло являться соединением-лидером, то есть кандидатом в лекарство, существуют критерии и правила лекарствовоподобия: «правило пяти» Липински, правила Ghose, Veber, Egan и Muegge. Основными физико-химическими параметрами «правила пяти» являются: число доноров водородных связей и акцепторов водородных связей, молекулярная масса, коэффициент распределения в системе октанол–вода^{13,14}.

В правилах Ghose, Veber, Egan и Muegge в расчет берутся такие важные дескрипторы, как молекулярная рефракция, количество вращающихся связей, площадь полярной поверхности и другие¹⁵.

Исходя из результатов расчета молекулярных дескрипторов (табл. 1), флоретин **2** и его оксим **3** характеризуются высокой степенью лекарствовоподобия, так как соответствуют всем требованиям пяти правил и могут обладать выраженной фармакологической активностью.

Следует отметить, что исходное соединение флоридзин **1** не отвечает требованиям правил: Muegge (площадь полярной поверхности более $150 \text{ \AA}^2$, количество доноров водородной связи больше 5), Ghose (молекулярная рефракция более 130), Egan (площадь полярной поверхности более $131.6 \text{ \AA}^2$), Veber (площадь полярной поверхности более $140 \text{ \AA}^2$) и критерия правила Липински (количество доноров водородной связи больше 5).

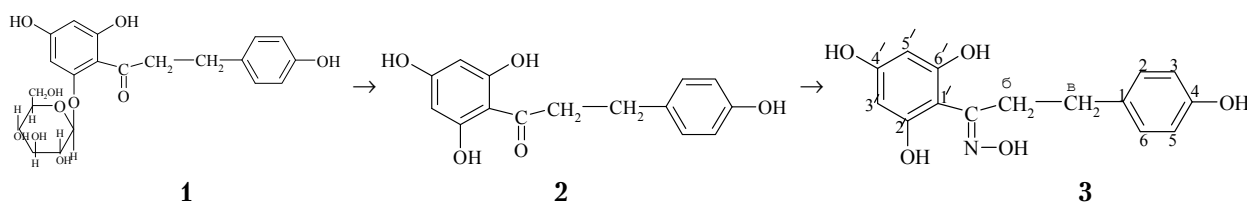


Рис. 1. Структура флоридзина и оксима его агликаона (флоретина)

Таблица 1

Молекулярные дескрипторы лекарствовоподобия для исследуемых соединений

Соединение	Флоридзин	Флоретин	Оксим флоретина
MWg/mol	436.41	274.27	289.28
MLOGP/WLOGP/XLOGP	-1.42/-0.20/0.54	1.10/2.32/2.63	1.10/2.32/2.33
NHD	7	4	5
NHA	10	5	6
TPSA $\text{\AA}^2$	177.14	97.99	113.51
NA	31	20	21
NRB	7	4	4
MR	106.14	74.02	78.02
NG	12	12	12

Оценка нейропротекторной активности

В ходе исследования было показано, что в группе НК крыс в тесте Y-образный лабиринт ^{16,17} наблюдалось снижение числа спонтанных чередований рукавов лабиринта на 52.9% ($p<0.05$) по сравнению с группой животных ЛО (рис. 2). Использование референтного соединения EGB761 привело к снижению когнитивного дефицита у животных на 36.3% ($p<0.05$). В то же время применение флоретина и оксима флоретина повышало когнитивные способности животных относительно нелеченых крыс на 23.8% ($p<0.05$) и 40.2% ($p<0.05$). Стоит отметить, что введение флоридзина не оказало существенного влияния на когнитивные функции животных.

Оценивая изменение зоны некроза головного мозга у животных с фокальной ишемией, установили, что введение EGB761, флоретина и оксима

флоретина способствовало уменьшению очага некроза относительно группы крыс НК на 28.3% ($p<0.05$); 18.2% ($p<0.05$) и 31.3% ($p<0.05$) соответственно. В то же время площадь некроза головного мозга у крыс, получавших оксим флоретина **3**, была меньше, чем у животных, которым вводили флоридзин **1** и флоретин **2** (рис. 3).

Таким образом, установлено, что оксим флоретина **3** (агликона флоридзина **1**) обладает более выраженным нейропротекторным действием, чем исходное соединение **2**. При этом, учитывая характер наблюдаемых изменений, а именно, метаболический профиль действия, выражаемый в виде улучшения аэробных реакций обмена, можно предположить, что введение оксимной группы в структуру флоретина значительно увеличивает его липофильность и, соответственно, не только системную, но и клеточную биодоступность.

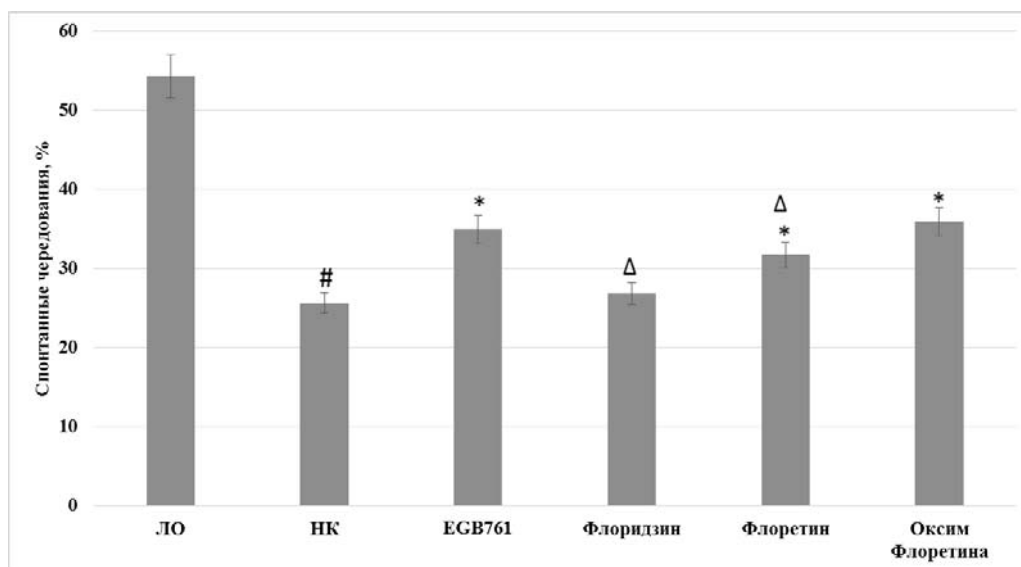


Рис. 2. Влияние флоридзина, флоретина и оксима флоретина на изменение когнитивных способностей животных в тесте Y-образный лабиринт: # – достоверно относительно группы крыс ЛО; * – достоверно относительно группы крыс НК; Δ – достоверно относительно группы крыс, получавших оксим флоретина

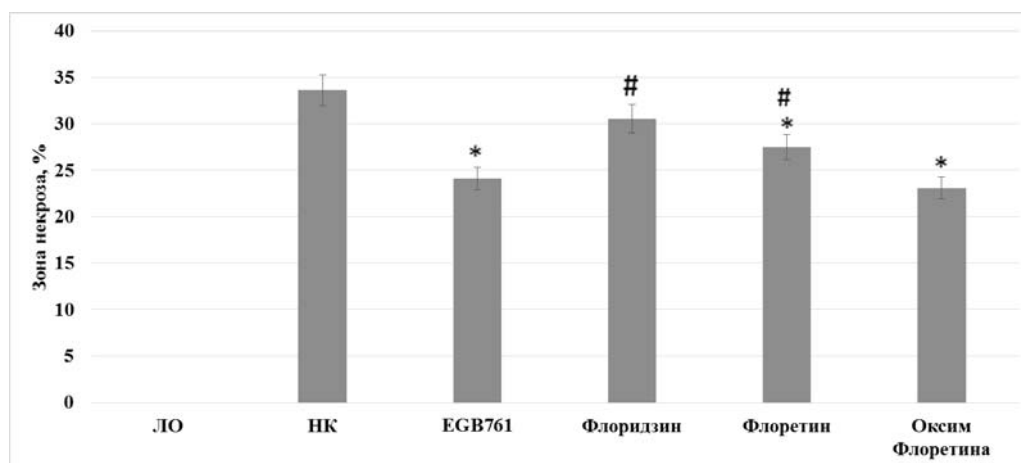


Рис. 3. Влияние флоридзина, флоретина и оксима флоретина на изменение зоны некроза головного мозга у животных с очаговой ишемией головного мозга: * – достоверно относительно группы крыс НК; # – достоверно относительно группы крыс, получавших оксим флоретина

Экспериментальная часть

Для исследований использовали субстанцию флоридзина (фирма-изготовитель Nunan warrant pharmaceuticals).

Анализ на соответствие исследуемых соединений критериям лекарствоведения был осуществлен согласно правилам Липински, Ghose, Veber, Egan и Muegge при помощи веб-сервиса SwissADME (<http://www.swissadme.ch/>)^{13, 14}.

Для контроля за проведением гидролиза флоридзина **1** и последующим синтезом оксима **3** использовали тонкослойную хроматографию (ТСХ) в системе растворителей хлороформ–этанол (100:4) на пластинках «Сорбфил ПТСХ-П-А-УФ». Проявителем служили пары иода.

Углеводный состав гидролизата определяли методом бумажной хроматографии в присутствии достоверных образцов моносахаридов. В качестве подвижной фазы использовали системы растворителей: 15% CH_3COOH , 30% CH_3COOH , БУВ (4:1:2); неподвижной – бумагу FN7 (Германия). Проявителем служил анилинфталатный реактив.

Температуру плавления определяли на аппарате SMP30. УФ-спектры поглощения спиртового раствора регистрировали на спектрофотометре СФ-102 в кварцевых кюветках с толщиной слоя 10 мм, ИК-спектры – на Фурье-спектрометре ФСМ 1201 в диапазоне $4000\text{--}500\text{ см}^{-1}$ в виде суспензии в вазелиновом масле. Спектры ^1H -и ^{13}C - ЯМР регистрировали в DMSO-d_6 на приборе Bruker-400Mhz.

Гидролиз флоридзина 1. Для получения агликона флоридзина 2.0 г гликозида **1** растворяли при нагревании в 20 мл воды и к исходному раствору добавляли 20 мл 20%-ной серной кислоты. Далее гидролизную смесь нагревали на водяной бане в круглодонной колбе емкостью 250 мл с обратным холодильником в течение 180 мин, после чего смесь охлаждали, переносили в делительную воронку и проводили экстракцию агликона **2** небольшими порциями диэтилового эфира. Эфирные извлечения объединяли, растворитель удаля-

ли полностью, остаток трижды перекристаллизовывали из спирта этилового. Получен **3-(4-гидроксибензил)-1-(2,4,6-тригидроксибензил)пропан-1-он (2)** в виде оранжевого кристаллического порошка (выход 75%). $T_{\text{пл}}$: 258–260 °С. УФ-спектр (этиловый спирт), λ_{max} , нм: 226, 288. ИК-спектр, ν , см^{-1} : 3300 (ОН), 1571.0 (C=C), 1249,4 (C-O-C), 1651.4 (C=O). Спектр ЯМР ^1H (400 MHz, DMSO-d_6), δ , ppm: 10.40 (s, 2H, OH), 9.18 (s, 2H, OH), 7.01 (d, $J = 7.7\text{ Hz}$, 2H, Ar), 6.66 (d, $J = 8.1\text{ Hz}$, 2H, Ar), 5.80 (s, 2H, Ar), 3.21 (t, $J = 7.6\text{ Hz}$, 2H, CH_2), 2.76 (t, $J = 7.5\text{ Hz}$, 2H, CH_2). Процесс гидролиза гликозида **1** контролировали методом ТСХ, коэффициенты подвижности для флоридзина **1** и его агликона – флоретина **2** составили 0.142 ± 0.006 и 0.206 ± 0.007 , соответственно.

В гидролизате, нейтрализованном карбонатом бария, обнаружена глюкоза. Коэффициенты подвижности в системах элюентов 15% CH_3COOH ; 30% CH_3COOH ; БУВ (4:1:2) составили 0.915; 0.817; 0.222, соответственно.

Получение оксима флоретина 3. 2.0 г агликона **2** растворяли в 160 мл этанола, добавляли 6.4 г солянокислого гидроксилamina, растворенного в 20 мл этилового спирта, и 7.5 г ацетата натрия, растворенного в 20 мл воды очищенной. Реакционную смесь нагревали в течение 5 ч на водяной бане и после охлаждения выливали на лед. Полученный оксим трижды перекристаллизовывали из спирта этилового.

Оксим 3-(4-гидроксибензил)-1-(2,4,6-тригидроксибензил)пропан-1-она (3). Коричневый кристаллический порошок. Выход: 81%. $T_{\text{пл}}$. 219–221 °С. УФ-спектр (этиловый спирт), λ_{max} , нм: 224, 264. ИК-спектр, ν , см^{-1} : 3400 (ОН, stretching), 1612.7 (C=N), 972.5 (N–O), 1511.2 (C=C), 1297.1 (C–O–C). Спектр ЯМР ^1H (400 MHz, DMSO-d_6), δ , ppm: 10.86 (N–OH), 10.69 (s, 2H, OH), 10.07 (s, 1H, OH), 9.22 (s, 1H, OH), 7.03 (d, $J = 8.2\text{ Hz}$, 2H, Ar), 6.67 (d, $J = 8.3\text{ Hz}$, 2H, Ar), 6.34 (s, 1H, Ar), 6.22 (s, 1H, Ar), 3.08 (t, 2H, CH_2), 2.93 (t, 2H, CH_2). Спектр ЯМР ^{13}C (DMSO-d_6), δ , ppm: 29.92 (α), 45.86 (β), 86.93 (C-5'), 98.22.

Литература

1. Chamorro A., Lo E.H., Renu A., van Leyen K., Lyden P.D. The future of neuroprotection in stroke // *J Neurol Neurosurg Psychiatry*.– 2021.– V.92, №2.– Pp.129-135.
2. Корулькин Д.Ю., Абилов Ж.А., Музычкина Р.А., Толстиков Г.А. Природные флавоноиды. – Новосибирск: Академическое изд-во «Тео», 2007. – 232 с.
3. Sajid M., Channakesavula C.N., Stone S.R., Kaur P. Synthetic Biology towards Improved Flavonoid Pharmacokinetics // *Biomolecules*.–2021.– V.11, №5.– P.754.
4. Кузьмина В.В. Особенности транспорта нутриентов в пищеварительном тракте рыб // *Журнал эво-*

References

1. Chamorro A., Lo E.H., Renu A., van Leyen K., Lyden P.D. [The future of neuroprotection in stroke]. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*, 2021, vol.92, no.2, pp.129-135.
2. Korulkin D.Y., Abilov Z.A., Muzychkin R.A., Tolstikov G.A. Pripodnye flavonoidy [Natural flavonoids]. Novosibirsk, Theo Publ., 2007, 232 p.
3. Sajid M., Channakesavula C.N., Stone S.R., Kaur P. [Synthetic Biology towards Improved Flavonoid Pharmacokinetics]. *Biomolecules*. 2021, vol.11, no.5, P. 754. doi: 10.3390/biom11050754.
4. Kuzmina V.V. *Osobennosti transporta nutriyentov v pishchevaritel'nom trakte ryb* [Features of nutrient trans-

- люционной биохимии и физиологии. – 2021. – Т. 57, №2. – С.94-102.
5. Hostetler G.L., Ralston R.A., Schwartz S.J. Flavones: Food Sources, Bioavailability, Metabolism, and Bioactivity // *Adv Nutr.* – 2017. – V.8, №3. – Pp.423-435.
6. Kulmagambetova E.A., Yamovoi V.I., Kusainova D.D. et al. Synthesis and Structure of Pinostrobin Oxime and Its Biological Activity // *Chemistry of Natural Compounds.* – 2002. – V.38. – Pp.527-531.
7. Машенцева А.А., Сейтеметбетов Т.С., Адекенев С.М., Тулеуов Б.И., Лойко О.П., Халитова А.И. Синтез и биологическая активность комплексных соединений оксима пиностробина с некоторыми *d*-металлами // *ЖОХ.* – 2011. – Т.81, №1. – С.99-105.
8. Сивцева О.С. Синтез и характеристики оксима гесперетина // *Современные проблемы науки и образования.* – 2015. – №1-1.
9. Latif A.D., Gonda T., Vagvolgyi M., Kusz N., Kulmany A., Ocsosvski I., Zomborszki Z.P., Zupko I., Hunyadi A. Synthesis and *in vitro* antitumor activity of naringenin oxime and oxime ether derivatives // *Int J Mol Sci.* – 2019. – V.20, №9. – P.2184.
10. Роднова Е.А., Иванов В.В., Чучалин В.С., Мелентьева А.Н., Арыстан А.И., Шульгау З.Т., Адекенев С.М. Взаимодействие оксима пиностробина и леукомизина с активными формами кислорода в модельных системах // *Бюллетень сибирской медицины.* – 2011. – №5. – С.95-100.
11. Potaniec B., Grabarczyk M., Stompor M., Szumny A., Zielinsky P., Zolnierczyk A.K., Aniol M. Antioxidant activity and spectroscopic data of isoxanthohomoloxime and related compounds // *Spectrochim. Acta A Mol. Biomol. Spectrosc.* – 2014. – V.118. – Pp.716-723.
12. Koyuncu I., Kocyigit A., Gonel A., Arslan E., Durgun M. The protective effect of naringenin-oxime on cisplatin induced toxicity in rats // *Biochem. Res. Int.* – 2017. – P.9478958.
13. Daina A., Michielin O., Zoete V. SwissADME: A free web tool to evaluate pharmacokinetics, drug-likeness and medicinal chemistry friendliness of small molecules // *Scientific Reports.* – 2017. – V.7, №1. – P.42717.
14. Горишний В.Я., Матийчук В.С. Синтез, физико-химические свойства, биоподобие и противоопухолевая активность эфиров и амидов 2-[5-(4-бромбензилден)-4-оксо-2-тиоксо-1,2,4-триазолидин-3-ил]-3-метилбутановой кислоты // *ЖОХ.* – 2021. – Т.57, №1. – С.35-42.
15. Кодониди И.П., Аненко Д.С., Терехов А.Ю., Сидорская С.Ю., Григорянц Э.Г. Синтез 2,6-диалкильных производных пиримидин-4(III)-она, обладающих противовоспалительным действием // *Фармация.* – 2021. – Т.70, №1. – С.11-17.
16. Tamura A., Graham D.I., McCulloch J., Teasdale G.M. Focal cerebral ischaemia in the rat: 1. Description of technique and early neuropathological consequences following middle cerebral artery occlusion // *J Cereb Blood Flow Metab.* – 1981. – V.1, №1. – Pp.53-60.
17. Amani M., Zolghadrnasab M., Salari A.A. NMDA receptor in the hippocampus alters neurobehavioral phenotypes through inflammatory cytokines in rats with sporadic Alzheimer-like disease // *Physiol Behav.* – 2019. – V.202. – Pp.52-61.
5. Hostetler G.L., Ralston R.A., Schwartz S.J. [Flavones: Food Sources, Bioavailability, Metabolism, and Bioactivity]. *Adv Nutr.*, 2017, vol.8, no.3, pp.423-435.
6. Kulmagambetova E.A., Yamovoi V.I., Kusainova D.D. et al. [Synthesis and Structure of Pinostrobin Oxime and Its Biological Activity]. *Chemistry of Natural Compounds*, 2002, vol.38, pp.527-531.
7. Mashentseva A.A., Seytembetov T.S., Adekenov S.M., Tuleuov B.I., Loiko O.P., Khalitova A.I. [Synthesis and biological activity of the pinostrobin oxime complex compounds with some *d*-metals]. *Russian Journal of General Chemistry*, 2011, vol.81, no.1, pp.96-101.
8. Sivtseva O.S. *Sintez i kharakteristiki oksima gesperetina* [Synthesis and characteristics of hesperetin oxime]. *Sovremennyye problemy nauki i obrazovaniya* [Modern problems of science and education], 2015, no.1-1.
9. Latif A.D., Gonda T., Vagvolgyi M., Kusz N., Kulmany A., Ocsosvski I., Zomborszki Z.P., Zupko I., Hunyadi A. [Synthesis and *in vitro* antitumor activity of naringenin oxime and oxime ether derivatives]. *Int J Mol Sci.*, 2019, vol.20, no.9, p.2184.
10. Rodnova E.A., Ivanov V.V., Chuchalin B.C., Melent'eva A.N., Arystan A.I., Shul'gau Z.T., Adekenov S.M. *Vzaimodeystviye oksima pinostrobina i leukomizina s aktivnymi formami kisloroda v model'nykh sistemakh* [Interaction of pinostrobin and leucomizinoxime with reactive oxygen species in model systems]. *Byulleten' sibirskoy meditsiny* [Bulletin of Siberian Medicine], 2011, no.5, pp.95-100.
11. Potaniec B., Grabarczyk M., Stompor M., Szumny A., Zielinsky P., Zolnierczyk A.K., Aniol M. [Antioxidant activity and spectroscopic data of isoxanthohomol oxime and related compounds]. *Spectrochim. Acta A Mol. Biomol. Spectrosc.* 2014, vol.118, pp.716-723.
12. Koyuncu I., Kocyigit A., Gonel A., Arslan E., Durgun M. [The protective effect of naringenin-oxime on cisplatin induced toxicity in rats]. *Biochem. Res. Int.*, 2017, p.9478958.
13. Daina A., Michielin O., Zoete V. [SwissADME: A free web tool to evaluate pharmacokinetics, drug-likeness and medicinal chemistry friendliness of small molecules]. *Scientific Reports*, 2017, vol.7, no.1, p.42717.
14. Horishny V.Y., Matiychuk V.S. [Synthesis, physicochemical properties, drug likeness, and antitumor activity of 2-[5-(4-bromobenzylidene)-4-oxo-2-sulfanylidene-1,3-thiazolidin-3-yl]-3-methylbutanoic acid esters and amides]. *Russian Journal of Organic Chemistry*, 2021, vol.57, no.1, pp.25-31.
15. Kodonidi I.P., Anenko D.S., Terekhov A.Yu., Sidorskaya S.Yu., Grigoryants E.G. *Sintez 2,6-dialkil'nykh proizvodnykh pirimidin-4(III)-ona, obladayushchikh protivovospalitel'nykh deystviyem* [Synthesis of 2,6-dialkyl derivatives of pyrimidin-4(III)-one, which have anti-inflammatory effects]. *Farmatsiya* [Pharmacy], 2021, vol.70, no.1, pp.11-17.
16. Tamura A., Graham D.I., McCulloch J., Teasdale G.M. [Focal cerebral ischaemia in the rat: 1. Description of technique and early neuropathological consequences following middle cerebral artery occlusion]. *J Cereb Blood Flow Metab.* 1981, vol.1, no.1, pp.53-60.
17. Amani M., Zolghadrnasab M., Salari A.A. [NMDA receptor in the hippocampus alters neurobehavioral phenotypes through inflammatory cytokines in rats with sporadic Alzheimer-like disease]. *Physiol Behav.*, 2019, vol.202, pp.52-61.