

# ВЛИЯНИЕ ПРОИЗВОДНЫХ 3-ФОРМИЛХРОМОНА *IN VITRO* НА АГРЕГАЦИЮ ЧАСТИЦ В-АМИЛОИДА И АКТИВНОСТЬ ТИРОЗИНАЗЫ

## Д.И. Поздняков

к.фарм.н., зав. лабораторией живых систем, доцент,  
кафедра фармакологии с курсом клинической фармакологии,  
Пятигорский медико-фармацевтический институт – филиал ФГБОУ ВО ВолгГМУ (г. Пятигорск)  
E-mail: pozdniackow.dmitry@yandex.ru

## В.М. Руковицина

аспирант, кафедра органической химии,  
Пятигорский медико-фармацевтический институт – филиал ФГБОУ ВО ВолгГМУ (г. Пятигорск)  
E-mail: rukovicina.vika@mail.ru

## М.В. Ларский

к.фарм.н., зав. кафедрой фармацевтической химии,  
Пятигорский медико-фармацевтический институт – филиал ФГБОУ ВО ВолгГМУ (г. Пятигорск)  
E-mail: pharmachemistry@mail.ru

**Актуальность.** Болезнь Альцгеймера – одна из самых распространенных терминальных форм деменции, характеризующаяся сложным патогенезом с формированием амилоидных включений в структурах мозга. В тоже время одним из новых и перспективных направлений терапии болезни Альцгеймера является воздействие на амилоидогенный каскад.

**Цель исследования.** *In vitro* оценить влияние десяти производных 3-формилхромона на процессы формирования агрегатов  $\beta$ -амилоида и активность тирозиназы.

**Материал и методы.** Влияние исследуемых соединений на активность тирозиназы оценивали по методу Марупуа, используя в качестве субстрата L-тирозин, в качестве референта – койевую кислоту. Агрегацию амилоидных частиц изучали спектрофотометрически в реакции с конго красным через три и шесть дней инкубации.

**Результаты.** В ряду изучаемых объектов наиболее существенными антитирозиназными свойствами обладало 6-ацетилзамещенное производное 3-формилхромона, величина  $IC_{50}$  которого сопоставима с койевой кислотой ( $32 \pm 1,913$  мкг/мл против  $30,2 \pm 1,599$  мкг/мл). Также данное соединение наиболее существенно ингибировало агрегацию амилоидных частиц на третий день инкубации – на 31,0% ( $p < 0,05$ ) и на шестой день – на 61% ( $p < 0,05$ ). Стоит отметить, что 3-формилхромон и оксим данного соединения значимого влияния на активность тирозиназы и амилоидогенез не оказали.

**Выводы.** Проведенное исследование позволяет предполагать актуальность дальнейшего изучения 6-ацетилзамещенного 3-формилхромона как потенциального средства патогенетической терапии болезни Альцгеймера.

**Ключевые слова:** болезнь Альцгеймера, производные хромона, тирозиназа,  $\beta$ -амилоид.

**Для цитирования:** Поздняков Д.И., Руковицина В.М., Ларский М.В. Влияние производных 3-формилхромона *in vitro* на агрегацию частиц В-амилоида и активность тирозиназы. Вопросы биологической, медицинской и фармацевтической химии. 2021;24(1):11–15. <https://doi.org/10.29296/25877313-2021-01-02>

Болезнь Альцгеймера (БА) – хроническое нейродегенеративное заболевание, являющееся основной причиной деменции, оно составляет порядка 80% всех случаев диагностированной деменции [1]. На сегодняшний день БА страдают порядка 46,8 млн человек, при этом к 2030 г. прогнозируется увеличение числа случаев БА до 131,5 млн. В период с 2000 по 2014 гг. смертность, ассоциированная с БА, только в США выросла на 89%. Кроме того, по различным оценкам прямые и косвенные затраты 18 крупнейших экономик мира на

лечение и поддержание должного уровня жизни пациентов, страдающих БА, составляют более 1 трлн долларов США ежегодно, с прогнозируемым их увеличением до 2 трлн к 2030 г. [2]. Патогенез БА определяют гистопатологические нарушения, связанные с внеклеточным отложением  $\beta$ -амилоидов ( $A\beta$ ) и накоплением внутри нейронов гиперфосфорилированного *tau*-белка, преимущественно в энторинальной коре и гиппокампе [3]. Известно, что  $A\beta$  образуется при расщеплении белка предшественника  $\beta$ -амилоида (Amyloid Pre-

cursor Protein, APP), который расположен на нейрональной мембране и включает 40–42 аминокислоты ферментами группы секретаз ( $\alpha$ ,  $\beta$  и  $\gamma$ -секретазой), причем для развития БА определяющую роль играет нарушение функционирования  $\gamma$ -секретазного комплекса [4]. Также в образовании А $\beta$  важную роль играет повышение активности тирозиназы, которая может катализировать распад липидных мембранных рафтов [5]. Агрегаты А $\beta$  имеют аномальную структуру и практически не выводятся из мозговой ткани. Обнаружено, что А $\beta$  непосредственно связывается с фибриногеном с константой диссоциации (КД) < 7 нМ, что, возможно, изменяет его третичную структуру и способствует росту тромбов. Более длинные фрагменты А $\beta$  гидрофобны и связаны с повышенным риском развития БА. Так, А $\beta_{1-42}$  наиболее широко изучен в силу его широкого распространения у пациентов, предрасположенных к БА; он более токсичен как в клетках, так и у экспериментальных животных [6]. В связи с этим представляется актуальным изучение влияния фармакологически активных субстанций на процессы агрегации амилоидных частиц и активность тирозиназы как одних из основных патогенетических механизмов развития БА. В ранее проведенных исследованиях было установлено, что производные 3-формилхрома обладают потенциальными нейротропными свойствами, на основании чего данный класс веществ включен в структуру настоящего исследования.

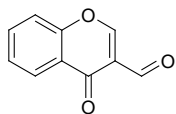
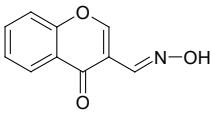
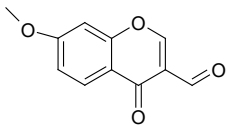
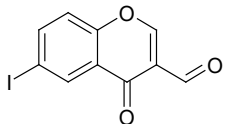
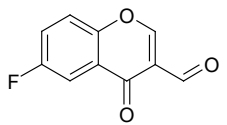
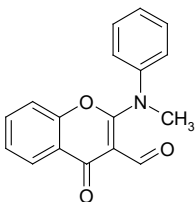
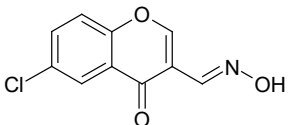
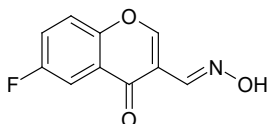
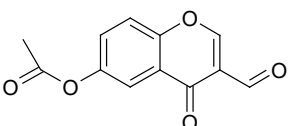
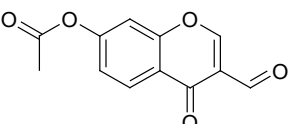
Цель работы – оценить влияние производных 3-формилхрома на изменение активности тирозиназы и процесс агрегации амилоидных частиц *in vitro*.

## МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ

Исследуемые производные 3-формилхрома получены на кафедре органической химии Пятигорского медико-фармацевтического института под руководством профессора Э.Т. Оганесяна. Структуры исследуемых соединения подтверждены методом ЯМР-спектроскопии (табл. 1).

Влияние изучаемых соединений на изменение активности тирозиназы исследовали по методу, описанному Maruyama et al. [7]. Исследуемые соединения растворяли в диметилсульфоксиде до конечной концентрации 20 мг/мл. Данный маточный раствор затем разбавляли калий-фосфатным буфером (рН 6,5) до содержания изучаемых веществ – 600 мкг/мл.

Таблица 1. Структуры исследуемых соединений

Структурная формула	Лабораторный шифр
	FC-1
	FC-2
	FC-3
	FC-4
	FC-5
	FC-6
	FC-7
	FC-8
	FC-9
	FC-10

Далее готовили восемь серийных двукратных разведений. Койевая кислота в аналогичных концентрациях использовалась в качестве контроля. В 96-луночный планшет вносили по 70 мкл каждого серийного разведения и добавляли 30 мкл тирозиназы (333 ед/мл в фосфатном буфере с pH 6,5). После инкубации при комнатной температуре в течение 5 мин в анализируемую среду вносили 110 мкл субстрата (L-тирозин 2 мМ). Оптическую плотность реакционной смеси регистрировали при 492 нм с помощью планшетного ридера Infinite F50 («Tecan», Австрия). Тесты выполнялись в триплетном варианте. Тирозиназа была получена от «Sigma-Aldrich» (Германия). Койевая кислота предоставлена «Warrant Pharmaceuticals» (КНР) [7].

Процесс агрегации амилоидных частиц оценивали в реакции взаимодействия Аβ с конго красным. 25 мкл раствора исследуемых соединений в диметилсульфоксиде (конечная концентрация – 20 мг/мл) смешивали с 225 мкл 20 мМ раствора конго красного в PBS. Полученную смесь инкубировали при комнатной температуре. Далее регистрировали оптическую плотность образцов при длинах волн 540 и 405 нм через три и шесть дней инкубации. Количество агрегатов Аβ рассчитывали по формуле

$$A\beta = \frac{A540}{4780} - \frac{A405}{6830} - A405CR/8620,$$

где АCR405 – оптическая плотность раствора конго красного при длине волны 405 нм; А540 и А405 – оптическая плотность раствора, содержащего исследуемое вещество при длинах волн 540 и 405 нм соответственно [8]. Фрагмент Аβ<sub>1–40</sub> был получен от «Sigma-Aldrich» (Германия).

Статистическую обработку полученных результатов проводили с применением программного пакет STATISTICA 6.0 («StatSoft», США). Данные выражали в виде М (среднее значение) ±SEM (стандартная ошибка среднего). Статистические различия между группами оценивали методом однофакторного дисперсионного анализа с пост-тестом Ньюмена–Кейсла при  $p < 0,05$ . Показатель IC<sub>50</sub> рассчитывали методом пробит-анализа.

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Результаты оценки антитирозиназной активности производных 3-формилхромона представлены в табл. 2. Как видно из полученных данных, наиболее выраженную ингибирующую активность по отношению к тирозиназе оказали соединения под шифрами FC-9 и FC-10, показатель IC<sub>50</sub> которых был сопоставим с референтом – койевой кислотой в аналогичной концентрации. Остальные изучаемые вещества проявляли значительно меньший уровень фармакологической активности (IC<sub>50</sub> статистически значимо был выше такового у койевой кислоты).

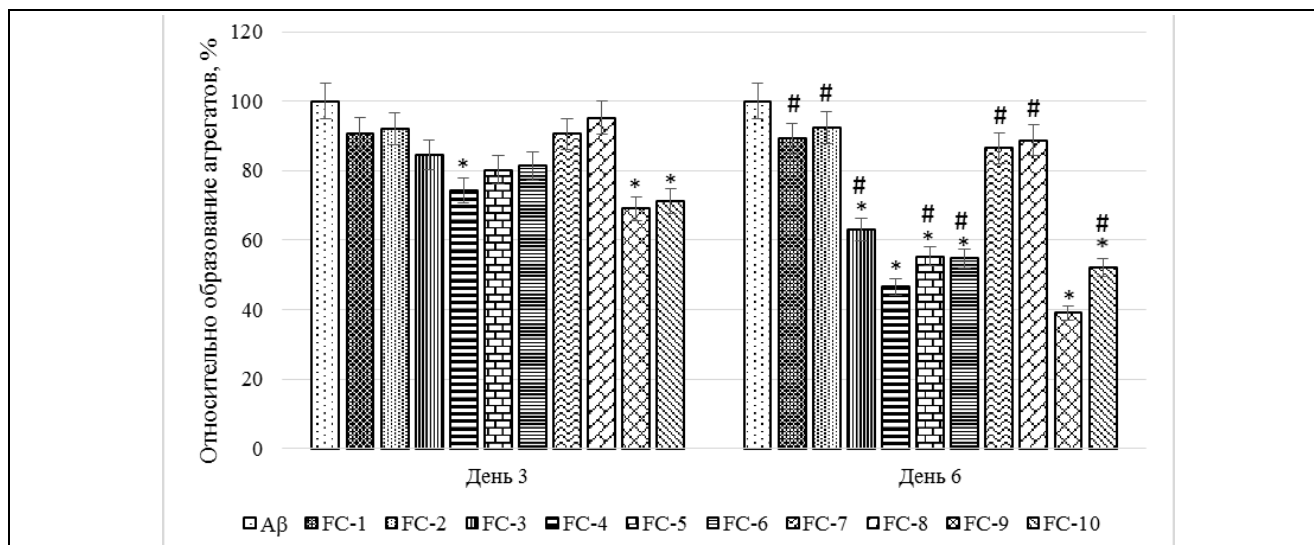
**Таблица 2. Результаты оценки антитирозиназной активности производных 3-формилхромона**

Соединение	FC-1	FC-2	FC-3	FC-4	FC-5	FC-6	FC-7	FC-8	FC-9	FC-10	КК
IC <sub>50</sub> ±SEM, мкг/мл	105,4±2,127*	124,9±2,61*	56,3±1,515*	49,7±1,322*	76,9±1,95*	54,6±1,633*	97,9±1,23*	112,5±1,723*	32±1,913	38,3±1,317	30,2±1,599

Примечание: КК – койевая кислота; \* – статистически значимо относительно койевой кислоты ( $p < 0,05$ , критерий Ньюмена–Кейсла)

В процессе оценки влияния исследуемых соединений на изменение процесса агрегации амилоидных частиц установлено, что в ряду исследуемых объектов через три дня экспозиции вещества под шифрами FC-4, FC-9, FC-10 подавляли образование агрегатов на 25,7% ( $p < 0,05$ ), 31,0% ( $p < 0,05$ ), 28,8% ( $p < 0,05$ ) соответственно (рисунок). Спустя шесть дней инкубации соединения под лабораторными шифрами FC-3, FC-4, FC-5, FC-6, FC-9, FC-10 подавляли образование амилоидных

агрегатов на 36,9% ( $p < 0,05$ ), 53,5% ( $p < 0,05$ ), 44,7% ( $p < 0,05$ ), 45,2% ( $p < 0,05$ ), 61% ( $p < 0,05$ ) и 47,8% ( $p < 0,05$ ) соответственно (рисунок). При этом на фоне внесения в анализируемую среду соединения FC-9 агрегация амилоидных частиц подавлялась более значимо, нежели при добавлении вещества FC-1 – на 56,3% ( $p < 0,05$ ); FC-2 – 57,8% ( $p < 0,05$ ); FC-3 – 38,2% ( $p < 0,05$ ); FC-5 – 29,5% ( $p < 0,05$ ); FC-6 – 28,8% ( $p < 0,05$ ); FC-7 – 54,9% ( $p < 0,05$ ); FC-8 – 56,1% ( $p < 0,05$ ) и FC-10 – на 25,3% ( $p < 0,05$ ).



**Рисунок.** Влияние исследуемых соединений на процесс агрегации амилоидных частиц в реакции с конго красным: Аβ – контрольная проба, не содержащая исследуемые вещества; \* – статистически значимо относительно контрольной пробы ( $p < 0,05$ , критерий Ньюмена-Кейсла); # – статистически значимо относительно соединения FC-9 ( $p < 0,05$ , критерий Ньюмена-Кейсла)

Болезнь Альцгеймера – нейродегенеративная патология, от которой в настоящее время страдают более 40 млн человек во всем мире и по прогнозам, в ближайшие десятилетия заболеваемость БА будет экспоненциально расти [9]. Одним из основных патогенетических механизмов развития БА является отложение амилоидных агрегатов. В свою очередь, амилоидогенез непосредственно связан с образованием липофусцина, синтез которого контролируется тирозиной. Таким образом, можно предположить, что ингибирование тирозиназы позволит существенно уменьшить интенсивность образования  $\beta$ -амилоида [10, 11].

## Выводы

1. Проведено исследование, направленное на оценку антитирозиназных свойств и способности подавлять агрегирование Аβ у производных 3-формилхромона. В результате установлено, что наиболее выраженной фармакологической активностью обладает 6-ацетилзамещенное 3-формилхромона (шифр FC-9), которое ингибировало активность тирозиназы в сопоставимой степени с референтом (кофейная кислота), а также более значимо по сравнению с остальными исследуемыми объектами подавляло процесс агрегации амилоидных частиц.
2. На основании проведенного исследования можно предположить, что 6-ацетилзамещенное производное 3-формилхромона (шифр FC-9)

является перспективным объектом для дальнейшего изучения на предмет возможности использования в качестве патогенетических средств терапии болезни Альцгеймера, в основе действия которого лежит подавление амилоидогенеза.

## ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

1. Takizawa C., Thompson P.L., van Walsen A., et al. Epidemiological and economic burden of Alzheimer's disease: a systematic literature review of data across Europe and the United States of America. *J Alzheimers Dis.* 2015; 43(4):1271–84. 10.3233/JAD-141134
2. Prince M., Wimo A., Guerchet M., Gemma Claire Ali, Yu-Tzu Wu, Matthew A. Prina. *World Alzheimer Report 2015. The Global Impact of Dementia: An analysis of prevalence, incidence, cost and trends.* 2015.
3. Kerr J.S., Adriaanse B.A., Greig N.H. et al. Mitophagy and Alzheimer's Disease: Cellular and Molecular Mechanisms. *Trends Neurosci.* 2017;40(3):151–166. doi:10.1016/j.tins.2017.01.002
4. Mattson M.P. Pathways towards and away from Alzheimer's disease. *Nature.* 2004; 430(7000):631–639.
5. Wang R., Tang P., Wang P., Boissy R.E., Zheng H. Regulation of tyrosinase trafficking and processing by presenilins: partial loss of function by familial Alzheimer's disease mutation. *Proc Natl. Acad. Sci. USA.* 2006; 103(2):–353-358. doi:10.1073/pnas.0509822102
6. Arbor S.C., La Fontaine M., Cumbay M. Amyloid-beta Alzheimer targets – protein processing, lipid rafts, and amyloid-beta pores. *Yale J. Biol. Med.* 2016; 89(1):5–21.
7. Mapunya M.B., Nikolova R.V., Lall N. Melanogenesis and antityrosinase activity of selected South african plants. *Evid. Based Complement Alternat. Med.* 2012; 2012: 374017. doi:10.1155/2012/374017

8. Wang W., Zhao C., Zhu D., Gong G., Du W. Inhibition of amyloid peptide fibril formation by gold-sulfur complexes. *J Inorg. Biochem.* 2017; 171:1–9. doi:10.1016/j.jinorgbio.2017.02.021
9. Esquerda-Canals G., Montoliu-Gaya L., Güell-Bosch J., Villegas S. Mouse Models of Alzheimer's Disease. *J. Alzheimer's Dis.* 2017; 57(4):1171–1183. doi:10.3233/JAD-170045
10. De Biase D., Costagliola A., Pagano T.B., et al. Amyloid precursor protein, lipofuscin accumulation and expression of autophagy markers in aged bovine brain. *BMC Vet. Res.* 2017; 13(1):102. doi:10.1186/s12917-017-1028-1
11. Ohm T.G., Braak H. The pigmented subpeduncular nucleus: a neuromelanin-containing nucleus in the human pontine tegmentum. Morphology and changes in Alzheimer's disease. *Acta Neuropathol.* 1988; 77(1):26–32. doi:10.1007/BF00688239

Поступила 21 сентября 2020 г.

## INFLUENCE 3-FORMYLCHROMONE DERIVATIVES *IN VITRO* AT AGGREGATION OF B-AMYLOID PLAGUES AND TYROSINASE ACTIVITY

© Authors, 2021

### D.I. Pozdnyakov

Ph.D. (Pharm.), Head of Living System Laboratory, Associate Professor, Department of Pharmacology with Clinical Pharmacology Course, Pyatigorsk Medical-Pharmaceutical Institute  
E-mail: pozdniackow.dmitry@yandex.ru

### V.M. Rukovitsyna

Post-graduate Student, Department of Organic Chemistry, Pyatigorsk Medical-Pharmaceutical Institute  
E-mail: rukovicina.vika@mail.ru

### M.V. Larskij

Ph.D. (Pharm.), Head of Pharmaceutical Chemistry Department, Pyatigorsk Medical and Pharmaceutical Institute  
E-mail: pharmachemistry@mail.ru

**Objectives.** Alzheimer's disease is one of the most common terminal forms of dementia, characterized by a complex pathogenesis with the formation of amyloid plaques in the brain structures. At the same time, one of the new and promising areas of Alzheimer's disease therapy is the influence on the amyloidogenic cascade.

**Aim of the study.** *In vitro* to evaluate the effect of ten 3-formylchromone derivatives on the formation of  $\beta$ -amyloid aggregates and tyrosinase activity.

**Materials and methods.** The effect of the studied compounds on tyrosinase activity was evaluated using the Mapunymethod, using L-tyrosine as a substrate and kojic acid as a reference. Aggregation of amyloid plaques was studied spectrophotometrically in reaction with Congo red after three and six days of incubation.

**Results.** Among the test-objects, the most significant antityrosinase properties were found in the 6-acetyl substituted derivative of 3-formylchromone, whose  $IC_{50}$  value was comparable to kojic acid ( $32 \pm 1.913 \mu\text{g/ml}$  versus  $30.2 \pm 1.599 \mu\text{g/ml}$ ). Also, this compound most significantly inhibited the aggregation of amyloid plaques on the third day of incubation—31.0% ( $p < 0.05$ ) and 61% ( $p < 0.05$ ) – on the sixth day. It should be noted that 3-formylchromone and oxime of this compound had no significant effect on tyrosinase activity and amyloidogenesis.

**Conclusion.** This study suggests the relevance of further study of 6-acetyl-substituted 3-formylchromone as a potential means of pathogenetic therapy of Alzheimer's disease.

**Key words:** Alzheimer's disease, chromone derivatives, tyrosinase,  $\beta$ -amyloid.

**For citation:** Pozdnyakov D.I., Rukovitsyna V.M., Larskij M.V. Influence 3-formylchromone derivatives *in vitro* at aggregation of B-amyloid plaques and tyrosinase activity. *Problems of biological, medical and pharmaceutical chemistry.* 2021;24(1):11–15. <https://doi.org/10.29296/25877313-2021-01-02>