

Химическая модификация дигидрокверцетина (таксифолина) и биологическая активность его производных

© Коротеев^{1*} Михаил Петрович, Поздеев¹ Антон Олегович,
Коротеев¹ Александр Михайлович, Казиев¹ Гарри Захарович,
Телешев¹ Андрей Терентьевич и Офицеров^{2*+} Евгений Николаевич

¹ Институт биологии и химии. Московский педагогический государственный университет.

Несвижский пер., д.3. Москва, 119021. Россия. E-mail: chemdept@mail.ru

² Факультет химико-фармацевтических технологий и биомедицинских препаратов. Российский химико-технологический университет им. Д.И. Менделеева. Миусская пл., 9. г. Москва, 125047.

Россия. Тел.: (495) 978-32-61. E-mail: ofitser@mail.ru

*Ведущий направление; +Поддерживающий переписку

Ключевые слова: флавоноиды, связь строение-биологическая активность, 2,3-дигидро-3,5,7-тригидрокси-2-[3',4'-дигидроксифенил]-4H-1-бензопиран-4-он или таксифолин или дигидрокверцетин, УФ-спектры, NaOH, H₂O₂, ацилирование, фосфорилирование, оксимирование, бензилирование, соединения включения, аминотилирование, смешанные эфиры таксифолина, цитотоксичность, антиоксидантная, антипролиферативная активность, актопротекторное действие.

Аннотация

В обзоре рассмотрены последние данные, преимущественно авторов, по строению и химическим свойствам дигидрокверцетина (таксифолина) как одного из представителей растительных флавоноидов (ФЛ). Последние – прекрасные средства не только для профилактики и поддержания здоровья, но и для лечения многих заболеваний, вызванных дисбалансом в работе ферментов. Кроме того, ФЛ обладают антибактериальными, антиоксидантными, мембрано- и иммуно-стабилизирующими, противовоспалительными, противоопухолевыми, противораковыми и др. свойствами, что делает из них достаточно ценные синтоны для химической модификации, исследования биологической активности и разработок новых препаратов.

Исходя из особенностей строения и биологической активности класс растительных флавоноидов по своей реакционной способности, в первую очередь по отношению к кислороду, распадается на две группы: имеющие сопряженные три кольца и группу с отсутствием сопряжения между циклами А и В. Эти различия проявляются в УФ-спектрах, отношении к кислороду, комплексообразовании с металлами, в биологической активности – ингибирующие концентрации могут различаться на два-три порядка. Приведены литературные данные, что в отличие от ранее описанных процессов комплексообразования, дигидрокверцетин (ДКВ) образует комплексы с кислородом, которые принимались за комплексы с металлами. В тех случаях, когда использовались концентрации ДКВ меньшие, чем 0.01%, авторы имели артефакты – комплексы обратимого взаимодействия ДКВ с кислородом, которые и определяли исследуемые свойства. Сделано предположение, что эти комплексы и изменяют проводимость капилляров при действии ДКВ.

Содержание

1. Введение

1.1. Общие сведения

1.2. Антиоксидантные свойства флавоноидов

1.3. Комплексообразующие свойства флавоноидов

2. Физико-химические и химические свойства дигидрокверцетина

2.1. Строение и свойства флавоноидов

2.2. Водорастворимый дигидрокверцетин

2.3. Классические реакции модификации ДКВ – реакции нуклеофильного замещения по гидроксильным группам

- 2.3.1. Метильные производные таксифолина
- 2.3.2. Бензильные производные дигидрокверцетина
- 2.3.3. Ацильные производные дигидрокверцетина
- 2.3.4. Фосфорилированные производные дигидрокверцетина
- 2.3.5. Смешанные эфиры дигидрокверцетина
- 2.3.6. Фосфорилирование тетраалкилированных и пентаацетилированных производных дигидрокверцетина
- 2.4. Реакции с участием карбонильной группы
 - 2.4.1. Оксимпроизводное дигидрокверцетина
 - 2.4.2. Реакции восстановления карбонильной группы
- 2.5. Реакции электрофильного замещения в ароматическом кольце
 - 2.5.1. Синтез аминометиллированных производных дигидрокверцетина
- 3. Исследование цитотоксической и другой биологической активности производных дигидрокверцетина
 - 3.1. Биологическая активность сложноэфирных производных таксифолина
 - 3.2. Биологическая активность фосфорилированных производных ДКВ
 - 3.3. Биологическая активность аминометилированных производных дигидрокверцетина

1. Введение

1.1. Общие сведения

Флавоноиды (бензопираны) составляют большой класс сложных гетероциклических соединений, широко распространенных в растительном мире [1, 2]. В 1936 году А. Сент-Дьёрди и группа немецких учёных показали [3], что целый ряд флавоноидов обладает ярко выраженной биологической активностью, свойственной классическим витаминам. Они частично снимают остроту авитаминоза С, уменьшают проницаемость и ломкость капиллярных кровеносных сосудов. По этой причине флавоноидные соединения также стали относить к витаминам и называть витамином Р (от англ. permeability – проницаемость). Типичными представителями веществ с этой активностью являются катехин, кверцетин, и его гликозид рутин. Сегодня они широко используются при лечении многих заболеваний кровеносных сосудов, гипертонии, кори, скарлатины, сыпного тифа, лучевой болезни и т.д.

В 40-50-х годах прошлого столетия был выделен из коры дугласовой пихты и охарактеризован дигидрокверцетин (таксифолин) – аналог кверцетина, гидрированный в положения 2 и 3 [4, 5]. О выделении дигидрокверцетина из древесины лиственницы даурской было сообщено в 1968 г [6]. Этот продукт обладает особенно высокой Р-витаминной активностью, и еще целым рядом других важных и полезных свойств, отсутствующих у большинства биофлавоноидов. Он проявляет высокую антиоксидантную активность, устойчив к автоокислению, является малотоксичным веществом [7]. Дешевым возобновляемым сырьем для промышленного получения дигидрокверцетина является комлевая часть древесины лиственниц сибирской (*Larix sibirica* L.) и даурской (*Larix dahurica* T.) возможности выделения его показаны в ряде патентов [8]. Все сказанное выше позволяет рассматривать дигидрокверцетин в качестве перспективного, природного биорегулятора.

Самыми значимыми свойствами флавоноидов как биологически важных активных компонентов для человека считаются их антиоксидантные свойства и способность регулировать функции ферментов в организме человека [9].

Антиоксидантные свойства растительных фенолов, в частности флавоноидов, уже нашли массовое применение в пищевой промышленности (стабилизаторы жиров и красители), косметической (стабилизация компонентов кремов), фармакологической (оказывают капилляроукрепляющее или Р-витаминное, кардиотропное действие). Известны противоопухолевое, противовирусное, спазмолитическое и гипотензивное, желчегонное, гепатопротекторное, и др. действия.

Несмотря на различие в строении, отдельным группам флавоноидов приписывают в качестве основного свойства их антиоксидантную активность. На основании этого полагают, что они мало отличаются друг от друга по свойствам и биологической активности [9]. Принято, что механизм их действия основан на участии в метаболических процессах организма с доминирующими свойствами:

- антиоксидантов, разрушающего перекиси;
- хелаторов, связывающего катализаторы окисления (ионы металлов);
- дезактиваторов, инактивирующего возбужденное состояние молекул, вследствие чего гасятся воспалительные процессы.

Все флавоноиды в работе [10] разбиты на две большие группы в зависимости от взаимодействия колец А и В, которое, в конечном счете, определяет и их биологическую активность и химические свойства:

- ди гидрофлавоны, ди гидрофлавонолы, флаван-3-олы, флаван-3,4-диолы имеют во втором положении атом углерода в sp^3 -гибридации, который прерывает цепь сопряжения, с одной стороны, а с другой – уменьшает существенно энергию сопряжения или стабилизации, делая систему более реакционной (группа I) (рис. 1);
- халконы, флавоны, флавонолы, антоцианидины имеют сквозную сопряженную систему связей, охватывающую все три цикла (группа II) (рис. 1, II).

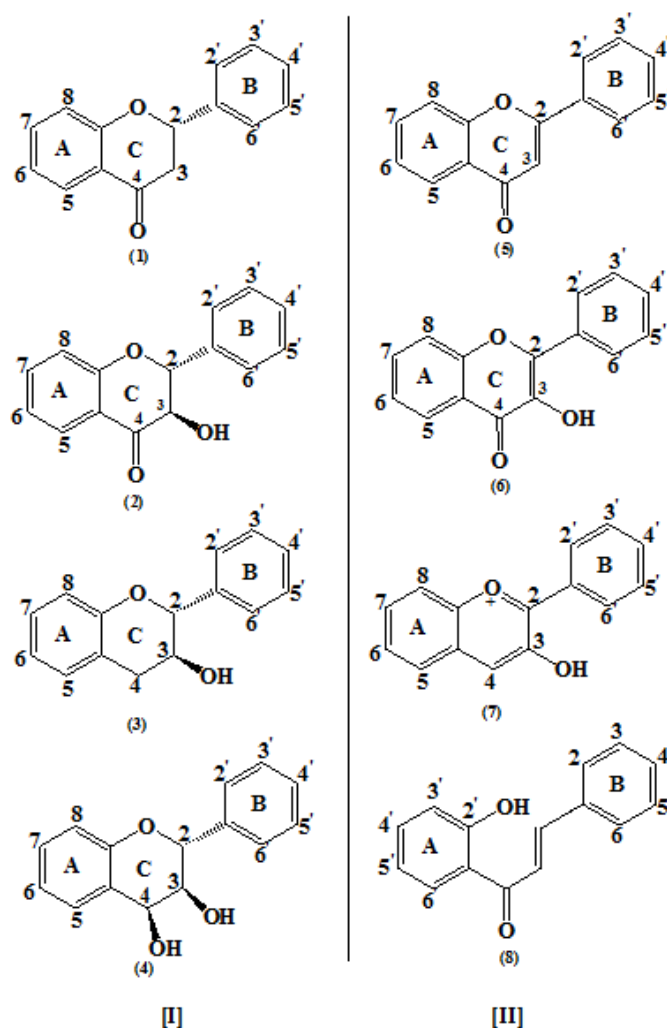


Рис. 1. Основные классы растительных флавоноидов: [I] – соединения, не содержащие двойную связь C_2-C_3 : (1) – ди гидрофлавоны (флаваноны), (2) – ди гидрофлавонолы (флаванонолы), (3) – флаван-3-олы (катехины), (4) – флаван-3,4-диолы. [II] – соединения, содержащие кратную связь C_2-C_3 : (5) – флавоны, (6) – флавонолы, (7) – антоцианидины, (8) – халконы.

Важность сопряжения в проявлении, как биологической активности, так и химической реакционной способности обсуждается ниже на примере литературных данных и полученных нами результатов. Отметим, что на эту особенность исследователи практически не обращают внимания, концентрируя свои усилия на антирадикальных свойствах фенольного гидроксила. Однако процессы окисления, образование первичных продуктов окисления в результате образования метиленхинонов, что характерно для первой группы соединений, затруднено для второй.

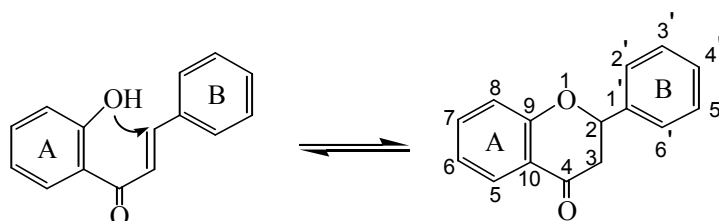
Энергия стабилизации или сопряжения колец А и В в случае второй группы разделяет эти две группы по отношению к кислороду и в реакциях комплексообразования с переходными металлами.

С точки зрения теоретической органической химии это два разных типа, и эти различия должны сказываться не только на их реакционной способности, но и на биологической активности.

Отвлечёмся от антирадикальной активности флавоноидов и отметим их как вещества, способные воздействовать на активность ферментов. Они обладают способностью к поддержанию, сохранению и коррекции многих нарушений путем воздействия на ферменты и метаболизм в организме.

1.2. Антиоксидантные свойства флавоноидов

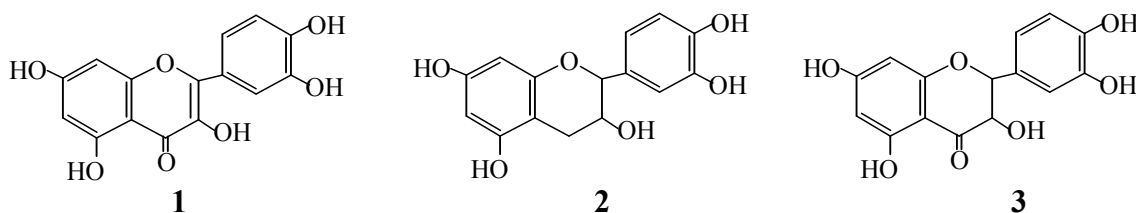
Биогенетическими предшественниками рассматриваемых веществ служат халконы. Образование циклической системы флавоноидов происходит путем внутримолекулярной реакции Михаэля – атака фенольного кислорода по активированной двойной связи халкона.



По данным литературы, антиокислительная активность флавоноидов может быть обусловлена способностью взаимодействовать с радикалами липидов, активными формами кислорода, ионами металлов переменной валентности [11, 12]. При этом существует тесная взаимосвязь между химической структурой и антиоксидантной активностью этих соединений. Последние исследования [13] показали, что существует несколько критериев для эффективной антиокислительной активности флавоноидов:

1. Наличие *орто*-дигидроксистеруктуры в В-кольце, которая определяет высокую стабильность к образованию радикала и участвует в делокализации электрона;
2. Наличие у некоторых флавоноидов 2,3-двойной связи в сочетании с карбонильной группой в положении 4, отвечающей за делокализацию электрона. Потенциальная антиоксидантная активность связана со структурой ароматического ядра в условиях делокализации электрона;
3. Наличие свободных гидроксильных групп в положениях 3 и 5 в сочетании с карбонильной группой в 4 положении в А и С-кольцах;
4. Увеличение числа гидроксильных групп в В-кольце при условиях наличия пирокатехиновой и пирогаллольной группировок, которое приводит к повышению антиокислительной активности.

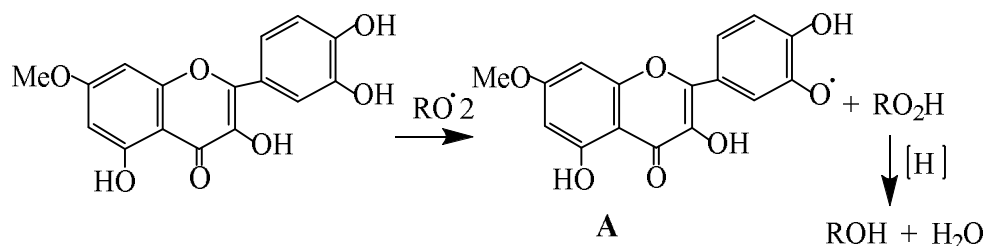
Для примера, кверцетин **1** удовлетворяет всем условиям и является более эффективным антиоксидантом по сравнению с другими флавоноидами, в частности, с катехином **2**, который характеризуется лишь первым условием [14], и диgidрогкверцетином **3**, который соответствует трем вышеперечисленным условиям.



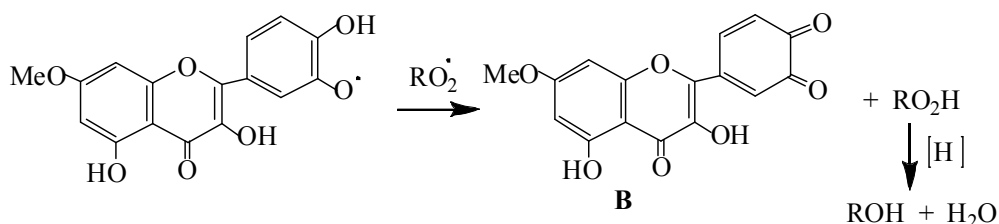
Вследствие этого кверцетинсодержащие лекарственные препараты получили широкую распространенность в медицине и фармакологии. Однако многочисленные исследования [15, 16-18] показывают, что диgidрогкверцетин имеет меньшую мутагенную активность и токсичность, чем другие представители этого класса [19, 20].

Согласно Chimi H. [21] флавоноиды ингибируют окисление липидов, перехватывая образующиеся пероксильные радикалы, в две стадии (на примере рамнетина):

1. Протон от фенольного антиоксиданта переходит на пероксильный радикал, при этом образуется гидропероксид и феноксильный радикал А:



2. Феноксильный радикал взаимодействует с пероксидным радикалом, образуя продукт с хиноидной структурой В:



В работе [10] показано обратимое образование комплексов ДКВ с кислородом. Эти комплексы наносят отпечаток и на результаты определения антиоксидантной активности ДКВ при низких концентрациях в растворах, меньших $5 \cdot 10^{-3}$ моль/л. Взаимодействием ДКВ с кислородом воздуха можно объяснить и несовпадающие между собой результаты по определению потенциалов полуволн для ДКВ, проведенные L. Jorgensen и в работе [71]. Так, L. Jorgensen в 1998 г показал, что в результате одноэлектронного процесса окисления кверцетина и кемферола происходит образование флавоноидного феноксильного радикала из гидроксильной группы в положении 3 кольца С. Потенциалы полуволн для этого процесса составили 0.97, 0.98 и 1.17 В для кверцетина, кемферола и лютеолина, соответственно.

В свою очередь в работе [71] было так же исследовано вольтамперометрическое поведение соединений фенольного ряда, в том числе кверцетина, дигидрокверцетина и рутина в растворах, продухиваемых инертным газом, и в атмосфере инертного газа.

Полученные в [71] результаты показывают, что указанные соединения существенно отличаются по легкости окисления, хотя и имеют очень близкие значения констант скорости взаимодействия с супероксид анион-радикалом (табл. 1).

Табл. 1. Константы скорости взаимодействия фенольных антиоксидантов с $O_2^{\bullet-}$

Фенольные антиоксиданты	$k \cdot 10^{-3}$, л/моль·с	S_f
Ионол	8.9 ± 0.1	0.01
Кверцетин	9.4 ± 0.5	0.02
Дигидрокверцетин	10.4 ± 0.3	0.02
Рутин	9.3 ± 0.5	0.02

Как видно из табл. 1, константы скорости взаимодействия имеют один порядок и близки по своим значениям. Это говорит о том, что все исследуемые антиоксиданты приблизительно в равной мере способны взаимодействовать с $O_2^{\bullet-}$. Однако, полученные результаты с анион-радикалом кислорода нельзя переносить на взаимодействие флавоноидов с молекулярным кислородом, находящимся в триплетном состоянии.

На вольтамперограммах кверцетина наблюдаются две волны окисления с четко выраженными пиками при потенциалах 0.65 и 1.0 В (рис. 2) [71].

Для дигидрокверцетина, в отличие от кверцетина, первый пик не проявляется. Второй пик при менее положительных потенциалах, чем у кверцетина 0.93 В (рис. 3) [71].

Как следует из приведенных в [71] материалов, полярографические исследования проводятся с растворами низких концентраций, которые сравнимы с концентрацией растворенного

ХИМИЧЕСКАЯ МОДИФИКАЦИЯ ДИГИДРОКВЕРЦЕТИНА (ТАКСИФОЛИНА) И БИОЛОГИЧЕСКАЯ... 94-120 кислорода. Поэтому *L. Jorgensen* просто мог не увидеть первую волну окисления в случае кверцетина из-за взаимодействия последнего с кислородом, растворенным в образце. В нашем случае эксперименты проводились в инертной атмосфере.

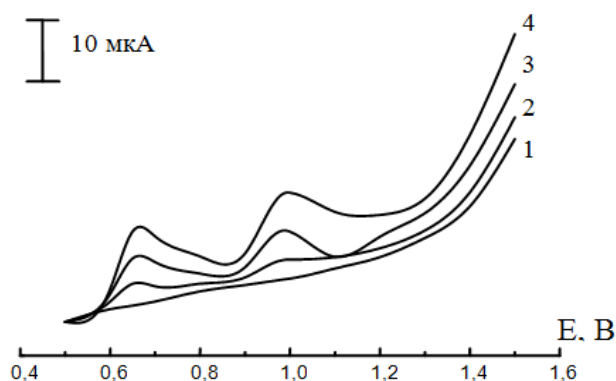


Рис. 2. Вольтамперограммы окисления кверцетина на стеклоуглеродном электроде на фоне 0.1 М HClO_4 в ДМФА: 1 – 0; 2 – $6 \cdot 10^{-5}$; 3 – $1.8 \cdot 10^{-4}$; 4 – $3.7 \cdot 10^{-4}$

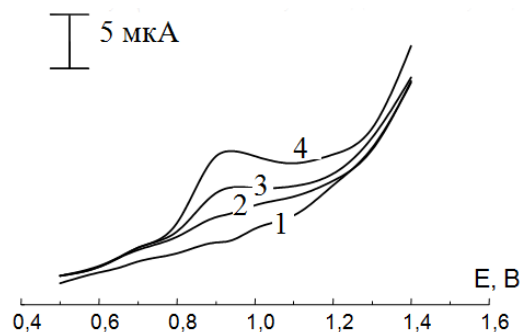


Рис. 3. Вольтамперограммы окисления ДКВ на стеклоуглеродном электроде на фоне 0.1 М HClO_4 в ДМФА: 1 – 0; 2 – $5.8 \cdot 10^{-5}$; 3 – $1.7 \cdot 10^{-4}$; 4 – $2.9 \cdot 10^{-4}$

Учитывая, что кверцетин окисляется намного легче ДКВ, необходимо признать, что в не ферментативных условиях накопления кверцетина происходить не будет. Он будет трансформироваться в последующие продукты окисления. Поэтому те случаи, когда наблюдали образование кверцетина из ДКВ в реакциях окисления необходимо признать артефактами.

Полученные в [10] результаты по взаимодействию кислорода с ДКВ позволяют по-новому посмотреть на многие результаты, приведенные в литературе, в том числе и на изменение проводимости капилляров под действием ДКВ.

В литературе описываются “активные” участки ФЛ. Чаще всего указывается участие пирокатехиновых гидроксильных групп ($\text{C3}'\text{-C4}'$ в кольце В) при ферментном ингибировании, так как именно в этом положении молекула ФЛ охотнее всего отдает электрон и способна связываться с ферментом [9d], также именно в этом положении вероятнее всего происходит присоединение остатка фосфорной кислоты от кофермента к флавоноиду, что приводит к инактивации. Относительно региоселективности фосфорилирования ДКВ результаты обсуждаются ниже.

Может быть эти рассуждения и верны, однако в случае ДКВ, как показано Нифантьевым Э.Е. с сотр., фосфорилирование идет в первую очередь по гидроксильной группе в положении C7 , что еще раз подтверждает отличие флавоноидов первой группы от второй и ДКВ от кверцетина. Также стоит отметить, что многие ферменты содержат в качестве каталитического центра ион переходного металла, и считается, что ФЛ в силу своих высоких комплексообразующих свойств [9a-b,h,j], способны образовывать стабильные комплексы с активными центрами фермента, причем хелатирование может происходить в разных участках молекулы ФЛ (при $\text{C3}'$, $\text{C4}'$ гидроксильных группах в кольце В [9d,j], при C3 -гидроксильной- C4 -карбонильной положениях и при C4 - C5 положениях [9j]).

Поэтому широкий спектр биологической активности флавоноидов реализуется множеством различных молекулярных механизмов, зависящих от строения ФЛ и которые можно разделить на две группы: специфические и неспецифические. К первой группе следует отнести механизмы биологического действия, обусловленные специфическим взаимодействием с активными центрами ферментов или с различными рецепторами. Как пример: стереоспецифическое взаимодействие с АТФ-связывающими центрами белков-мишеней, которому способствует наличие двойной связи в положении C2-C3 и катехольной группы в кольце В, по-видимому, обуславливает конкурентное ингибирование флавоноидами различных киназ.

В случаях неспецифического ингибирования связывание флавоноидов с ферментами происходит вне активного центра, но приводит к изменениям в пространственной геометрии белковых молекул, что сильно затрудняет или даже делает невозможным их специфическое взаимодействие с субстратом. Например, регуляция ферментов путем фосфорилирования-

Обзор _____ Коротеев М.П., Поздеев А.О., Коротеев А.М., Казиев Г.З., Телешев А.Т. и Офицеров Е.Н. дефосфорилирования, когда изменяется активность фермента в результате ковалентной модификации; аллостерическая регуляция [9с]. Вероятность реализации неспецифических механизмов ингибирования активности ферментов особенно велика у кверцетина, более 98% которого находится в плазме в виде стабильных комплексов с различными белками [9с].

Из анализа всех полученных данных сделан вывод [10] о том, что ДКВ в растворах образует продукты взаимодействия с кислородом воздуха, растворенном в воде или спирте, в зависимости от того, в чём производили запись спектра, которым соответствует полоса при 325 нм. Причем необходимо отметить, что образовавшийся продукт может быть восстановлен до исходного дигидрокверцетина любым восстановителем. Авторами использовалась аскорбиновая кислота и металлы с переменной валентностью.

Были изучены супероксидперехватывающие способности других флавоноидов [22]. Согласно Ну [22], эта способность возрастает с увеличением ОН-групп в В-кольце.

1.3. Комплексообразующие свойства флавоноидов

Считается, что флавоноиды, особенно те из них, которые обладают пирокатехиновым фрагментом, являются прекрасными комплексообразователями и образуют комплексы с рядом металлов. Как известно, процесс комплексообразования отличается большими скоростями реакций и используется в аналитической химии для экстракции и определения металлов.

В данном разделе приведены сравнительные данные только по комплексообразованию таксифолина и кверцетина в связи с тем, что на этих примерах удалось обнаружить принципиальные отличия в их химическом поведении. При исследовании комплексообразования ДКВ с нитратом кадмия в водном растворе авторы [10] столкнулись с тем, что исходный раствор ДКВ не стабилен и в течение времени в нем появляется и растет полоса $\lambda_{\text{max}} = 325 \pm 3$ нм, точно такая же как и при комплексообразовании. Оказалось, что раствор ДКВ в предварительно продутом несколько раз азотом растворителе для удаления кислорода стабилен, а при добавлении в такой раствор соли металла обнаруживаются поразительные вещи.

Во-первых, процесс протекает несколько дней. Как следует из профилей кривых, вначале происходит рост интенсивности полосы при 325 нм, а затем протекает обратный процесс.

Во-вторых, необходимо отметить, что имеется изобестическая точка, указывающая на относительную простоту или обратимость процесса, что говорит о том, что в реакционной среде присутствуют только два соединения. И если бы вторым соединением был комплекс ДКВ с катионом кадмия, тогда следовало бы ожидать трансформацию его в третье соединение, отличающееся спектром поглощения. В литературе принято считать, что первым продуктом окисления ДКВ является кверцетин, но учитывая потенциалы ионизации этих соединений, можно констатировать, что кверцетин как донор превосходит по донорным свойствам ДКВ и в реакционной среде накапливаться не может.

В-третьих, полученные в [10] данные по комплексообразованию с рядом металлов показывают удивительный факт – независимо от характера металла образуется один и тот же комплекс, имеющий максимум полосы поглощения $\lambda_{\text{max}} = 325 \pm 3$ нм. Исключение составляют металлы с переменной степенью окисления, взятые в реакцию комплексообразования в восстановленной форме. Такими исследованными металлами были Fe^{2+} , Mn^{+2} и Sn^{2+} .

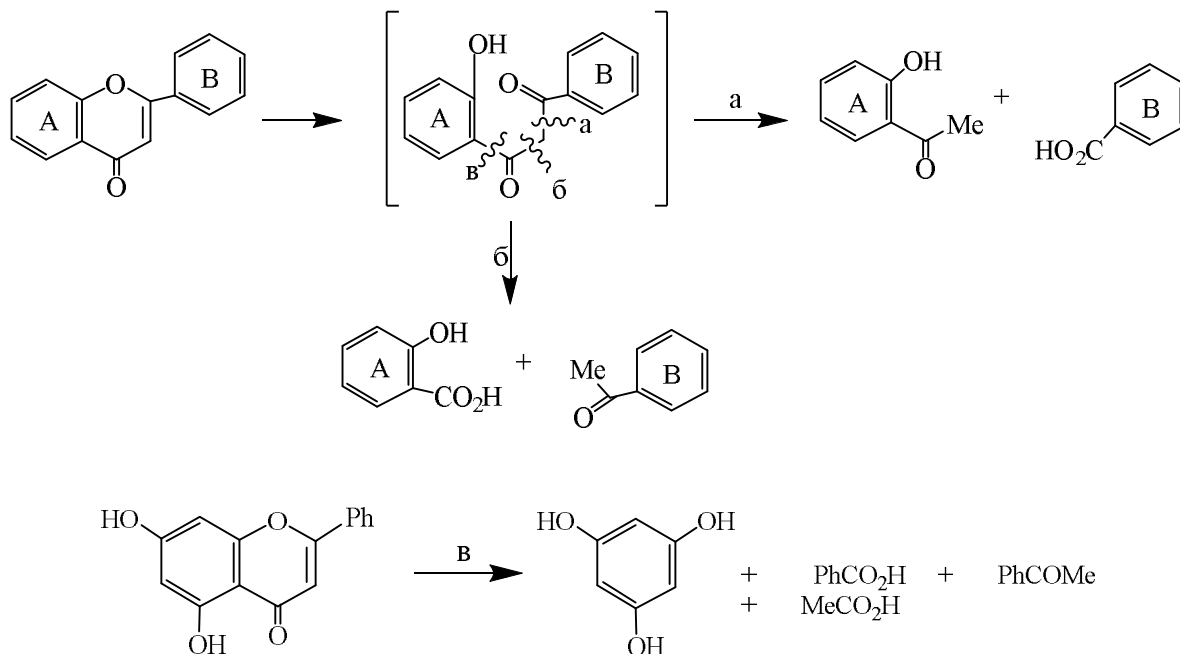
Спектры поглощения раствора SnCl_2 и ДКВ в воде как без продувки, так и с продувкой азотом, записанные в течение недели, совпадают и не изменяются. Наблюдается только один четкий пик при 285-290 нм и плечо при 230-235 нм исходного ДКВ. Эти полосы соответствуют спектру исходного ДКВ. Изобестические точки отсутствуют. Всё это свидетельствует в пользу того, что процесса комплексообразования в данном случае не происходит. Подтверждением является и выделение исходного ДКВ при стоянии.

Необходимо отметить, что в случае окисленного продукта ДКВ кверцетина процесс комплексообразования протекает нормально. Устойчивыми являются и растворы кверцетина. В них не происходят изменения, характерные для ДКВ. Можно было предположить, что происходит окисление ДКВ. Исходя из этого, попытались окислить ДКВ перекисью водорода в щелочных условиях, но предварительно исследовали описанное в литературе взаимодействие ДКВ со щёлочью. Оказалось, что и в данной реакции ДКВ ведет себя отлично от кверцетина и других сопряженных флавоноидов.

2. Физико-химические и химические свойства дигидрокверцетина

2.1. Строение и свойства флавоноидов

Классическим методом определения строения флавоноидов является щелочной гидролиз. Реакция протекает через промежуточное образование β -дикарбонильного соединения, которое может далее распадаться различными путями. Если кольцо А является производным флуороглюцина, как это часто имеет место, то для обеих систем возможно расщепление по направлению (в) [23].



Излишне говорить, что потребовались значительные усилия, чтобы заменить эти сложные химические методы деструкции методами спектроскопии.

Для установления строения флавоноидов наиболее полезна спектроскопия ЯМР [24, 25, 26]. Обычно нелегко точно отнести сигналы в спектре ЯМР ^1H , хотя сигнал протона в положении 3 должен быть синглетом и поэтому его можно отличить от других сигналов, а по наличию или отсутствию этого сигнала можно отличить флавоны от флавонолов [26]. Исключительно перспективным методом является спектроскопия ЯМР ^{13}C [25-27]. В работах [25, 27] были изучены спектры ЯМР ^{13}C для дигидрофлавонов, дигидрофлавонолов, флаванов, халконов, флавонолов, изофлавонов и некоторых их гликозидов в дейтерированном диметилсульфоксиде.

Вычисленные на основе простых моделей значения химических сдвигов хорошо согласуются с экспериментальными данными, за исключением значений для C-3', C-5' и C-6. Химический сдвиг атома углерода карбонильной группы C-4 является определяющей величиной для многих флавоноидов (~180-190 м.д.).

В последнее время в сферу структурных исследований биофлавоноидов активно внедряется метод рентгеноструктурного анализа, дающий наглядное представление о пространственном расположении молекул. Среди исследованных этим методом флавоноидов преобладают соединения с флавоновым и флавоноловым скелетом. Значительно меньше изучены флавоноидные соединения с насыщенной гетероциклической системой, имеющие более сложную стереохимическую структуру в связи с наличием в молекуле центров хиральности и способные существовать в виде оптически активных стереоизомеров. При этом объектами исследования служили флавановые соединения с одним центром хиральности и, как правило, находящиеся в оптически неактивной форме: нарингенин, гесперетин, онисилин и др.

Работа [28] посвящена рентгеноструктурному исследованию оптически активного дигидрокверцетина, обладающего правым вращением. Кристаллы дигидрокверцетина для рентгеноструктурного анализа получали из водно-этанольного раствора при комнатной температуре.



Рис. 4. Независимые молекулы в ячейке кристалла дигидрокверцетина (3)

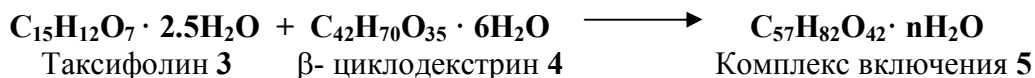
Гетероциклическое кольцо молекулы имеет конформацию несимметричного кресла с плоской системой четырех атомов O(1)-C(8a)-C(4a)-C(4). В молекуле дигидрокверцетина торсионный угол вокруг связи O(1)-C(2)-C(9)-C(10) (см. рис. 4) составляет 78.4°. В различных флавоноидных соединениях расположение замещенного фенильного кольца относительно гетероциклической системы варьирует от почти параллельного до почти перпендикулярного. Это может быть связано с низким барьером вращения кольца В вокруг ординарной связи C(1)-C(10), а также с различным окружением молекул в кристалле.

Стопки молекул объединяются между собой посредством межмолекулярных водородных связей $O(3) \dots O(2')$. Образующиеся объемные слои соединяются между собой посредством гидратных мостиковых молекул воды в бесконечный трехмерный структурный мотив.

2.2. Водорастворимый дигидрокверцетин

Обладая уникальными биологическими свойствами, ДКВ имеет один недостаток – это плохая растворимость в воде при нормальной температуре, что является препятствием при приготовлении инъекционной формы. Отсутствие хорошей растворимости свободного ДКВ в воде и физиологическом растворе препятствует его усвоению организмом и при пероральном приеме.

В связи со сказанным был разработан способ получения неизвестных ранее аддуктов ДКВ. С этой целью синтезированы комплексы включения ДКВ в α - и β -циклодекстрины. Эти супрамолекулярные представители действуют в организме пролонгированно и устойчивы при транспортировке в кровяном русле. Процесс получения комплекса ДКВ с β -циклодекстрином протекает по следующей схеме:



Было показано, что растворимость в воде при 20 °С выделенного супрамолекулярного соединения ДКВ : β -циклодекстрин в отношении 1:1 по сравнению со свободным ДКВ (0.3 г/л) и свободным β -циклодекстрином (18.5 г/л) заметно увеличивается и составляет 53.2 г/л.

Полученное соединение включения было изучено на сравнительную со свободным ДКВ скорость диффузии (проникновения) через бислой стандартных двуслойных липосом из яичного лецитина, являющийся хорошей моделью клеточных мембран. Установлено, что «не-включенный» (индивидуальный) ДКВ сильно связывается с мембранами и внутрь клеток практически не поступает. В то же время «включенный» таксифолин в течение нескольких

Наиболее показательным способом исследования проницаемости ДКВ через биомембраны является определение его содержания в крови после перорального введения в желудок. Через 2.5-3 часа после введения чистого ДКВ и его производных α -циклодекстрин + ДКВ и β -циклодекстрин + ДКВ в плазме крови крыс был обнаружен ДКВ только в случае использования препарата β -циклодекстрин + ДКВ. Следовательно, можно утверждать, что введение указанного препарата обеспечивало эффективное проведение ДКВ в кровяное русло крыс.

При пероральном введении чистого несвязанного ДКВ в желудок крыс он накапливается в их печени и при большой концентрации может вызывать аллергию и другие виды токсикации. В то же время ДКВ в комплексе с β -циклодекстрином в печени не накапливается и не вызывает побочного действия.

Строение инкапсулированного ДКВ **5** исследовано методом РСА. Результат рентгенодифракционного исследования комплекса включения подтверждает его состав дигидрокверцетин : β -циклодекстрин в соотношении 1:1. В проекции на плоскость его структура выглядит следующим образом (рис. 5).

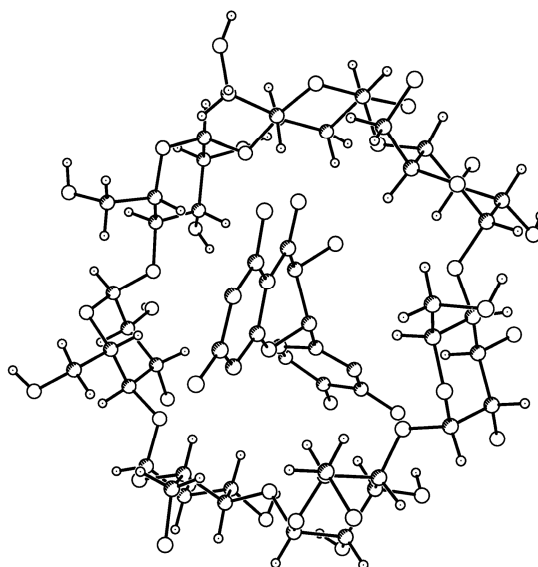


Рис. 5. Молекулярная структура β -циклодекстриндигидрокверцетина

Таким образом, найден способ получения неизвестного ранее комплекса включения флавоноида ДКВ **3** в β -циклодекстрин **4** путем взаимодействия гостя и хозяина.

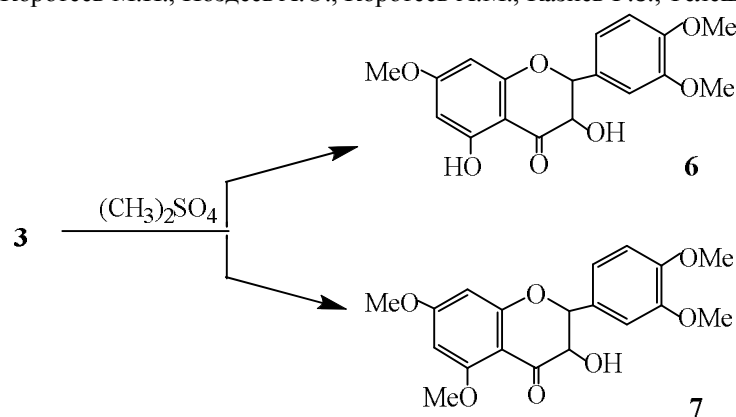
Показано, что использование таксифолина в виде комплекса с β -циклодекстрином более перспективно в медикаментозном аспекте, чем чистого ДКВ. На данное изобретение выдан патент РФ № 2396077 [29].

2.3. Классические реакции модификации ДКВ – реакции нуклеофильного замещения по гидроксильным группам

2.3.1. Метильные производные таксифолина

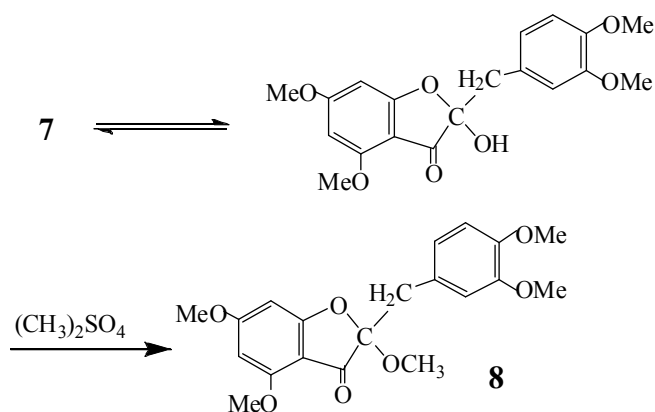
Как известно, метилирование широко используется при изучении строения фенольных соединений с целью их идентификации. Метилированные производные получены для многих флавоноидов.

Было изучено метилирование дигидрокверцетина в различных условиях [30]. В результате проделанной работы были получены в зависимости от условий 3',4',7-триметоксидигидрокверцетин **6** и 3',4',5,7-тетраметоксидигидрокверцетин **7** при обработке дигидрокверцетина диметилсульфатом в присутствии безводного карбоната калия в ацетоне или метаноле. При использовании в качестве метилирующих реагентов йодистого метила или диазометана реакции протекают в том же направлении, но с меньшим выходом. Строение полученных метиловых эфиров было доказано позднее с использованием методов ЯМР-спектроскопии на ядрах ^1H и ^{13}C [27, 31].

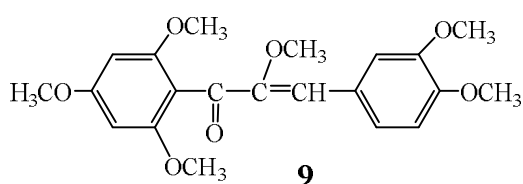


Эти эксперименты, в свою очередь указывают на пониженную реакционную способность гидроксильной группы у атома углерода в 5 положении, атом водорода которой имеет прочную водородную связь с атомом кислорода карбонильной группы.

В отличие от пентаметоксикверцетина, пентаметоксидигидрокверцетин прямым метилированием получить не удалось [32]. Авторы связывают это с тем, что при дальнейшем метилировании тетраметоксидигидрокверцетина происходит перегруппировка с образованием бензилхалкона **8**.

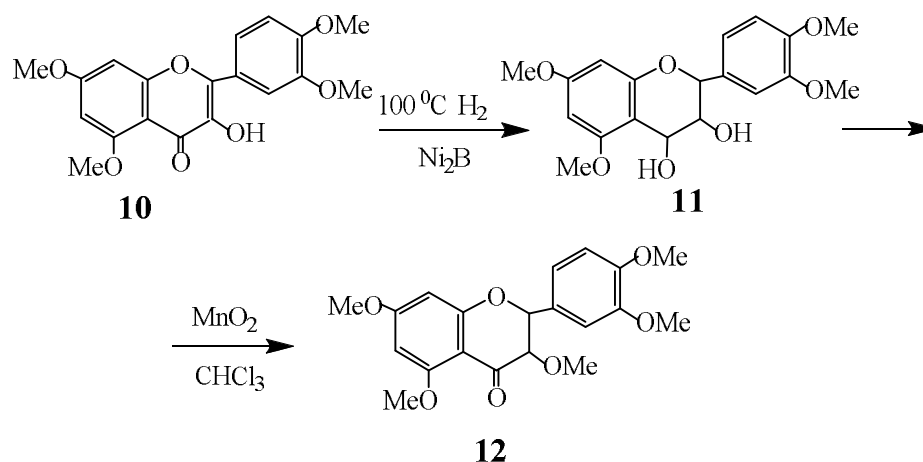


Ранее авторы обозначали соединение **8** как 3',4',3,5,7-пентаметоксидигидрокверцетин. В то же время низкотемпературное метилирование дигидрокверцетина в сильно щелочной среде приводит к образованию 2,3',4',4,6- α -гексаметоксихалкона **9**:



Исследователями также было показано, что метилирование метилйодидом и диазометаном в присутствии карбоната калия в безводном ацетоне приводит к образованию три- и тетраметоксипроизводных в зависимости от количества используемого метилирующего реагента. Но полного метилового эфира дигидрокверцетина в этих работах не обнаружено. И в отличие от реакций метилирования метилйодидом и диазометаном, реакции, в которых в качестве алкилирующего реагента использовали диметилсульфат, проходили с более высоким выходом.

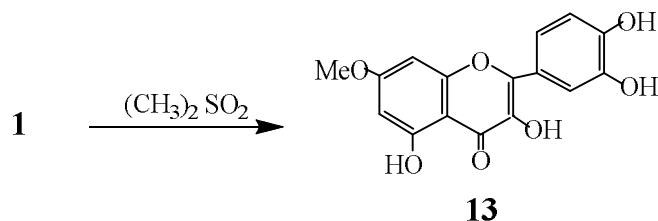
Однако позже было установлено, что для дигидрокверцетина можно получить пентаметоксипроизводное косвенным путём, а не прямым, как считалось ранее. Кларк-Льюисом и сотрудниками [33] был получен *цис*-3',4',3,5,7-пентаметоксифлаван **12** следующим образом. Кверцетин обрабатывали диметилсульфатом в присутствии карбоната калия в ацетоне, получая при этом пентаметиловый эфир кверцетина, который затем восстанавливали при 100 °С и 135 атм над боридом никеля, взятого в качестве катализатора, в течение 12 ч. При этом получается 3,5,7,3',4'-пентаметоксифлаван-4-ол, который далее окисляли до 3,5,7,3',4'-пентаметоксифлавонона в хлороформе с диоксидом марганца в течение трёх дней при комнатной температуре.



В структуре флавоноидов присутствует большое число гидроксильных групп. Метилирование этих групп возможно без ограничений. Более интересный аспект – частичное метилирование гидроксильных групп в определенных позициях [34]. Эта реакция зависит от двух важных факторов:

1. Реакционная способность определенных гидроксильных групп.
2. Частичная защита некоторых гидроксильных групп.

В результате исследования этой реакции было установлено, что только в флавоноидах, флаванонах и изофлаванонах, гидроксильная группа в 7-ом положении обладает большей активностью и частичное метилирование по указанной позиции было успешно осуществлено [35]. В отличие от дигидрокверцетина, реакция монометилирования была проведена для кверцетина диметилсульфатом в присутствии гидрокарбоната натрия в ацетоне при пропускании углекислого газа [36].

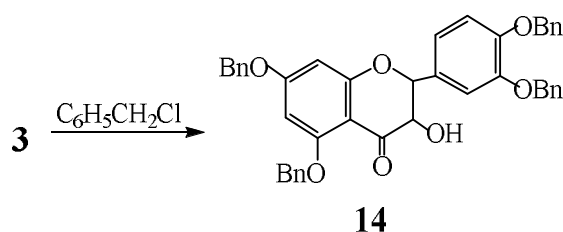


С выходом 80% был получен 7-метилловый эфир кверцетина **13**. Также реакция частичного метилирования ряда флавоноидов была успешно применена для лабораторных синтезов прунетина, сантала и сакурнетина. Таким образом, наличие в кверцетине двойной связи в пирановом фрагменте молекулы позволяет получать тотально метилированные производные.

Необходимо отметить, в литературе не указывается при обсуждении региоселективности фосфоилирования на её характер – кинетический или термодинамический, так как реакция обратима.

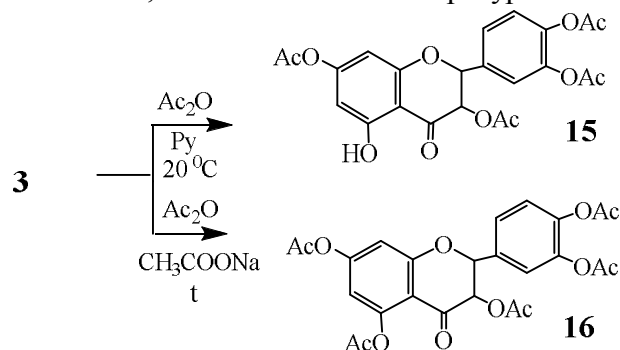
2.3.2. Бензильные производные дигидрокверцетина

Фроденберг и Вайнгес занимались изучением антоцианидинов, в частности, ими были выполнены эксперименты с дигидрокверцетином [37], проведена реакция бензилирования и получено тетрабензилированное производное дигидрокверцетина **14**. Флавоноид обрабатывали хлористым бензилом в присутствии карбоната калия и йодида натрия. Соединение **14** выделяли в чистом виде кристаллизацией из толуола.



2.3.3. Ацильные производные дигидрокверцетина

При взаимодействии ДКВ с уксусным ангидридом Афтом были синтезированы ацильные производные: тетраацетат **15** и пентаацетат **16** [38]. Подробное изучение структуры ацетатов проводили при помощи УФ-, ИК-, ЯМР-спектроскопии [38, 39]. Различием в способах получения служили условия проведения реакций, т.к. для получения пентаацетата дигидрокверцетина нужны более жесткие условия, способствующие разрыву водородной связи, в частности, более высокая температура.



В настоящее время структура **15** исследована при помощи метода рентгеноструктурного анализа [40]. Геометрические характеристики молекулы после ацетилирования по сравнению с таковыми для исходного флавоноида практически не изменяются. В молекуле тетраацетата дигидрокверцетина сохраняется водородная связь между атомом кислорода карбонильной группы и атомом водорода гидроксильной группы в пятом положении.

Угол поворота ароматического кольца В также практически не изменяется.

В кристалле молекулы находятся в виде димеров с бифуркатной водородной связью (рис. 6).

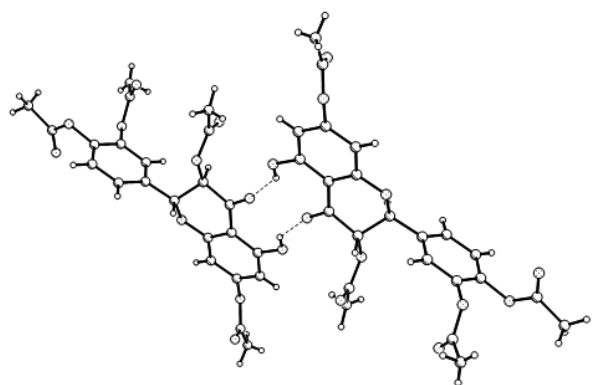
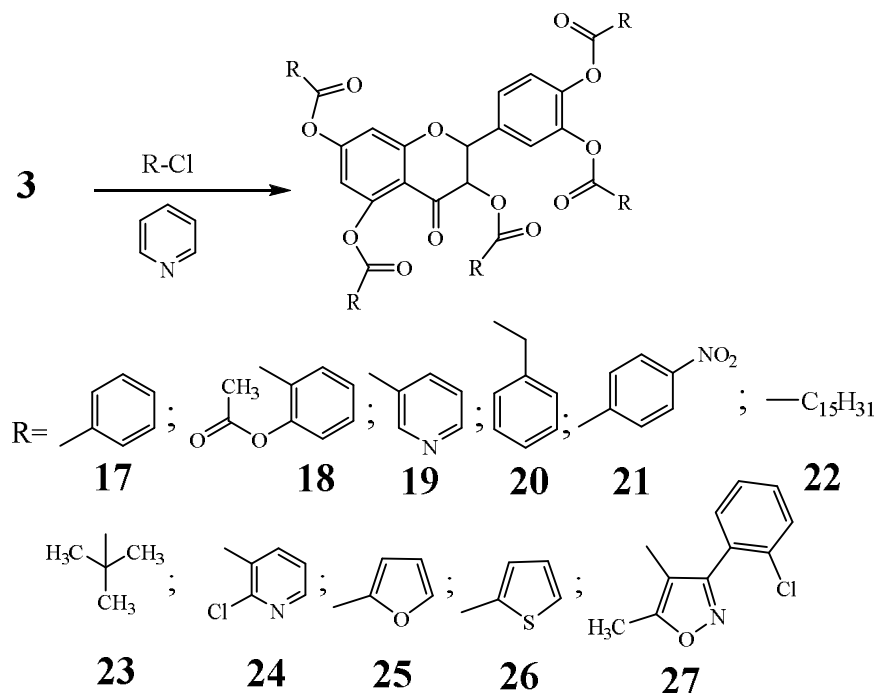
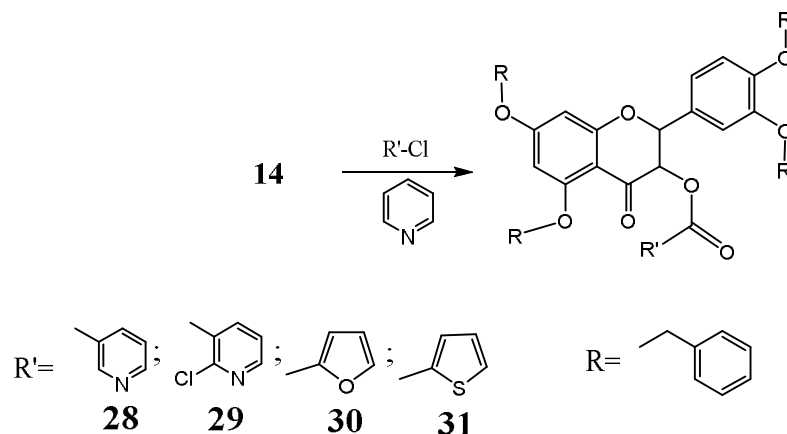


Рис. 6. Расположение молекул **15** в кристалле

Более сложные ацильные производные ДКВ были получены обработкой флавоноида серией хлорангидридов карбоновых кислот [41, 42]. При этом многие из ароматических и гетероароматических карбоновых кислот являются синтетическими предшественниками лекарственных средств: бензойная **17**, ацетилсалициловая **18**, никотиновая **19**, *n*-нитробензойная **20**, фенолуксусная **21**, пальмитиновая **22**, триметилуксусная **23**, 2-хлорникотиновая **24**, 2-фурановая **25**, 2-тиофеновая **26**, 3-фенилхлор-5-метил-4-изоксазоловая **27**:



Так же были синтезированы ацильные производные 3',4',5,7-тетрабензил-ДКВ, содержащие в структуре остатки гетероциклических карбоновых кислот [43]:

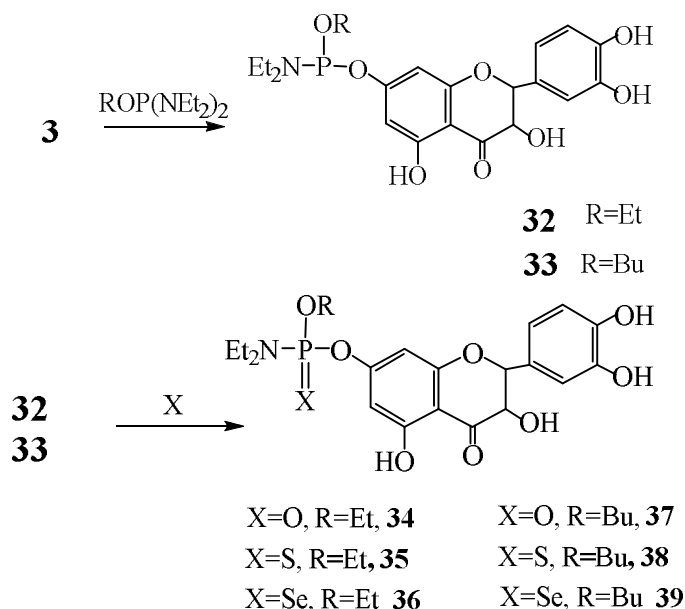


2.3.4. Фосфорилированные производные дигидрокверцетина

Многочисленные исследования были посвящены взаимодействию ДКВ с фосфорорганическими соединениями. Так авторами работ [44-47] было показано, что дигидрокверцетин и его простые и сложные эфиры при взаимодействии с некоторыми амидами фосфористой кислоты может претерпевать региоселективное фосфорилирование отдельных гидроксильных групп. В амидном методе в отличие от галогенангидридного не выделяется агрессивных побочных продуктов, хотя реакционная способность амидов несколько ниже. Это, по-видимому, и позволяет проводить процесс региоселективно.

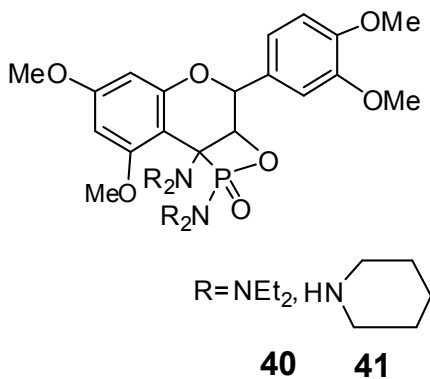
Так, например, было осуществлено фосфорилирование, которое протекало только по гидроксильной группе в седьмом положении с образованием фосфитов **32** и **33**.

В тоже время переход к самим фосфатам был сопряжен со значительными сложностями подбора необходимого окислителя. Реакции с оксидами азота, озоном и серным ангидридом не привели к положительным результатам. Как показали многочисленные эксперименты, наиболее хорошим окислителем оказалась гид-роперекись третбутила. В результате с хорошими выходами (75-80%) были получены амидо-фосфаты **34**, **35**. Фосфиты **32** и **33** легко присоединяли селен и серу, и таким образом были переведены в соответствующие тион- **36**, **37** и селенонфосфаты **38** и **39**.



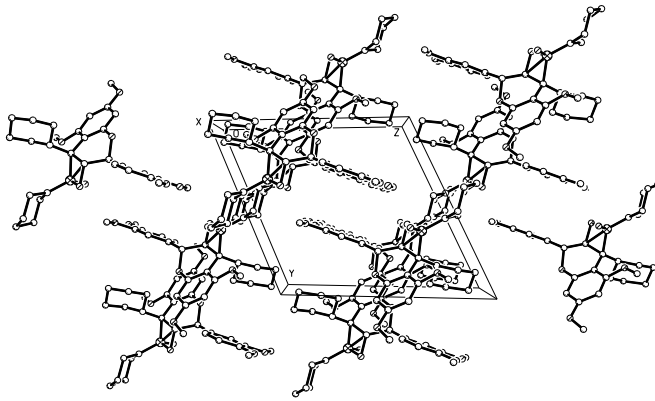
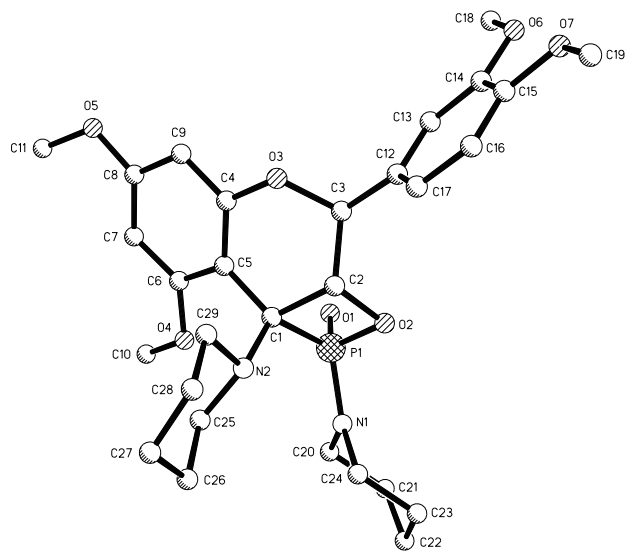
Если в описанных выше работах исследовалось фосфорилирование фенольных групп, то фосфорилирование спиртового гидроксильного фрагмента в молекуле дигидрокверцетина было исследовано Э.Е. Нифантьевым [46], при этом фенольные фрагменты молекулы были защищены метильными группами **7**. Фосфорилирование проводили хлорангидридным и амидным методом. Изучены некоторые химические свойства синтезированных фосфитов: реакции окисления и сульфуризации, комплексообразования с производными переходных металлов: меди и платины.

Интересно, что нагревание полученных амидофосфитов до 110 °С в течение одного часа приводило к внутримолекулярной циклизации этих соединений с образованием фостонового фрагмента **40**, **41** [47, 48].



Механизм этой реакции на данный момент не установлен. Авторы предполагают, что атака электрофильного атома фосфора диамидофосфитной функции электродефицитного атома углерода карбонильной группы флавоноида приводит к образованию четырехчленного цикла, с последующим переносом амидной группы к атому углерода пиранового кольца, одновременно с этим протекает образование фосфорильного фрагмента.

Синтезированные продукты **40**, **41** оказались устойчивы к гидролизу в кислой и нейтральной средах, алкоголизу и аминолиту даже при продолжительном нагревании реакционной смеси до температуры 100-120 °С. Однако щелочной гидролиз фостона с пиперидильными радикалами **41** проходит достаточно эффективно в течение 2 часов при небольшом нагревании (30-40 °С), с образованием ожидаемого амидофосфоната **42**.

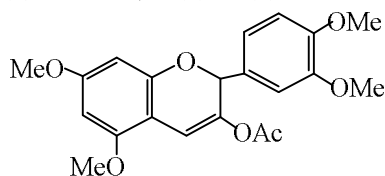


а) б)

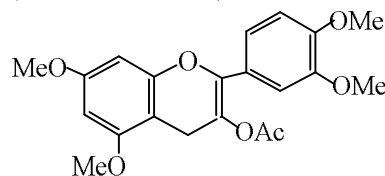
Рис. 7. а) Молекулярная структура соединения **41**,
б) кристаллическая структура соединения **41** в ячейке

2.3.5. Смешанные эфиры дигидрокверцетина

Ломас и др. [49] утверждали, что восстановительное ацетилирование 3',4',5,7-тетраметилового эфира ДКВ **7**, как и 3',4',5,7-тетраметилового эфира ДКВ [50], приводит к образованию 3-ацетокси-3',4',5,7-тетраметокси-флав-3-ена **43** и 3-ацетокси-3',4',5,7-тетраметокси-флав-2-ена **44**:

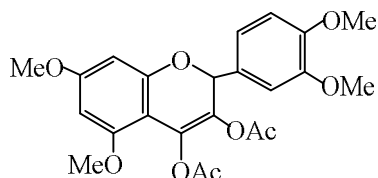


43

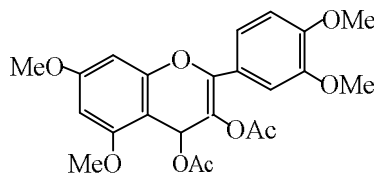


44

Кришнамурти с коллегами [51] опровергли это утверждение, предположив, что ацетилирование тетраметоксидигидрокверцетина **7**, катализируемое ацетатом натрия или пиридином приводит к образованию 2 изомеров **45** и **46** цианидин-псевдоосновного ацетата.

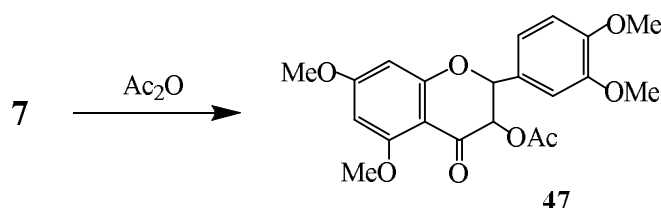


45



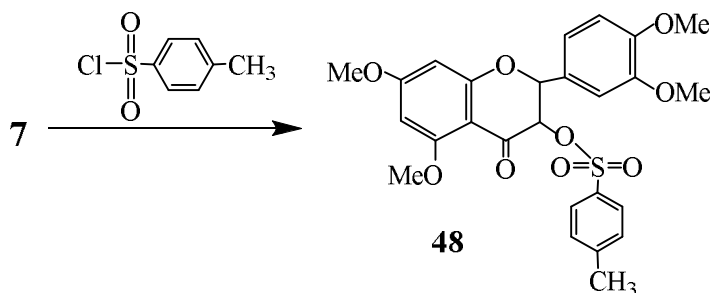
46

Дальнейшие исследования ацетилирования тетраметилового эфира с основными катализаторами, проводимые Кларк-Льюисом [52], не подтвердили образование цианидин-псевдоосновного ацетата. Они показали, что при ацилировании уксусным ангидридом с ацетатом натрия в течение часа получается 3-ацетат-тетраметилловый эфир дигидрокверцетина **47** (свыше 85%).



47

Мета и Валли проводили исследования по ацилированию метиловых эфиров дигидрокверцетина [53]. Ими был получен сложный эфир паратолуолсульфокислоты с тетра-*O*-метил-таксифолином **48** следующим образом:

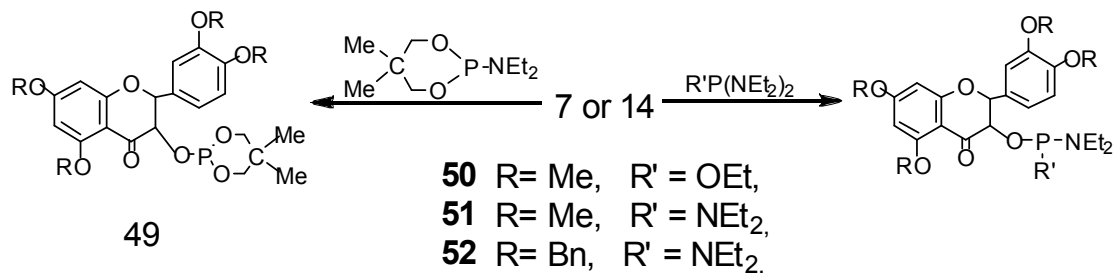


48

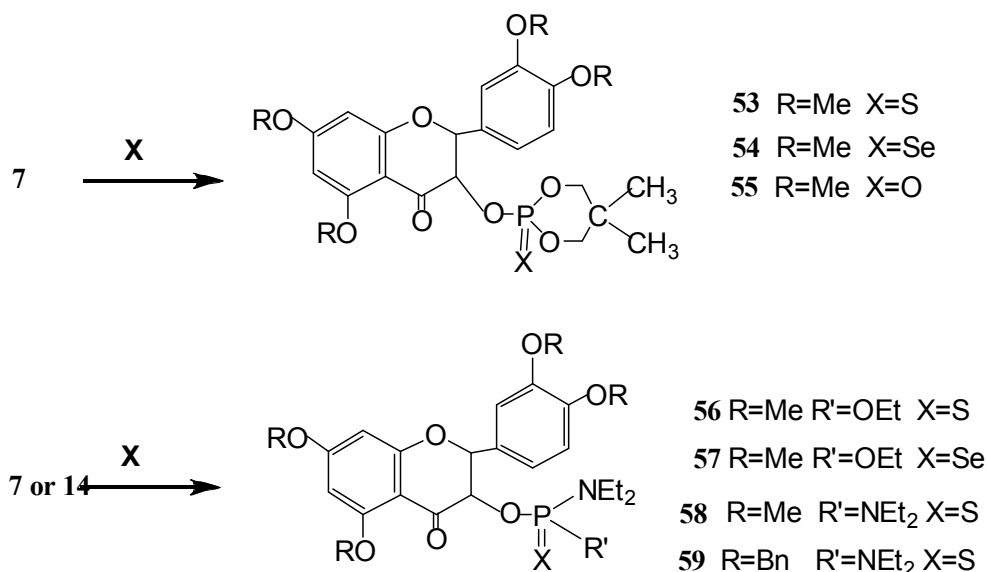
Тетра-*O*-метиловый эфир **7** перемешивали с *n*-толуолсульфохлоридом в абсолютном пиридине в течение 24 ч при комнатной температуре. *n*-Толуолсульфонат **48** был перекристаллизован из метанола и выделен в индивидуальном состоянии в виде жёлтых иголок с высоким выходом.

2.3.6. Фосфорилирование тетраалкилированных и пентаацетилированных производных дигидрокверцетина

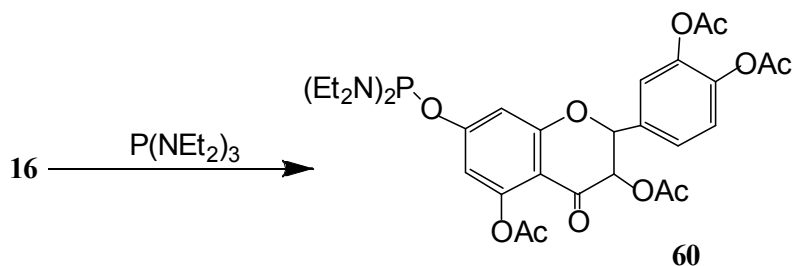
Работы по фосфорилированию частично защищенного таксифолина развивались в нескольких аспектах. Первым направлением в работе явилось изучение фосфорилирования 3',4',5,7-тетраметилдигидрокверцетина **7** амидофосфитным методом [46]. В качестве фосфорилирующих реагентов использовали 5,5-диметил-2-хлор-1,3,2-диоксифосфориан или как вариант (*N,N*-диметиламидонеопентилфосфит), а также тетраэтилдиамидоэтилфосфит и гексаэтилтриамид фосфористой кислоты:



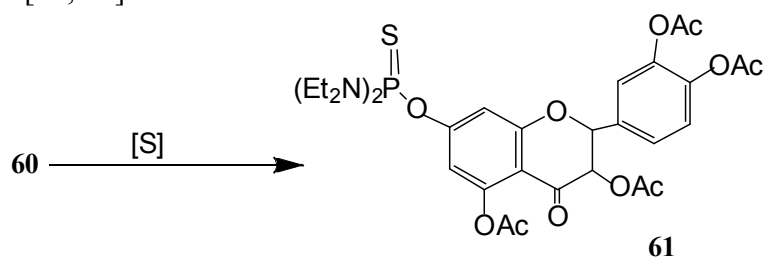
По окончании фосфорилирования, фосфиты **49-52** были переведены в соответствующие фосфаты при использовании таких окисляющих реагентов, как сера, кислород и селен и выделены с выходом 75-80%. Все фосфаты **53-59** охарактеризованы физико-химическими методами и структура полученных соединений доказана при использовании метода ЯМР на ядрах ¹H и ¹³C.



В другой работе [47] было показано, что при взаимодействии пентаацетата дигидрокверцетина **16** с гексаэтилтриамидом фосфористой кислоты через 15 минут нагревания образуется открытоцепной диамидофосфит 3,3',4',5-тетра-*O*-ацетилового эфира дигидрокверцетина **60**.



Соединение **60**, в виду его большой лабильности, без выделения из реакционной массы ввели во взаимодействие с серой. Тионфосфат **61** был выделен и охарактеризован физико-химическими методами [48, 54].

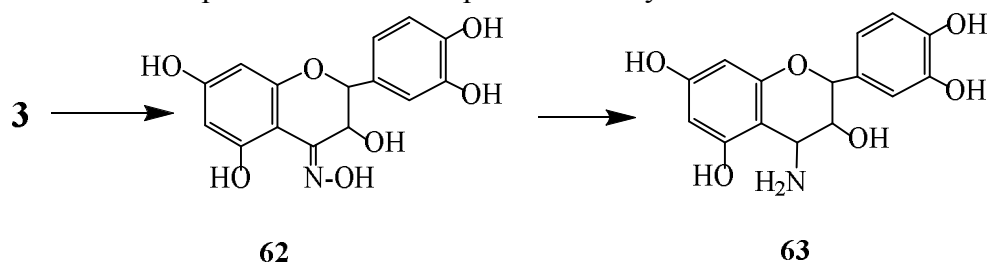


В этом случае, наблюдается фосфорилирование по 7-положению тетраацетилового эфира дигидрокверцетина **16**, которое сопровождается удалением ацетильной защитной группы.

2.4. Реакции с участием карбонильной группы

2.4.1. Оксимпроизводное дигидрокверцетина

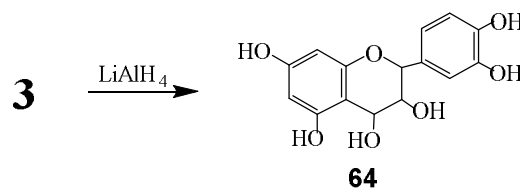
Подробно изучено оксимирование с последующим восстановлением синтезированных оксимов до соответствующих аминопроизводных для ДКВ и его модифицированных аналогов [55]. В общем виде этот процесс можно изобразить в следующем виде:



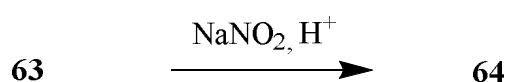
Оксим **62** получали при взаимодействии флаванона с гидрохлоридом гидроксилamina в водном растворе пиридина. Восстановление до амина **63** проводили двумя способами. В первом случае оксим восстанавливали водородом в присутствии диоксида платины в теплом растворе 80% уксусной кислоты при атмосферном давлении. Во втором случае смесь оксим-флаванона и литийалюминийгидрида в тетрагидрофуране выдерживали в течение 2 часов при комнатной температуре.

2.4.2. Реакции восстановления карбонильной группы

Бокадия с сотрудниками [56] был описан способ восстановления кетогруппы в дигидрокверцетине, приводящей к образованию в 3,4-цисдиола **64** при использовании литийалюминийгидрида.



Также для получения *цис*-3,4-флавандиола **64** с использованием оксим-амидного метода синтезированный аминогидроксифлаван **63** был обработан нитритом натрия в кислой среде:

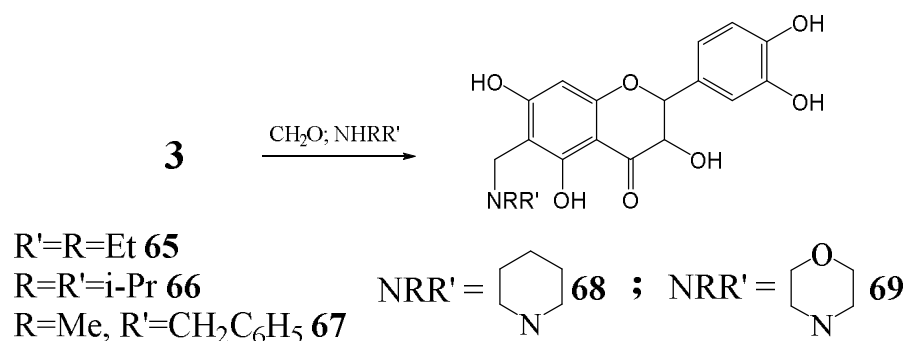


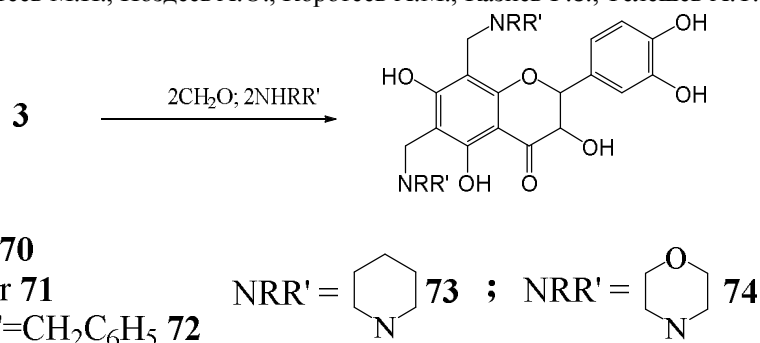
Из двух рассмотренных подходов очевидно, что второй вариант является разновидностью реакции Ван-Слайка – классический тест на первичную аминогруппу.

2.5. Реакции электрофильного замещения в ароматическом кольце

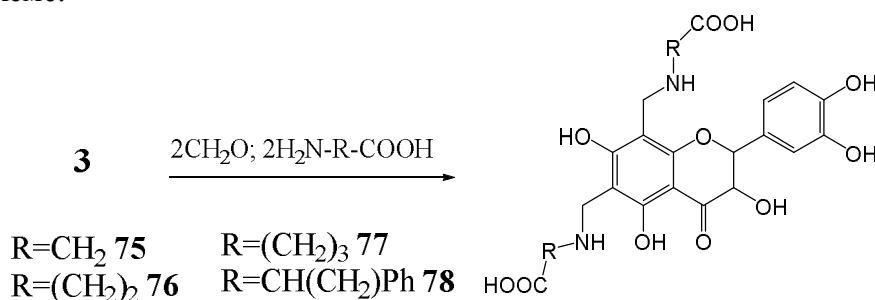
2.5.1. Синтез аминометиллированных производных дигидрокверцетина

Таксифолин хорошо вступает в реакцию Манниха с участием формальдегида и аминов различного строения. Как показали наши исследования [57, 58], продукты реакции моно-аминометиллирования **65-69** и бис-аминометиллирования ДКВ **70-74** самопроизвольно с хорошими выходами выделяются из реакционной смеси:





Продолжая работу по созданию модифицированных флавоноидов, мы осуществили селективное бисаминометиллирование ДКВ, используя в качестве аминок компонента аминокислоты различного строения: α -глицин, β -аланин, γ -аминомасляную кислоту, α -фенилаланин и др. [59], по схеме:



Аминометилирование с избыточным количеством формальдегида, аминов и аминокислот не приводит к электрофильному замещению в кольцо В дигидрокверцетина. Этот фрагмент молекулы флавоноида в данном процессе является нереакционноспособным.

3. Исследование цитотоксической и другой биологической активности производных дигидрокверцетина

Предложенное нами разделение на две группы флавоноидов подтверждается и их биологической активностью. Так при сахарном диабете, также как и при сердечно-сосудистых заболеваниях, происходит нарушение деформируемости эритроцитов, которое напрямую связывают с развитием окислительного стресса [9с]. Использование антиоксидантов при диабете оказывает выраженное протекторное действие, направленное на разные органы-мишени, вовлеченные в процесс свободнорадикального повреждения [9с,d]. Полагается, что ингибирование гликогенфосфорилазы (ГФ) может благотворно влиять на лечение диабета II типа [9d]. Авторы работы [9d] исследовали активности флавонов, флавонолов, дигидрофлавонолов на культуре гепатоцитов. Установлено, что такие флавоноиды из группы сопряженных, как кверцетин, кверцетагетин, лютеолин, 6-гидроксилуеолин, гиполаетин, изоскулареин подавляли глюкагон-зависимый гликогенолиз, инактивируя ГФ. Флавоноиды из второй группы: тасифолин или ДКВ, пиноцембрин, нарингенин, эриодиктиол имели константу ингибирования $\text{IC}_{50}(\mu\text{M}) > 200$.

Таким образом, было подтверждено, что ФЛ первой группы могут использоваться для контроля и лечения диабета II типа.

Авторы работы [9g] исследовали химический состав китайского прополиса и обнаружили в нем высокое содержание хризина (от 2.52% до 6.38%), представителя сопряженных флавоноидов. Эти же авторы провели эксперименты по подавлению активности гистондеацетилазы хризином ($\text{EC}_{50} = 40.2 \text{ mM}$) и отметили значительное подавление роста опухолевых клеток.

Кроме всего вышеперечисленного, изучалось действие ДКВ на образование и стабильность волокон коллагена. Так, в работе [72] было показано, что ДКВ ускорял образование коллагена и улучшал его структурные свойства. Увеличение концентрации ДКВ оказало прямо пропорциональную зависимость к увеличению термостабильности молекул коллагена. Электронные микрофотографии волокон коллагена, сформировавшихся при 20 °C за 24 часа с

ХИМИЧЕСКАЯ МОДИФИКАЦИЯ ДИГИДРОКВЕРЦЕТИНА (ТАКСИФОЛИНА) И БИОЛОГИЧЕСКАЯ... 94-120
содержанием ДКВ 0.00001%, 0.0001%, 0.001, 0.01%, 0.1% показали, что только при концентрациях выше 0.01% проявляется действие дигидрокверцетина, что подтверждает сделанные нами выводы о том, что в растворах без мер предосторожности относительно кислорода присутствует комплекс последнего с ДКВ.

3.1. Биологическая активность сложноэфирных производных таксифолина

На кафедре молекулярной биологии и радиобиологии медико-биологического факультета Российского государственного медицинского университета (г. Москва) исследовали фармакологическую активность некоторых перацильных производных ДКВ [60].

Так, изучали влияние тетраацетата **15**, пентаацетата **16**, пентабензоата **17**, пентаацетилсалицилата **18** и пентаникотината **19**, пента-*n*-нитробензоата **20** на жизнедеятельность нормальных и опухолевых клеток на культуре фибропластов кожи новорожденных крысят и культуре клеток MCF-7 (рак молочной железы человека). Действие препаратов на клеточный рост определяли микроколориметрическим методом при помощи МТТ-теста [61], который основан на способности дегидрогеназ живых клеток восстанавливать бесцветную форму соли тетразолия (3-[4,5-диметилтиазол-2-ил]-2,5-дифенилтетразолия бромид, МТТ-реагент) с образованием голубых кристаллов формазана, растворимого в диметилсульфоксиде. Оптическое поглощение растворимого в диметилсульфоксиде формазана пропорционально количеству живых клеток в пробе. Ингибирование роста клеток в пробе определяли по формуле:

$$\text{ИК\%} = (1 - N/N_0) \cdot 100.$$

Соединения считали активными, если концентрация 100 мкМ вызывала ингибирование роста клеток >50%.

Исследование показало наличие зависимости цитотоксического эффекта от концентрации исследуемого соединения и его химического строения. Наибольшей активностью обладали сложные эфиры ДКВ **18-20** (см. табл. 2 и 3).

Наиболее выраженное цитотоксическое действие в концентрации 1 мг/мл проявил пентаникотинат ДКВ **19**.

Для изучения антиоксидантной активности производных использовали метод хемилюминисценции на модели гомогената мозга крысы [62, 63]. Для индукции перекисного соединения липидов (ПОЛ) в систему добавляли ионы двухвалентного железа, что инициировало процесс ПОЛ, сопровождаемый хемилюминисценцией.

Табл. 2. Влияние производных ДКВ на жизнеспособность клеток MCF-7

Исследуемые соединения	С, мг/мл		
	1.0	0.1	0.001
пента- <i>n</i> -нитробензоат ДКВ (20)	40%	91%	96%
пентаацетилсалицилат ДКВ (18)	65%	90%	105%
пентаникотинат ДКВ (19)	14%	98%	97%

Примечание: С – концентрация, % – процент жизнеспособных клеток.

Табл. 3. Влияние производных ДКВ на жизнеспособность фибропластов крыс

Исследуемые соединения	С, мг/мл		
	1.0	0.1	0.001
20	26%	85%	110%
18	70%	98%	102%
19	22%	88%	104%

Примечание: С – концентрация, % – процент жизнеспособных клеток

Исследование показало, что изученные соединения неоднозначно влияют на процессы ПОЛ в гомогенате мозга крыс. Наибольшей ингибирующей активностью обладали дигидрокверцетин **3** и пентаникотинат дигидрокверцетина **19**, которые уменьшали амплитуду медленной вспышки на 60% (см. табл. 4).

Кроме того, впервые синтезированные соединения **18-20** были испытаны на противовоспалительную активность.

В качестве модели для исследования противовоспалительных свойств этих соединений применялась модель ожогового поражения, так как обладает наибольшей выраженностью окислительного стресса и воспалительной реакции у животных.

Табл. 4. Влияние производных ДКВ на амплитуду медленной вспышки кривой Fe^{2+} -индуцированной хемилюминисценции гомогената мозга крыс (% по отношению к контролю); растворитель-ДМСО

Группа	Н
Дигидрохверцетин 3	100
Пентабензоат ДКВ 17	13±8
Пента- <i>n</i> -нитробензоат ДКВ 20	20±9
Пентаацетилсалицилат ДКВ 18	9±5
Пентаникотинат (ДКВ) 19	60±5

Примечание: Н – амплитуда медленной вспышки хемилюминисценции;
концентрация производных ДКВ 10^{-4} М

Исследуемые препараты вводили в виде аппликаций на ожоговую поверхность кожи лабораторных мышей определенной концентрации. После проведения лечения у животных определялись показатели интенсивности процессов ПОЛ и исследовались концентрации третичных и первичных продуктов ПОЛ – диеновых конъюгатов (ДК) и малонового диальдегида (МДА) в исследуемых тканях (печень и почки) по сравнению с контролем.

Определение концентрации малонового диальдегида МДА проводили по методу, описанному в работе [64]. Концентрацию ТБК-продуктов рассчитывали согласно методике, описанной в статье [65]. Определение концентрации диеновых конъюгатов (ДК) в гомогенатах тканей и гемолизате эритроцитов осуществляли по методике, описанной в работе [66].

Показано, что применение данных препаратов достоверно снижает проявления окислительного стресса, процессы ПОЛ и, следовательно, подтверждает их противовоспалительное действие.

Наряду с этим была проведена оценка взаимосвязи между антиоксидантной активностью изученных соединений и их химической структурой. Производные по структуре представляют собой систему фенольных остатков, связанных различными заместителями. Фенольное кольцо, благодаря системе сопряженных двойных связей, легко передает электронным свободным радикалам, превращаясь при этом в феноксирадикал, который является достаточно стабильным и в дальнейшем продолжении цепи не участвует. Известно, что значительной антиоксидантной активностью обладают пространственно-затрудненные фенолы, реагирующие в основном с радикалами $\text{ROO}^\cdot$ и прерывающие цепь окисления.

Определяющим для антиоксидантной активности фактором в структуре фенолов является строение *O*-ацильных, а также характер пара-заместителя. Введение в *пара*-положение пространственно затрудненных фенолов электронодонорных заместителей увеличивает их антиоксидантную активность, в то время как введение электроноакцепторных – уменьшает.

Так, в случае с пентаникотинатом дигидрохверцетина **19** можно предположить, что его высокая антиоксидантная активность связана со смещением электронной плотности от центральных колец в сторону периферических благодаря наличию у них связи с азотом.

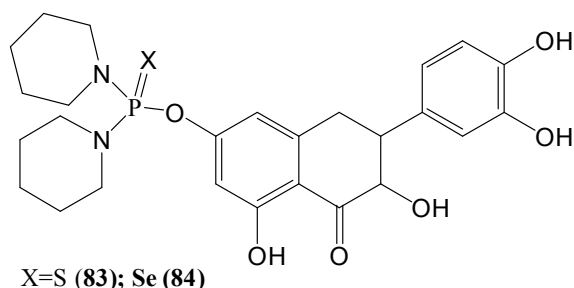
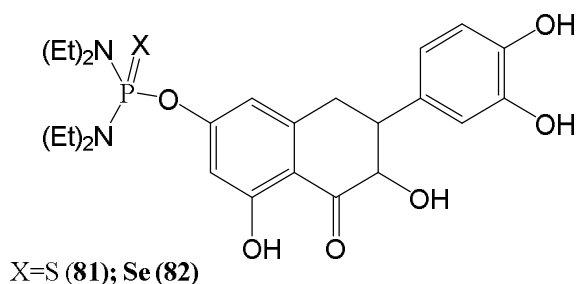
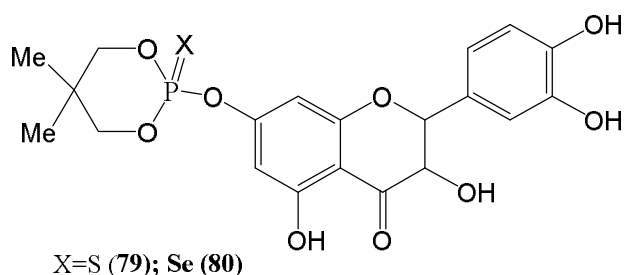
Таким образом, применение в качестве ацилирующих реагентов хлорангидридов ароматических карбоновых кислот, содержащих в своем составе электроноакцепторные заместители, позволяет получить сложные эфиры ДКВ и существенно улучшить их фармакодинамику при биологических испытаниях.

3.2. Биологическая активность фосфорилированных производных ДКВ

Известно, что фосфорилирование природных соединений, таких как углеводы, липиды, нуклеозиды, приводит к усилению и расширению спектра биологического действия, в том числе появлению антипролиферативных свойств [67]. Именно поэтому использовали фосфорилирование ДКВ для получения соединений с цитотоксической и противоопухолевой активностью.

К сожалению, в научной работе не представлены достоверные данные о способности немодифицированного ДКВ влиять на рост опухолевых клеток. Поэтому мы синтезировали соединения, в которых молекула нативного ДКВ использовалась в качестве носителя активных цитотоксических фосфорсодержащих фармакофорных групп.

В РОНЦ им. Н.Н. Блохина РАМН (г. Москва) проведен анализ цитотоксического эффекта ряда фосфорсодержащих производных ДКВ [68]: 7-неопентилтионфосфата **79**, 7-неопентилсенонфосфата **80**, 7-диэтиламидоэтилтионфосфат **35**, 7-диэтиламидоэтилселенонфосфата **36**, 7-тетраэтилдиамидоэтилтионфосфата **81**, 7-тетраэтилдиамидоэтилселенонфосфата **82**, 7-дипиперидилтионфосфата **83**, 7-дипиперидилселенонфосфата **84**.



В опытах в качестве объектов исследования использовали линии опухолевых клеток человека – карциному яичника CaOV и Т-лимфому jurkat. Клеточные культуры выращивали в среде RPMI 1640, содержащей 10% эмбриональной сыворотки человека.

Цитотоксическую активность препаратов оценивали по способности соединений подавлять рост опухолевых клеток. Влияние на рост опухолевых клеток оценивали с помощью стандартного МТТ – теста с использованием МТТ – реагента (3,4,5-диметилтиазол-2-ил-2,5-дифенилтетразолиум бромид). Соединение считали активным, если концентрация 100 мкМ вызывало подавление роста клеток не менее 50%. Ошибка измерений не превышала 5%-ю. Активные соединения исследовали на экспериментальных опухолевых мышей *in vivo*.

Противоопухолевую активность оценивали *in vivo* на перевиваемых опухолях мышей-гибридов первого поколения BDF, массой 18-25 г. Перевиваемые опухоли входят в число обязательных моделей опухолевых животных, которые используются при отборе новых противоопухолевых веществ – лимфоцитарной лейкемии Р-388, аденокарциноме Са-755 и эпидермоидной карциноме легкого Льюис (LCC).

Противоопухолевый эффект оценивали по торможению роста опухоли (ТРО) и по увеличению продолжительности жизни леченых животных (УПЖ). Минимальные критерии активности ТРО $\geq 50\%$, УПЖ $\geq 25\%$.

Токсичность препаратов оценивали по ранней гибели мышей по сравнению с гибелью контрольных животных и состоянию внутренних органов животных (селезенка, легкие, наличие метастаз в легких), изменению массы тела по отношению к исходной массе. 7-диэтиламидоэтилтионфосфат **35** растворяли в ДМСО и разводили физиологическим раствором, чтобы концентрация ДМСО составляла не более 10%. Соединение вводили ежедневно внутрибрюшинно в течение 5 дней в дозах 10 мг/кг, 25 мг/кг, 50 мг/кг, 75 мг/кг, 100 мг/кг, 125 мг/кг. Лечение начинали через 48 часов после перевивки солидных опухолей (Са-755 и LCC) и через 24 ч после перевивки Р-388.

Из результатов, представленных в табл. 5 и 6, следует, что 7-диэтиламидо-этилтионфосфат **35** дигидрокверцетина в концентрации 100 мкМ ингибировал рост клеток линий СаОv и Jurkat на 83.9 и 84.8%, соответственно. ИК₅₀ в обоих случаях составила 50 мкМ.

Данное соединение было рекомендовано для изучения противоопухолевой активности *in vivo*. При изучении противоопухолевой активности соединения Р-388 было показано, что препарат при введении в дозах от 10 100 мг/кг не оказывает противоопухолевого действия, то есть не вызвал УПЖ.

Противоопухолевая активность соединения также изучена на Са-755 в широком диапазоне доз от 25 мг/кг до 125 мг/кг. 7-Диэтиламидоэтилтионфосфат дигидрокверцетин был неэффективен в дозах 25, 50 и 75 мг/кг. В тоже время соединение в дозах 100 и 125 мг/кг

Обзор _____ Коротеев М.П., Поздеев А.О., Коротеев А.М., Казиев Г.З., Телешев А.Т. и Офицеров Е.Н. проявило умеренный противоопухолевый эффект непосредственно после окончания ежедневного внутрибрюшинного введения в течение 5 дней: ТРО = 51% и ТРО = 57% соответственно.

На LCC выявлен высокий терапевтический эффект изучаемого вещества, который зависел отведенной дозы соединения. Максимальное торможение роста LCC соединение проявило в дозах 75 и 100 мг/кг: ТРО = 89 и 88% соответственно, после окончания введения.

Табл. 5. Цитотоксический эффект производных ДКВ в концентрации 100 мкМ на клетках линии CaOv *in vitro*

Соединение	Ингибирование пролиферации клеток	ИК ₅₀ , мкМ
ДКВ (3)	0	
7-диэтиламидоэтилтионфосфат ДКВ 35	83.9	50
7-тетраэтилдиамиодотионофосфат ДКВ 81	85.3	50
7-тетраэтилдиамиодоселенофосфат ДКВ 82	79.2	60
7-диперидилтионфосфат ДКВ 83	76.3	65
7-диперидилселенофосфат ДКВ 84	77.0	70

Табл. 6. Цитотоксический эффект производных ДКВ в концентрации 100 мкМ на клетках Т-лимфомы линии Jurkat *in vitro*

Соединение	Ингибирование пролиферации клеток	ИК ₅₀ , мкМ
ДКВ (3)	0	50
7-неопентилтионфосфат ДКВ 79	16.3	50
7-неопентилселенофосфат ДКВ 80	16.3	60
7-диэтиламидоэтилтионфосфат ДКВ 35	84.8	65
7-диэтиламидоэтилселенофосфат ДКВ 36	66.9	70

Высокий терапевтический эффект сохранялся еще в течение 10 дней: 74 и 68% соответственно.

Кроме того, соединение проявило антиметастатическое действие. Однако статистически значимый антиметастатический эффект соединение проявило только в дозе 25 мг/кг и торможение роста метастаз составило 37%.

Также установлено, что 7-диэтиламидоэтилтионфосфат дигидрокверцетина 35 обладает низкой токсичностью при терапевтической дозе 75-100 мг/кг. Из приведенных выше результатов исследований следует, что активность по отношению к клеткам рака яичников человека CaOv проявили тионфосфаты, содержащие в своем составе связь Р-N; цитотоксическое действие селенофосфатов аналогичного строения немного меньше (при этом их ИК₅₀ гораздо выше) либо вообще отсутствовало. При замене атома азота, серы (селена) на атом кислорода, а также атомов азота на атомы углерода, цитотоксическая активность соединений не проявлялась.

Таким образом, установлено, что 7-диэтиламидоэтилтионфосфат дигидрокверцетина 35 является новым оригинальным соединением с противоопухолевым эффектом на некоторых перевиваемых солидных опухолях мышей при низкой токсичности, а также обладает антиметастатическим действием.

3.3. Биологическая активность аминотиллированных производных дигидрокверцетина

Показано, что 6-диизопропиламинотилдигидрокверцетин 66 обладает актопротекторным действием, кроме того, было выявлено, что полученные производные существенно усиливают антиоксидантные свойства ДКВ [69, 70].

Многие выделенные аминотиллированные производные ДКВ обладают высокой антиоксидантной, нейротропной [70] активностью, а так же антипролиферативным [60] действием.

Выводы

В результате химической модификации дигидрокверцетина (ДКВ) существенно расширяется спектр биологического действия этого уникального флавоноида. С другой стороны, установленная зависимость взаимодействия растворенного кислорода с дигидрокверцетином, как представителем несопряженных флавоноидов, детерминирует получение артефактов в тех случаях, когда концентрация ДКВ в растворе меньше 10⁻³ моль/л или меньше 0.05%, что необходимо учитывать при анализе растительного сырья на содержание флавоноидов.

Авторы выражают глубокую признательность Генеральному директору ОАО «ДИОД» Тихонову В.П. за глубокий интерес и поддержку при выполнении данной работы.

Литература

- [1] Запрометов М.Н. Фенольные соединения и их роль в жизни растения: 56-е Тимирязевское чтение. М.: Наука. **1996**. С.45.
- [2] Запрометов М.Н. Фенольные соединения: распространение метаболизм и функции в растениях. М.: Наука. **1993**. С.272.
- [3] Овчинников Ю.А. Биоорганическая химия. М.: Просвещение. **1987**. С.691.
- [4] J.C. Rew. A flavonone from Douglas-Fir heartwood. *J. Am. Chem.Soc.* **1948**. Vol.70. No.9. P.3031-3034.
- [5] E.F. Kurth, F.L. Chan. Extraction of tannin and dihydroquercetin from Douglas-fir bark. *J. Amer. Leather Chem. Assoc.* **1953**. Vol.48. No.1. P. 20-32.
- [6] Тюкавкина Н.А., Лаптева К.И., Модонова Л.Д. Исследование экстрактивных веществ древесины даурской лиственницы. Сб. «Фенольные соединения и их биологические функции». М.: Наука. **1968**. С.72-78.
- [7] Захарова Н.А., Богданов Г.Н., Запрометов М.Н., Тюкавкина Н.А., Круглякова К.Е., Эммануэль Н.М. Антирадикальная эффективность некоторых природных фенольных соединений. *Журн. орган. химии*. **1972**. Т.42. №6. С.1414-1420.
- [8] Тюкавкина Н.А., Хуторянский В.А., Сабойталов М.Ю., Баженов Б.Н. Способ выделения дигидрокверцетина. *Патент RU № 208825*. **22.07.1997**. Шачнев Ю.Д., Шпилюк А.Д. Биологически активная добавка «Биоскан-С» и способ ее получения. *Патент RU № 2154967*. **27.01.1999**; Нифантьев Э.Е., Коротеев М.П., Казиев Г.З., Уминский А.А. Способ выделения дигидрокверцетина. *Патент RU № 2180566*. **20.03 2002**.
- [9] а) Барабой В.А. Растительные фенолы и здоровье человека. М.: Наука. 1984. С.160; б)Кретович В.Л. Биохимия растений. М.: Высшая школа. **1980**. С. 445; в) Плотников, М.Б. Н.А.Тюкавкина., Т.М.Плотникова. Лекарственные препараты на основе диквертина. *Томск: Изд-во Том. ун-та*, **2005**. С 228.; д) A.Kato, N.Nasu, K.Takebayashi, I.Adachi, Y.Minami, F.Sanae, N.Asano, A.A. Watson, and R. J. Nash. Structure-Activity Relationships of Flavonoids as Potential Inhibitors of Glycogen Phosphorylase. *J. Agric. Food Chem.* **2008**.Vol. 56. P.4469–4473.; е) A.I. Khlebnikov, I.A. Schepetkin, N.G. Domina, L.N. Kirpotina and M.T. Quinn. Improved quantitative structure-activity relationship models to predict antioxidant activity of flavonoids in chemical, enzymatic, and cellular systems. *Bioorganic and Medical Chemistry*. **2007**. Vol.15. P.1749-1770.; ф) , S.Fiorucci, J.Golebiowski, D.Cabrol-Bass, and S.Antonczak. DFT Study of Quercetin Activated Forms Involved in Antiradical, Antioxidant, and Prooxidant Biological Processes. *J. Agric. Food Chem.* **-2007**.Vol.55.P.903–911.; г) L.Sun, A.Chen, H.Hung, Y.Chien, J.Huang, C.Huang, Y.Chen, and C.Chen. A histone deacetylase 8 inhibitor with anticancer activity and a suitable candidate for standardization of Chinese propolis. *J. Agric. Food Chem.* **2012**; h) J.E. Brown, H.Khodr, R.C. Hider and C.A. Rice-Evans. Structural dependence of flavonoid interactions with Cu²⁺ ions: implications for their antioxidant properties. *Biochem. J.* **1998**.Vol.330.P.1173-1178.; i) .Gabrielska, M.Soczynska-Kordala, J. Hladyszowski, R.Zylka, J.Miskiewicz, and S.Przestalski. Antioxidative Effect of Quercetin and Its Equimolar Mixtures with Phenyltin Compounds on Liposome Membranes. *J. Agric. Food Chem.* **2006**.Vol. 54. P.7735-7746.; j) J.Ren, Sh.Meng, Ch. E. Lekka, and E.Kaxiras. Complexation of Flavonoids with Iron: Structure and Optical Signatures. *J. Phys. Chem.* **2008**. Vol.112. P.1845-1850.
- [10] Офицеров Е.Н., Каратаева А.В., Соловьева И.Н., Сергеева С.Н. Растительные флавоноиды. К связи строения и свойств на примере кверцетина и дигидрокверцетина. *Материалы Межд. научно-практ. конф. «Микроэлементы и регуляторы роста в питании растений: теоретические и практические аспекты»*. Ульяновск. 2014. Стр. 85-92.
- [11] Бродский А.В., Дорожко А.И., Афанасьев И.Б. Изучение механизма антиоксидантного действия рутина. *Кислородные радикалы в химии, биологии и медицине. Сб. науч. статей. Рига*. **1998**. С.25-28.
- [12] Афанасьев И.Б. Свободно-радикальные ингибиторы и промоторы в биологических процессах. *Кислородные радикалы в химии, биологии и медицине :Сб. науч. статей. Рига*. **1998**. С.9-25.
- [13] G.Sichel, C.Corsaro, M.Scalia, A.J. Di Billo, R.P. Bonomo. In vitro scavenger activity of some flavonoids and melanins against O₂⁻. *Free Radic. Biol. Med.* **1991**. Vol.11. P.1-8.
- [14] Ильющенок Т.Ю., Хомченко А.И., Фригидова Л.М. Фармакологические и радиозащитные свойства некоторых производных гамма-пирона (флаваноны и флаванолы). *Фармакология и токсикология*. **1975**. Т.38. №5. С.607-611.

- [15] Тюкавкина Н.А., Руленко И.А., Колесник Ю.А. Природные флаваноиды как пищевые антиоксиданты и биологически активные добавки. *Вопр. Питания*. **1996**. №2. С.33-38.
- [16] Ильяченко Т.Ю., Хомченко А.И., Фригидова Л.М. Фармакологические и радиозащитные свойства некоторых производных гамма-пирона (флаваноны и флаванолы). *Фармакология и токсикология*. **1975**. Т.38. №5. С.607-611.
- [17] J. Jurado, E. Alexandre-Duran, A. Alonso-Moraga, C. Pueyo. Study on the mutagenic activity of 13 bioflavonoids with the Salmonella Ara test. *Mutagenesis*. **1991**. Vol.6. №4. P.289-295.
- [18] M. Nagao, N. Morita, T. Yahagi, M. Shimizu, M. Kuroyanagi, K. Yoshihira, S. Natori, T. Fujino, T. Sugimura. Mutagenicities of 61 flavonoids and 11 related compounds. *Environ Mutagen*. **1981**. Vol.3. №4. P.401-419.
- [19] R. Solimani. Quercetin and DNA in solution: analysis of the dynamics of their interaction with a linear dichroism study. *Int. J. Biol. Macromol*. **1996**. Vol.18. №4. P.287-295.
- [20] L.F. Bjeldanes, G.W. Chang. Mutagenic activity of quercetin and related compounds. *Science*. **1977**. №5. P.577-579.
- [21] H. Chimi, J. Cillard, P. Cillard. Peroxyl and Hydroxyl radical scavenging activity of some natural phenolic antioxidants. From natural to synthetic flavones-Cu^{II}-substituted flavones as potent inhibitors of xantine oxidase. *18th International Conference on Polyphenols, Bordeaux (France), July, 15-18*. **1996**. Vol.2. P.515-516.
- [22] J.P. Hu, M. Calomme, A. Lasure, T. De Bruyne, L. Pieters, A. Vlitinck, D.A. Vanden-Berghe. Structure-activity relationship of flavonoids with superoxide scavenging activity. *Biol. Trans. Elem. Res*. **1995**. Vol.47. P.327-331.
- [23] St. V. Kostanecki. Über das Chrysin. *Ber*. **1893**. Vol.26. №3. P.2901-2905.
- [24] A.C. Waiss Jr., R.E. Lundin, D.J. Stern. NMR study of trimethylsilyl ethers of flavonoid compounds. *Tetrahedron Lett*. **1964**. P.513-518.
- [25] C.A. Kingsbury, J.H. Looker. Carbon-13 spectra of methoxyflavones. *J. Org. Chem*. **1975**. Vol.40. No.8. P.1120-1124.
- [26] E. Breitmaier, W. Voelter. Carbon-13 NMR Spectroscopy. *Weinheim; New York*. **1987**. P.454-454.
- [27] K.R. Markham, B. Ternai. Carbon-13 NMR of flavonoids. II. Flavonoids other than flavone and flavonol aglycons. *Tetrahedron*. **1976**. Vol.2. No.21. P.2607-2619.
- [28] Селиванова И.А., Тюкавкина Н.А., Колесник Ю.А., Нестерова В.Н., Кулешова Л.Н., В.А. Хуторянский, Б.Н. Баженов, М.Ю. Саботайлов. Исследование кристаллической структуры дигидрокверцетина. *Хим. фарм. журнал*. **2001**. Т.33. №4. С.51-53.
- [29] Коротеев А.М., Казиев Г.З., Коротеев М.П., Нифантьев Э.Е., Шутов В.М. Водорастворимое комплексное соединение включения дигидрокверцетино-β-циклодекстрина и способ его получения. *Патент РФ на изобретение № 2396077*. **2010**.
- [30] H.L. Hergert, P. Coad, A.V. Logan. The methylation of Dihydroquercetin. *J. Org. Chem*. **1956**. Vol.21. P.304-310.
- [31] J.W. Clark-Lewis, L.M. Jackman, T.M. Spotswood. Nuclear magnetic resonance spectra, stereochemistry, and conformation of flavan derivatives. *Aust. J. Chem*. **1964**. Vol.17. No.5-6. P.632-648.
- [32] H.L. Hergert, I.F. Kurth. The isolation and properties of catechol from white fir bark. *J. Org. Chem*. **1953**. Vol.18. No.5-8. P.521-529.
- [33] J.W. Clark-Lewis, R.W. Jemison, V. Nair. Flavan Derivatives XXIV. Cis- and trans-3-methoxyflavanones. *Aust. J. Chem*. **1968**. Vol.21. P.3015-3024.
- [34] T.R. Seshadri. Recent Developments in the chemistry of flavanoids. *Tetrahedron*. **1959**. Vol.6. P.169-200.
- [35] T.H. Simpson, T.R. Beton. Antoxanthins. Part I. Selective Methylation. *Chem. Soc*. **1954**. P.4065-4069.
- [36] T.H. Simpson, T.R. Beton. Antoxanthins. Part II. Selective Demethylation. *Chem. Soc*. **1954**. P.4069-4072.
- [37] K. Freudenberg, Weinges K. Leuco and pseudo compounds of the anthocyanidins. *Ann*. **1958**. No.613. P.61-75.
- [38] H. Aft / Chemistry of dihydroquercetin. I. Acetate derivatives. *J. Org. Chem*. **1961**. Vol.26. P.1958-1963.
- [39] T. Weinges. Carbon-13 NMR of flavonoids. *Phytochemistry*. **1971**. No.10. P.829-832.
- [40] E. Kiehlmann, K. Biradha, K. V. Domasevitch, M. J. Zawortko. Crystal structures of dihydroquercetin-3-acetate and dihydroquercetin-3,3',4',7-tetraacetate: hydrogen bonding in 5-hydroxyflavanones. *Can. J. Chem*. **1999**. Vol.77. No.8. P.1436-1443.
- [41] Нифантьев Э.Е., Крымчак М.С., Коротеев М.П., Коротеев А.М., Кухарева Т.С. Полное ацилирование дигидрокверцетина. *Журн. общ. хим*. **2011**. Т.81. №1. С.106-109.
- [42] Коротеев А.М., Поздеев А.О., Коротеев М.П., Левина И.И., Васянина Л.К., Казиев Г.З., Нифантьев Э.Е. Тотальное ацилирование дигидрокверцетина хлорангидридами гетероциклических карбоновых кислот. *Наука и школа*. **2013**. №3. С.181-184.

- [43] Нифантьев Э.Е., Коротеев А.М., Поздеев А.О., Коротеев М.П., Рассадкина Е.Н. Ацилирование 5,7,3',4'-тетрабензилдигидрокверцетина хлорангидридами гетероциклических карбоновых кислот. *Докл. АН.* **2014.** Т.49. №5. С.567-569.
- [44] Нифантьев Э.Е., Кухарева Т.С., Коротеев М.П., Дзгоева З.М., Казиев Г.З., Васянина Л.К. Первые представители фосфорилированных флаванонов. *Биоорг. Химия.* **2001.** №27. Р.319-321.
- [45] E.E. Nifant'ev, T.S. Kukhareva, Z.M. Dzgoeva, L.K. Vasyanina, M.P. Koroteev, G.Z. Kaziev. Selective phosphorylation of dihydroquercetin with trivalent phosphorus reagents. *Heteroatom chemistry.* **2003.** Vol.4. P.399-403.
- [46] Нифантьев Э.Е., Коротеев М.П., Казиев Г.З., Коротеев А.М., Васянина Л.К., Захарова И.С. Фосфорилирование 3,4,5',7'-тетраметилдигидрокверцетина. *Ж. общ. хим.* **2003.** Т.73. № 11. С.1782-1786.
- [47] E.E. Nifant'ev, M.P. Koroteev, G.Z. Kaziev, I.S. Zakharova, K.A. Lyssenko, L.N. Kuleshova, M. Yu. Antipin. Sterically controlled cyclization 3,4,5',7'-tetramethyldihydroquercetin amidophosphites. New Synthesis of phostones. *Tetrahedron Letters.* **2003.** Vol.44. P.6327-6329.
- [48] Захарова И.С., Коротеев М.П., Казиев Г.З., Коротеев А.М., Нифантьев Э.Е., Антипин М.Ю., Кулешова Л.Н., Лысенко К.А. Синтез и рентгеноструктурное исследование нового типа фостонов с четырехкоординированным атомом фосфора. *III-я Национальная кристаллохимическая конференция. Черноголовка.* **2003.** С.84.
- [49] K.R. Laumas, T.R. Seshadri. Leucoanthocyanidin(flav-3-en-3-ol)acetates. *Proc. Indian. Acad. Sci.* **1959.** Vol.49A. P.47-53.
- [50] B.J. Bergot, L. Jurd. Anthocyanins and related compounds-V. Formation of bisflavenylidenes from flavones by reductive dimerization. *Tetrahedron.* **1965.** Vol.21. P.657- 661.
- [51] H.G. Krishnamurty, V. Krishnamoorthy, T.R. Seshardi. Preparation of anthocyanidins and their glycosides from related flavonoids. *Phytochemistry.* **1963.** №2. P.47-60.
- [52] J.W. Clark-lewis, R.W. Jemison. Reinvestigation of the supposed enediol diacetate derived from dihydroquercetin 5,7,3',4'-tetramethyl ether: novel ring-fission of dihydroquercetin 5,7,3',4'-tetramethyl ether to $\alpha,2'$ -diacetoxy-3,4,4',6'-tetramethoxychalcone. *Tetr. Lett.* **1966.** Vol.35. P.4179-4182.
- [53] P.P.Mehta, W.B. Whalley. The stereochemistry of some catechin derivatives. *J. Chem. Soc.* **1963.** №11 (241). P.5327-5332.
- [54] Нифантьев Э.Е., Коротеев М.П., Кухарева Т.С., Казиев Г.З., Дзгоева З.М., Захарова И.С./ Исследование фосфорилирования кверцетина и дигидрокверцетина. *4-й Международный симпозиум по химии и применению фосфор-, серо- и кремнийорганических соединений «Петербургские встречи» (ISMP-IV); 13-я Международная конференция по химии соединений фосфора (ICCP-XIII). Санкт-Петербург,* **2002.** С.62.
- [55] R. Bognar, M. Rakosi. Stereochemistry of flavan-3,4-diols. *Tetrahedron.* **1963.** Vol.19. P.391-394.
- [56] M.M. Bokadia, B.R. Brown, P.L. Kolker, C.W. Love, J. Newbould, G.A. Somerfield, P.M. Wood / Polymerisation of flavans. Part V. The stereochemistry of 2,3-trans-flavan-3,4-diols. *J. Chem. Soc.* **1961.** №10. P.4663-4669.
- [57] Нифантьев Э.Е., Мосюров С.Е., Кухарева Т.С., Васянина Л.К./Аминометилирование дигидрокверцетина. *Докл. АН.* **2013.** Т.448. №1. С.51-55.
- [58] Нифантьев Э.Е., Коротеев М.П., Кухарева Т.С., Коротеев А.М., Пугашова Н.М., Мосюров С.Е., Кутузова Н.М., Казиев Г.З. Химическая модификация и биологическая активность флавоноида дигидрокверцетина. *Наука и школа.* **2012.** №6. С.179-188.
- [59] Мосюров С.Е., Кухарева Т.С., Нифантьев Э.Е. Особенности аминометилирования дигидрокверцетина. *Наука и школа,* **2013.** №3. С.187-190.
- [60] Роговский В.С., Матюшин А.И., Шимановский Н.Л., Семейкин А.В., Кухарева Т.С., Коротеев А.М., Коротеев М.П., Нифантьев Э.Е. Антипролиферативная и антиоксидантная активность новых производных дигидрокверцетина. *Эксперим. и клин. фармакология.* **2010.** №9. С.39-42.
- [61] Хабриев Р.У. Руководство по экспериментальному (доклиническому) изучению новых фармакологических веществ. *М.: Медицина.* **2005.** С.832.
- [62] Калхир В.К., Тюкавкина Н.А., Быков В.А. [и др.]. Диквертин – новое антиоксидантное и капилляропротективное средство. *Хим.-фарм журн.* **1995.** №9. С.775-778
- [63] Казаков В.П. Хемилюминисценция уранила, лантаноидов и других элементов. *М.: Наука.* **1980.** С.176.
- [64] M. Uchiyana, M. Mihara. Determination of malon-aldehyde precursor in tissues by thiobarbituric acid test. *Anal.Biochem.* **1978.** Vol.86. P.271.

- [65] Гаврилов В.Б., Гаврилова А.Р., Мажуль Л.М. Анализ методов определения продуктов перекисного окисления липидов в сыворотке клеток по тесту с тиобарбитуровой кислотой. *Вопр. мед. химии*. **1987**. Т.33. №1. С.116-122.
- [66] Стальная Е.А. Метод определения диеновой конъюгации ненасыщенных высших жирных кислот. *Совр. Методы в биохимии. М.: Медицина*. **1977**. С.63-64.
- [67] Зинченко В.П., Коротеев М.П., Нифантьев Э.Е., Кочетков Н.К. Эффект понижения ионов кальция Рн-стимулированных митогенами тимокитов при действии амидофосфатов углеводов. *Докл. А.Н. СССР*. **1987**. Т.297. №7. С.1482-1490.
- [68] Нифантьев Э.Е., Коротеев М.П., Казиев Г.З., Кухарева Т.С., Жукова О.С., Смирнова З.С. Средство, обладающее противоопухолевым действием и способ его получения. *ПАТЕНТ РФ на изобретение №2349317*. **2009**.
- [69] Сергеевич А.А., Баталова Т.А., Дороговских В.А., Пластинин М.Л. Нифантьев Э.Е., Слепцова Л.С., Коротеев М.П., Коротеев А.М. Способ коррекции состава нормальной микрофлоры в эксперименте. *ПАТЕНТ РФ на изобретение №2366418*. **2009**.
- [70] Баталова Т.А., Дороговских В.А., Сергеевич А.А., Пластинин М.Л., Коротеев М.П., Коротеев А.М., Нифантьев Э.Е. Способ повышения уровня работоспособности у лабораторных животных в эксперименте. *ПАТЕНТ РФ на изобретение №2371175*. **2009**.
- [71] Зиятдинова Г.К., Гильметдинова Д.М., Будников Г.К., Офицеров Е.Н. Вольтамперометрическое поведение соединений фенольного ряда, обладающих антиоксидантными свойствами. *Ученые записки Казанского гос. университета*. **2005**. Т.147. № 1. С.141-149.
- [72] U.R. Kuppusamy, N.P. Das. Inhibitory effects of flavonoids on several venom hyaluronidases. *Experientia*. **1991**. Vol.47. P.1196-1200.