

КВАНТОВО-ХІМІЧНІ РОЗРАХУНКИ АНТИОКСИДАНТНИХ МЕХАНІЗМІВ 2,3-ДИГІДРОКСИ-6-МЕТИЛ-(4Н)-ПІРАН-4-ОНУ – МЕТАБОЛІТУ БАКТЕРІЙ РОДУ *BACILLUS*

Скороход І.О.¹, Ерденецогт У.², Горго Ю.П.³

¹ Інститут мікробіології та вірусології ім. Д.К. Заболотного НАН України, aphalina.77@gmail.com

² Національний центр громадського здоров'я, Монголія

³ КПІ ім. Ігоря Сікорського, Україна

Abstract

Quantum chemical analysis of the antioxidant and antiradical properties was performed for the optimized structures of the 2,3-dihydro-3,5-dihydroxy-6-methyl-(4H)-pyran-4-one (DDMP). The determined indicators of the course of antioxidant mechanisms showed that the dominant mechanisms for DDMP are SET (Single electron transfer) and SET-PT (Single-Electron Transfer followed by Proton Transfer, SET-PT), and DDMP is a member of the group of medium-strength antioxidants.

Keywords: quantum chemical calculations, 3-dihydro-3,5-dihydroxy-6-methyl-(4H)-pyran-4-one antioxidant and antiradical properties

Вступ. Дисбаланс окисно-відновного гомеостазу в живих клітинах супроводжується підвищенням рівня активних форм кисню (АФК), які можуть проявляти токсичну дію відносно мембранних ліпідів, білків і нуклеїнових кислот [1].

У бактерій роду *Bacillus*, які є широко розповсюдженими представниками ґрунтової мікрофлори, одним з ефективних механізмів захисту від агресивних оксидантів є функціонування захисного комплексу, що складається з ензимів і різних низькомолекулярних антиоксидантів. Антиоксидантні системи цих бактерій можуть діяти як ефективні інгібітори стрес-агентів у різних культур рослин [2]. За допомогою хроматографічних методів в метаболітному комплексі бактерій роду *Bacillus* був ідентифікований 2,3-дигідро-3,5-дигідрокси-6-метил-(4Н)-піран-4-он (2,3-dihydro-3,5-dihydroxy-6-methyl-(4H)-pyran-4-one (DDMP)) [3]. Цей унікальний метаболіт відноситься до флавоноїдної фракції, його хімічна структура ідентична флавоноїдному С-кільцю [4]. Для DDMP характерна антимуутагенна, анти-альфа-глюкозидазна, протипухлинна, антимікробна, а також антиоксидантна активність [5]. Однак, не до кінця зрозуміло, за допомогою яких біохімічних реакцій DDMP елімінує агресивні оксиданти.

Метою роботи було розрахувати термодинамічні показники механізмів інактивації активних форм кисню для 2,3-дигідро-3,5-дигідрокси-6-метил-(4Н)-піран-4-ону – унікального метаболіту штаму *Bacillus subtilis* IMB В-7023.

Матеріали та методи.

Квантово-хімічний аналіз антиоксидантних і антирадикальних властивостей 2,3-дигідрокси-6-метил-(4Н)-піран-4-ону (DDMP) проводили за допомогою програмного пакету Gaussian 09W [6]. Повну оптимізацію геометрії нейтральної молекули DDMP в її основному стані проводили до мінімуму за методом теорії функціональної густини (Density Functional Theory, DFT), розрахункової моделі обмеженого (restricted, r) методу теорії функціоналу густини Беке (B3), яка використовує електронну кореляцію Лі Янга і Пара (LYP) та базисного набору 6-311++g(2d,2p): rB3LYP/6-311++g(2d,2p). Обмеженням (r) була відсутність

неспарених електронів, які є у систем із замкнутою оболонкою [7]. Однак для оптимізації геометрії радикала та катіон-радикалу DDMP ми використали розрахункову модель необмеженого (unrestricted, u) методу теорії функціоналу густини Беке: uB3LYP/6-311++g(2d,2p), оскільки це системи з відкритими оболонками, тобто мають неспарені електрони [7]. Зокрема це були:

- ентальпія дисоціації О-Н зв'язку (Bond Dissociation Enthalpy, BDE), яку розраховували за формулою: $BDE = H_{ArO\cdot} + H_H - H_{ArOH}$, де $H_{ArO\cdot}$ – ентальпія радикалу, який виник внаслідок дисоціації атома водню від антиоксиданта; H_H – ентальпія атома водню; H_{ArOH} – ентальпія нейтральної сполуки антиоксиданта;

- адіабатичний потенціал іонізації (Adiabatic Ionization Potential, AIP), що розраховували за формулою: $AIP = H_{ArOH}^{+\cdot} + H_e - H_{ArOH}$, де $H_{ArOH}^{+\cdot}$ – ентальпія катіон-радикалу; H_e – ентальпія електрону; H_{ArOH} – ентальпія нейтральної сполуки антиоксиданта [8];

- ентальпія дисоціації протону (Proton Dissociation Enthalpy, PDE), яку розраховували за формулою: $PDE = H_{ArO\cdot} + H_H^+ + H_{ArOH}^+$, де $H_{ArO\cdot}$ – ентальпія радикалу, що виник після дисоціації протона від антиоксиданта; H_H^+ – ентальпія протону; H_{ArOH}^+ – ентальпія катіон-радикалу [8].

В розрахунках використані константи ентальпій: $H_{(H)} \text{ вакуум} = -0,49764 \text{ На}$ [9]; $H_{(H^+)} \text{ вакуум} = 0,00236 \text{ На}$ [10]; $H(e^-) = 0,00119 \text{ На}$ [6]. Відповідно, $1 \text{ На} = 627,51 \text{ ккал/моль} = 27,211 \text{ еВ}$. Всі розрахунки були виконані для умов вакууму за $T = 298 \text{ К}$.

Результати та обговорення. У розрахунках були розглянуті 3 базові механізми, за допомогою яких різні антиоксиданти можуть інактивувати АФК.

1. Перенесення атома водню (Hydrogen Atom Transfer, HAT) відбувається за схемою: $Ph-OH + R\cdot \rightarrow Ph-O\cdot + RH$. В ході реакції вільний радикал ($R\cdot$) акцептує атом водню від сполуки фенольної природи ($Ph-OH$), в результаті формується стабільний і мало реактивний феноксильний радикал ($Ph-O\cdot$) і нейтральна форма $R\cdot$ - (RH). Важливим термодинамічним показником цього механізму є ентальпія гемолітичної дисоціації О-Н зв'язку (Bond Dissociation Enthalpy, BDE). Чим слабкіший є О-Н зв'язок в структурі антиоксиданту, тим легше буде відбуватися інактивація $R\cdot$ [12].

Розрахунок BDE DDMP, що проводили в умовах вакууму за 298 К відповідно до теорії функціоналу густини Беке, визначив стабільність 3-ОН і 5-ОН зв'язків в гідроксильних групах. Показник дисоціації 3-ОН зв'язку був дуже високим – 107,4 ккал/моль, що свідчило про нездатність гідроксильної групи в цьому положенні брати участь в реакціях інактивації АФК. Ентальпія гемолітичної дисоціації 5-ОН зв'язку становила 82,4 ккал/моль і перевищувала BDE гідроксильних груп в цьому положенні для моріна, галангіна і каемпферола на 5,36; 6,25 і 6,09 ккал/моль. Отримані результати вказували на низьку здатність DDMP інактивувати вільні радикали з допомогою механізму HAT.

2. Механізм одноелектронного переносу (Single electron transfer, SET) відбувається по реакції: $Ph-OH + R\cdot \rightarrow Ph-OH^{+\cdot} + R^-$. Фенольний антиоксидант віддає вільному R електрон, трансформуючи його в аніонну форму, а сам переходить в стан стабільного феноксильного катіон-радикалу, який не реагує з

субстратом молекул. Оскільки реакція передбачає формування іонів, адіабатичний потенціал іонізації (Adiabatic Ionization Potential, AIP) антиоксидантних сполук стає параметром для прогнозування можливості речовин фенольної природи перехоплювати вільні $R\cdot$ за допомогою механізму SET [9]. Низькі числові значення AIP вказують на легке відщеплення електрона і високу АРА антиоксидантів [13]. Розрахунок AIP включає в себе інформацію про ефективність перехоплення вільних $R\cdot$ фенольними сполуками.

Нами встановлено, що адіабатичний потенціал іонізації DDMP незначно перевищував AIP моріна і таксифоліна на 5,2 і 0,7 ккал/моль. Однак цей показник був нижчим, ніж в нарингеніна і апігеніна на 10,6 і 14,4 ккал/моль. Це вказує на потенційну можливість DDMP інактивувати стрес-агенти через механізм SET. Це також було підтверджено розрахунком енергії верхньої зайнятої молекулярної орбіталі (Highest Occupied Molecular Orbital, HOMO). Молекулам антиоксидантів з високою енергією HOMO властива сильна електронно-донорна здатність [14]. Розрахована енергія HOMO для DDMP становила (-6,390 eV) і була дещо нижчою, ніж в галангіна і силібіна. Однак досліджуваний показник перевищував енергію HOMO для вітаміну С і цис, транс-цинарину на 0,150 і 0,507 eV. Тому отримані нами дані вказували на досить задовільну електронно-донорну здатність DDMP.

3. Електронно-донорний механізм, який супроводжується відщепленням протона (H^+) (Single-Electron Transfer followed by Proton Transfer, SET-PT) і включає в себе 2 реакції [15]:

1) відбувається за принципом механізму SET і визначає можливість його протікання: $Ph-OH + R\cdot \rightarrow Ph-OH^+ + R^-$;

2) катіон-радикал фенольної сполуки розпадається на фенокисильний радикал і протон: $Ph-OH^+ \rightarrow Ph-O^+ + H^+$, який, реагуючи з аніонною формою радикалу, переводить її в нейтральну сполуку: $R^- + H^+ \rightarrow RH$.

Механізм SET-PT характеризують 2 термодинамічні параметри: адіабатичний іонізаційний потенціал (AIP) і ентальпія дисоціації протона (Proton Dissociation Enthalpy, PDE), яка описує здатність фенольної сполуки віддавати H^+ . Низькі числові значення PDE вказують на легке відщеплення протона від молекули антиоксиданту. Тому хід механізму SET-PT, в основному, залежить від PDE [16]. Отримані результати квантово-хімічних розрахунків адіабатичного іонізаційного потенціалу показали, що DDMP притаманний механізм SET-PT. Причому, ентальпія дисоціації H^+ для цього метаболіту становила 209,4 ккал/моль і незначно відрізнялася від PDE для моріна (210,9 ккал/моль), галангіна (208,3 ккал/моль) і каемпферола (213,1 ккал/моль).

Висновок. Результати квантово-хімічних розрахунків та аналіз шляхів інактивації АФК за участю 2,3-дигідро - 3,5-дигідрокси-6-метил-4 (H)-піран-4-ону показали, що домінантними антиоксидантними механізмами для DDMP є SET і SET-PT. Відповідно, DDMP входить в групу антиоксидантів середньої сили.

Список використаної літератури:

1. Sigler K., Chaloupka J., Brozmanova J., Stadler N., Höfer M. Oxidative stress in microorganisms – I. Microbial vs. higher cells – damage and defenses in relation to cell aging and death. *Folia microbial.* 1999. Vol. 44, № 6. P. 587-624. <https://doi.org/10.1007/BF02825650>
2. Abhinandan K, Skori L, Stanic M, Hickerson N, Jamshed M, Samuel M. A. Abiotic stress signaling in wheat—an inclusive overview of hormonal interactions during abiotic stress responses in wheat. *Frontiers in Plant Science.* 2018; 9(734):1–25. <https://doi.org/10.3389/fpls.2018.00734>
3. Рой А.О., Пасічник Л. А, Церковняк Л.С. Вплив бактерій роду *Bacillus* на збудника бактеріального рака томатів. *Мікробіол. журн.* 2012; 74(5):74–80.
4. Yu X, Zhao M, Liu F, Zeng S, Hu J. Identification of 2,3-dihydro-3,5-dihydroxy-6-methyl-4H-pyran-4-one as a strong antioxidant in glucose–histidine. Maillard reaction products. *Food Res Int.* 2013; 51:397–403. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2012.12.044>
5. Ban JO, Hwang IG, Kim TM, Hwang BY, Lee US, Jeong HS, Yoon YW, Kim DJ, Hong JT. Anti-proliferate and pro-apoptotic effects of 2,3-dihydro-3,5-dihydroxy-6-methyl-4H-pyranone through inactivation of NF- κ B in human colon cancer cells. *Arch Pharm Res.* 2007; 30:1455–1463. <https://doi.org/10.1007/BF02977371>
6. Frisch M. J, Trucks G. W, Schlegel H. B, et.al, Gaussian 09, Revision A.02. Gaussian Inc., Wallingford, CT 2009.
7. Lee C, Yang R. G, Parr W. Development of the Colle-Salvetti correlation energy formula into a functional of the electron density. *Physical Review.* 1988; 37(2):785–789. <https://doi.org/10.1103/PhysRevB.37.785>
8. Mikulski D, Eder K, Molski M. Quantum-Chemical study on relationship between structure and antioxidant properties of hepatoprotective compounds occurring in *Cynara Scolymus* and *Silybum Marianum*. *Journal of Theoretical and Computational Chemistry.* 2014; 13(1):1–24. <https://doi.org/10.1142/S0219633614500047>
9. Wright J. S, Johnson E. R, DiLabio G. A. Predicting the activity of phenolic antioxidants: theoretical method, analysis of substituent effects, and application to major families of antioxidants. *Chem. Soc.* 2001; 123(6):1173–1183. <https://doi.org/10.1021/ja002455u>
10. Klein E, Rimarcik J, Lukes V. DFT/B3LYP study of the O-H bond dissociation enthalpies and proton affinities of para- and meta-substituted phenols in water and benzene. *Acta Chim. Slovaca.* 2009; 2(2):37–51. <https://doi.org/10.1016/j.theochem.2006.04.017>
11. Bartness J. E. Thermodynamics of the electron and the proton. *J. Phys. Chem.* 1994; 96:6420–6424. <https://doi.org/10.1021/j100076a029>
12. Milena M. V, Verena S. L, Mario R. M. Bioactive compounds. Phenolic compounds: structure, classification, and antioxidant power. 2019; 2:40.
13. Urbaniak A, Molski M, Szlag M. Quantum-chemical calculations of the antioxidant properties of trans-p-coumaric acid and trans-sinapinic acid. *Computational Methods in Science and Technology.* 2012; 18(2):1–112. <https://doi.org/10.12921/cmst.2012.18.02.117-128>
14. Sebastian S, Sundaraganesan N, Manoharan S. Molecular structure, spectroscopic studies and first-order molecular hyperpolarizabilities of ferulic acid by density functional study. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy.* 2009; 74:312–323. <https://doi.org/10.1016/j.saa.2009.06.011>
15. Lee C. Y, Sharma A, Semenya J, Anamoah C, Chapman K. N, Barone V. Computational study of Ortho-Substituent effects on antioxidant activities of phenolic dendritic antioxidants. *Antioxidants (Basel).* 2020; 9(3):189. <https://doi.org/10.3390/antiox9030189>
16. Chen Y, Xiao H, Zheng J, Liang G. Structure-thermodynamics-antioxidant activity relationships of selected natural phenolic acids and derivatives: an experimental and theoretical evaluation. *Plos One.* 2015; 10(3):1–20. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0121276>