

CHALKONY JAKO POTENCIÁLNÍ INHIBITORY ALDOSAREDUKTASY

MARTA CHLUPÁČOVÁ^a
a VERONIKA OPLETALOVÁ^b

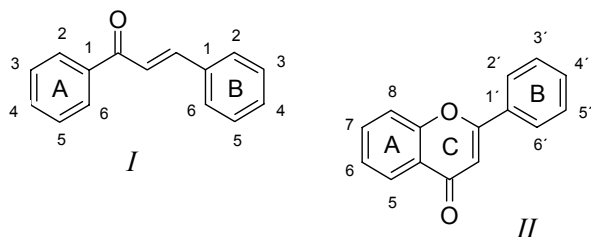
^aKatedra farmaceutické chemie a kontroly léčiv, ^bVýzkumné centrum LN00B125, Farmaceutická fakulta v Hradci Králové, Univerzita Karlova v Praze, Heyrovského 1203, 500 05 Hradec Králové
opletalo@faf.cuni.cz, chlupacova@faf.cuni.cz

Obsah

1. Úvod
2. Aldosareduktasa a její inhibitory
3. Působení chalkonů na aldosaareduktasu
4. Závěr

1. Úvod

Chalkon je triviální název 1,3-difenyprop-2-en-1-onu (*I*), vyskytující se většinou v *E*-konfiguraci. Některé deriváty chalkonu lze nalézt v přírodě, kde hrají roli prekurzorů všech flavonoidů v metabolismu rostlin. V podstatě jde o otevřené deriváty flavonů (*II*). Při biologickém testování přírodních i syntetických chalkonů bylo u různých derivátů zjištěno široké spektrum účinků. Lze uvést např. působení antibakteriální, antifungální, antivirové, antiprotozoální, antihelmintické, insekticidní, cytotoxické a antitumorózní, chemoprotektivní, gastroprotektivní a antiulcerózní, protizánětlivé, choleretické, estrogenní a další^{1,2}.



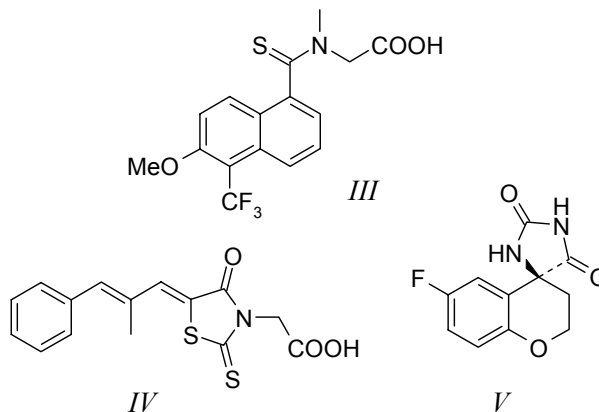
Chalkony, podobně jako jiné sloučeniny s konjugovaným enonovým seskupením, reagují s thioley a aminy za vzniku aduktů³⁻⁶. Teoreticky lze tedy očekávat, že budou nespecificky reagovat s různými fyziologicky důležitými látkami, včetně nukleových bází a enzymů. Ve skutečnosti je určitá selektivita dána již skutečností, že reaktivita α,β -nenasyčených ketonů vůči thiolům je podstatně vyšší než jejich reaktivita k aminům, což snižuje pravděpodobnost jejich interakce s nukleovými kyselinami^{1,4} a ani v případě enzymů nemusí být přítomnost enonového seskupení rozhodujícím faktorem pro interakci

s určitým enzymem. Tuto skutečnost je možné demonstrovat například na interakci chalkonů s aldosaareduktasou, která hraje významnou úlohu v rozvoji pozdních diabetických komplikací a představuje důležitou cílovou strukturu pro léčiva určená k prevenci patologických důsledků cukrovky – jedné z nejzávažnějších a nejrozšířenějších chorob postihujících především obyvatele vyspělých zemí s vysokou životní úrovní⁷⁻¹¹.

2. Aldosaareduktasa a její inhibitory

Aldosaareduktasa (EC 1.1.1.21, ALR2) je prvním enzymem polyolové metabolické dráhy, redukující v přítomnosti NADPH D-glukosu na její cukerný alkohol D-sorbitol, který je dále přeměňován sorbitoldehydrogenasou (EC 1.1.1.14, SD) na fruktosu. Za normoglykemických podmínek má ALR2 ke glukose v tkáních nízkou afinitu. Ovšem u diabetiků, kde je zvýšená koncentrace glukosy v krevním oběhu, se tato metabolická dráha více uplatňuje. Následkem toho se kumuluje v buňkách sorbitol, zvláště ve tkáních, kde není přestup glukosy přes membránu závislý na inzulinu (nervy, sítnice, čočka). Zvýšená koncentrace sorbitolu způsobuje pak hypertonicitu a osmotické změny v buňce. To má za následek pozdější chronické komplikace diabetu, k nimž patří periferní neuropatie, retinopatie, katarakta a nefropatie. Na základě experimentálních i klinických zkoušek bylo zjištěno, že rozvoj těchto komplikací, hlavně katarakty a periferní neuropatie, může zastavit nebo alespoň zpomalit použití inhibitorů ALR2 (ARIs)¹²⁻¹⁴.

V současné době jsou jako ARIs studovány především dva strukturální typy – karboxylové kyseliny a spirohydantoiny. Ve skupině karboxylových kyselin je nejznámějším zástupcem tolrestat (*III*). Do terapeutické praxe byl uveden v roce 1989, ale v roce 1997 byl pro nízkou účinnost a nežádoucí hepatotoxicitu stažen z používání. Dosud



nejúspěšnějším ARI je jeho analog epalrestat (ONO 2235, *IV*) používaný v Japonsku. Ve skupině spirohydantoinů je předlohou sloučeninou sorbinil (*V*). Žádný z jeho analogů dosud nebyl uveden do terapeutické praxe^{11,14-16}. Zatímco *in vitro* je účinnost obou skupin srovnatelná, *in vivo* se v účinnosti liší. Spirohydantoiny jsou sice účinnější než karboxylové kyseliny, ale mají závažné vedlejší účinky. Karboxylové kyseliny v důsledku nízké pK_a špatně pronikají biologickými membránami a jsou nedostatečně aktivní. Nalezení nových ARI strukturně odlišných od obou výše uvedených typů a méně kyselých než karboxylové kyseliny zůstává proto stále aktuálním úkolem a flavonoidy (včetně chalkonů) představují důležitou skupinu předlohouvých struktur¹⁴.

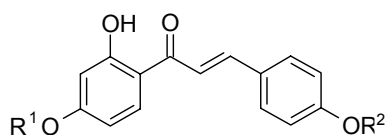
3. Působení chalkonů na aldoseduktasu

Vliv chalkonů a dalších flavonoidů na aldoseduktasu byl studován nezávisle italskými¹⁷⁻²¹, japonskými²²⁻²⁹ a korejskými^{30,31} autory. Studium vztahů struktury a účinku – hledáním farmakoforu – byly stanoveny určité nároky na elektronové a sterické vlastnosti ARI. Molekula musí obsahovat jednak planární strukturu se dvěma hydrofobními jednotkami (např. aromáty) a dále kyselý vodík (např. karboxylové kyseliny, cyklického amidu nebo fenolické hydroxyskupiny). Anion vzniklý odštěpením tohoto protonu pak může reagovat s kationtovým vazebným místem enzymu¹⁹. Krystalografickou analýzou komplexu ALR2 – inhibitor ALR2 byla určena i vazebná místa enzymu. Disociovaná kyselá funkce inhibitoru se vodíkovou vazbou váže na dva klíčové aminokyselinové zbytky enzymu, Tyr48 a His110, a zároveň vzniká silná elektrostatická vazba s pozitivně nabitým nikotinamidovým kruhem $NADP^+$. Vazebným místem pro aromatický substituent je hydrofobní kapsa tvořená Trp111 a Leu300 (cit.²⁰).

V japonské tradiční medicíně se k léčbě subjektivních symptomů diabetické neuropatie již po staletí používají tzv. kampo léčiva, což jsou tradiční orientální rostlinné přípravky. Důležitou součástí těchto přípravků je lékořice (*Glycyrrhiza* spp.). Aida se spolupracovníky²² zjistili, že kampo přípravky obsahující kořen lékořice inhibují ALR2. V dalších studiích^{23,24} pak používali vodné extrakty z kořene *Glycyrrhiza uralensis* Fischer a jako nejúčinnější komponenty identifikovali 1-(2,4-dihydroxyfenyl)-3-(4-hydroxyfenyl)prop-2-en-1-on (isolikviritigenin, *VIa*) a jeho glykosidy likurosid (*VIb*) a isolikviritin (*VIc*).

Schopnost inhibovat ALR2 je uváděna i u dalších chalkonů izolovaných z *Glycyrrhiza* spp., např. 1-(4-hydroxyfenyl)-3-(4-hydroxy-2-methoxy)prop-2-en-1-onu (echinatin, *VIIa*, cit.^{24,25}), 3-[5-(1,1-dimethylprop-2-en-1-yl)-4-hydroxy-2-methoxyfenyl]-1-(4-hydroxyfenyl)prop-2-en-1-onu (likochalkon A, *VIIb*, cit.²⁵) a neolikurosidu (*VIa*, cit.¹⁷).

V rámci studií věnovaných obsahovým látkám lékořice byla největší pozornost věnována isolikviritigeninu (*VIa*). Kromě inhibice ALR2 byl u tohoto chalkonu hodnocen také vliv na kumulaci sorbitolu v potkaních červených



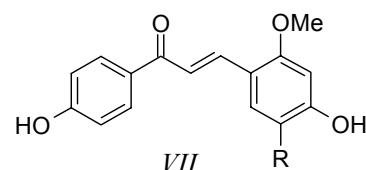
VI

VIa: $R^1 = R^2 = H$

VIb: $R^1 = H$, $R^2 = \beta$ -D-apiofuranosyl-(1 \rightarrow 2)- β -D-glukopyranosyl

VIc: $R^1 = H$, $R^2 = \beta$ -D-glukopyranosyl

VIa: $R^1 = \beta$ -D-apiofuranosyl-(1 \rightarrow 2)- β -D-glukopyranosyl, $R^2 = H$

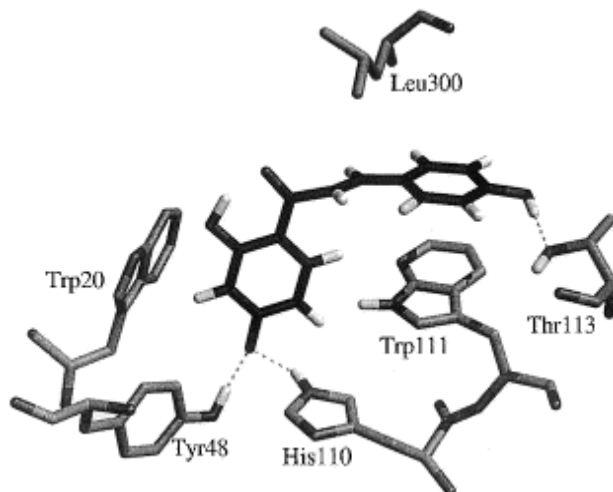


VII

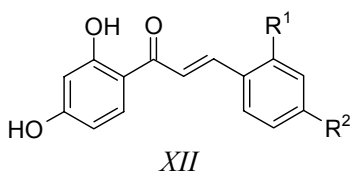
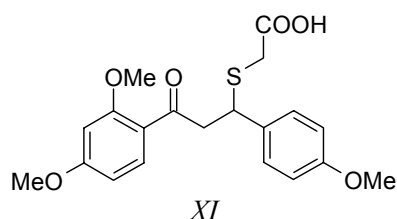
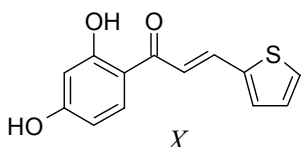
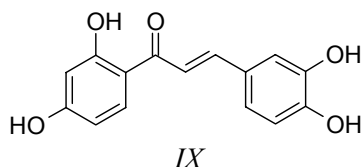
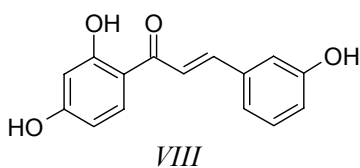
VIIa: $R = H$

VIIb: $R = 1,1$ -dimethylprop-2-en-1-yl

krvinkách, očních čočkách a *nervus sciaticus* a bylo zjištěno, že účinek isolikviritigeninu je srovnatelný s účinností známého inhibitoru ALR2 – epalrestatu (*IV*, cit.²⁴). U glykosidových derivátů likurosidu (*VIb*) a isolikviritinu (*VIc*) byl zjištěn nižší inhibiční účinek vůči ALR2, což je v souladu s dříve publikovanými údaji o významu volné hydroxyskupiny v poloze 4' flavonoidů pro jejich inhibiční účinek na aldoseduktasu^{23,24}. U diabetických potkanů snižoval isolikviritigenin obsah sorbitolu^{26,27} a zvyšoval hladinu cAMP (cit.²⁷) v *nervus sciaticus*. Dále zvyšoval produkci prostacyklinu (PGI_2) v aortách potkanů s diabetem indukovaným streptozotocinem²⁶ a inhiboval agregaci krevních destiček²⁸. Všechny tyto aktivity naznačují, že by isolikviritigenin mohl účinně bránit rozvoji pozdních diabetických komplikací. Struktura isolikviritige-



Obr. 1. Vazba isolikviritigeninu (*IIIa*) v komplexu ALR2-inhibitor (převzato z lit.²⁰ s laskavým svolením Elsevier Science)



XIIa: $R^1 = \text{OH}$, $R^2 = \text{H}$

XIIb: $R^1 = R^2 = \text{OH}$

XIIc: $R^1 = R^2 = \text{CH}_3$

ninu dobře vyhovuje výše popsanému modelu vazebných míst enzymu²⁰. Bylo zjištěno, že hydroxyskupina v poloze 4 kruhu A je nejkyselější a důležitá pro vazbu na Tyr48 a His110. Značná kyselost této hydroxyskupiny je dána konjugací vznikajícího kyslíkového aniontu s karbonylem enonového sekupení. Hydroxyskupina v poloze 2 kruhu A zajišťuje rigidní koplanaritu molekuly intramolekulární vodíkovou vazbou na karbonylový kyslík. Konformace nejlépe vyhovující vazebnému místu enzymu má torzní úhel kolem vazby mezi karbonylem a ethenovou dvojnou vazbou 115°. Kruh B je koplanární s ethenovou vazbou a váže se do hydrofobní kapsy lemované Trp111 a Leu300. Fenolická hydroxyskupina na kruhu B se váže na Thr113 (obr. 1).

Isolikviritigenin lze připravit i synteticky^{18,19,25,30,31}. Stal se předlohou sloučeninou pro studium dalších analogických inhibitorů ALR2, z nichž aktivitu srovnatelnou s isolikviritigeninem měly např. 1-(2,4-dihydroxyfenyl)-3-(3-hydroxyfenyl)prop-2-en-1-on (VIII), 1-(2,4-dihydroxyfenyl)-3-(3,4-dihydroxyfenyl)prop-2-en-1-on (butein, IX) a 1-(2,4-dihydroxyfenyl)-3-(2-thienyl)prop-2-en-1-on (X) a adiční produkt 1-(2,4-dimethoxyfenyl)-3-(4-methoxy-

fenyl)prop-2-en-1-onu s thioglykolovou kyselinou (XI, cit.¹⁹).

V dalších studiích^{25,30,31} byla nejvyšší aktivita zjištěna u 1-(2,4-dihydroxyfenyl)-3-(2-hydroxyfenyl)prop-2-en-1-onu (XIIa), 1-(2,4-dihydroxyfenyl)-3-(2,4-dihydroxyfenyl)prop-2-en-1-onu (XIIb), 1-(2,4-dihydroxyfenyl)-3-(2,4-dimethylfenyl)prop-2-en-1-onu (XIIc) a buteinu (IX). Butein měl navíc výrazný antioxidační efekt v DPPH (1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl) testu. Mikromolární koncentrace nutná pro 50% snížení tvorby DPPH radikálu (IC_{50}) byla $7,49 \pm 0,8 \mu\text{M}$. Dále chelatoval měďnaté ionty výrazněji než EDTA a inhiboval kumulaci sorbitolu v *nervus sciaticus*. Všechny tyto vlastnosti mohou brzdit rozvoj diabetických komplikací a butein byl proto autory doporučen k dalšímu zkoumání³¹.

Vztahy mezi strukturou a působením těchto sloučenin na ALR2 lze shrnout takto:

- většina inhibitorů ALR2 odvozených od chalkonu jsou polyhydroxyderiváty; nejúčinnější jsou sloučeniny s hydroxyskupinami v polohách 2 a 4 kruhu A; charakter substituentů na kruhu B účinnost podstatně neovlivňuje
- náhrada kruhu B thiofenem je možná; náhrada kruhu A thiofenem aktivitu snižuje; náhrada benzenových kruhů pyrrolem nebo pyridinem vedla ke špatně rozpustným a málo účinným derivátům bez ohledu na to, zda šlo o kruh A nebo B
- halogenace na jádrech vedla k derivátům špatně rozpustným v testovacím médiu; pokud se podařilo inhibiční účinek stanovit, byl obvykle nižší než v případě isolikviritigeninu
- podle modelu vazebných míst enzymu se zdá, že přítomnost enonového spojovacího řetězce není nezbytná; trihydroxydihydrochalkon vzniklý redukcí isolikviritigeninu měl přibližně poloviční účinnost, ale analogické dihydrochalkony, v nichž byly hydroxyskupiny v poloze 4 kruhu A a B methylovány, byly neúčinné; dihydrochalkon XI měl aktivitu srovnatelnou s isolikviritigeninem; z toho lze usuzovat, že dihydrochalkony si zachovávají inhibiční aktivitu vůči ALR2, pokud mají v molekule vhodnou kyselou funkční skupinu.

4. Závěr

Aldosareduktasa (ALR2) hraje významnou roli v rozvoji pozdních diabetických komplikací. Žádný z dosud vyvinutých inhibitorů nevyhovuje plně požadavkům na účinné a bezpečné léčivo. Jednou z intenzivně studovaných skupin nových potenciálních inhibitorů tohoto enzymu jsou chalkony a jejich deriváty. I když přítomnost reaktivního enonového seskupení v jejich molekulách může vést k interakci s dalšími enzymy, v pokusech na potkanech *in vivo*³¹ nebyla pozorována výrazná toxicita. Naopak některé další účinky, především účinek antioxidační a antiagregační jsou pro prevenci diabetických kom-

pplikací výhodné. Studium vztahů mezi strukturou a účinností navíc ukázalo, že přítomnost enonového seskupení není pro inhibici ALR2 nezbytnou podmínkou a v terapii by se tedy mohly uplatnit i méně reaktivní vhodně substituované dihydrochalkony.

Tento přehled byl zpracován s podporou grantového projektu Fondu rozvoje vysokých škol č. 2970/2003 a výzkumného projektu LN00B125 Ministerstva školství, mládeže a tělovýchovy České republiky.

LITERATURA

- Dimmock J. R., Elias D. W., Beazely M. A., Kandepu N. M.: *Curr. Med. Chem.* **6**, 1125 (1999).
- Opletalová V., Říčičářová P., Šedivý D., Meltrová D., Křiváková J.: *Folia Pharm. Univ. Carol.* **25**, 21 (2000).
- Schraufstätter E., Deutsch S.: *Z. Naturforsch. b* **4**, 276 (1949).
- Dal Pozzo A., Dansi A.: *Boll. Chim. Farm.* **118**, 139 (1979).
- Dimmock J. R., Kumar P., Quail J. W., Pugazhenth U., Yang J., Chen M., Reid R. S., Allen T. M., Kao G. Y., Cole S. P. C., Batiš G., Balzarini J., De Clercq E.: *Eur. J. Med. Chem.* **30**, 209 (1995).
- Park Choo H. Y., Peak K. H., Park J., Kim D. H., Chung H. S.: *Eur. J. Med. Chem.* **35**, 643 (2000).
- Oka M., Kato N.: *J. Enzyme Inhib.* **16**, 465 (2001).
- Miyamoto S.: *Expert Opin. Ther. Pat.* **12**, 621 (2002).
- Mealy N. E., Castaner R., Martin L., del Fresno M., Revel L., Bayes M., Sorbera L. A., Cole P., Cullell-Young M., Leeson P. A., Prous J.: *Drugs Fut.* **27**, 799 (2002).
- Altan V. M.: *Curr. Med. Chem.* **10**, 1317 (2003).
- de la Fuente J. A., Manzanaro S.: *Nat. Prod. Rep.* **20**, 243 (2003).
- Kawanishi K., Ueda H., Moriyasu M.: *Curr. Med. Chem.* **10**, 1353 (2003).
- Suzen S., Buyukbingol E.: *Curr. Med. Chem.* **10**, 1329 (2003).
- Rastelli G., Ferrari A. M., Costantino L., Gamberini M. C.: *Bioorg. Med. Chem.* **10**, 1437 (2002).
- Da Settimo F., Primofiore G., Da Settimo A., La Motta C., Simorini F., Novellino E., Greco G., Lavecchia A., Boldrini E.: *J. Med. Chem.* **46**, 1419 (2003).
- Marečková K.: *Diplomová práce*. Univerzita Karlova, Hradec Králové 1999.
- Benvenuti S., Severi F., Constantino L., Melegari M., Mucci A.: *Riv. Ital. EPPS* **7**, 13 (1996); *Chem. Abstr.* **126**, 222831 (1995).
- Severi F., Constantino L., Benvenuti S., Vampa G., Mucci A.: *Med. Chem. Res.* **6**, 128 (1996).
- Severi F., Benvenuti S., Constantino L., Vampa G., Melegari M., Antolini L.: *Eur. J. Med. Chem.* **33**, 859 (1998).
- Rastelli G., Antolini L., Benvenuti S., Costantino L.: *Bioorg. Med. Chem.* **8**, 1151 (2000).
- Rastelli G., Costantino L., Gamberini M. C., Del Corso A., Mura U., Petrash J. M., Ferrari A. M., Pacchioni S.: *Bioorg. Med. Chem.* **10**, 1427 (2002).
- Aida K., Shindo H., Tawata M., Onaya T.: *Planta Med.* **53**, 131 (1987).
- Aida K., Tawata M., Shindo H., Onaya T., Sasaki H., Nishimura H., Chin M., Mitsunashi H.: *Planta Med.* **55**, 22 (1989).
- Aida K., Tawata M., Shindo H., Onaya T., Sasaki H., Yamaguchi T., Chin M., Mitsunashi H.: *Planta Med.* **56**, 254 (1990).
- Iwata S., Nagata N., Omae A., Yamaguchi S., Okada Y., Shibata S., Okuyama T.: *Biol. Pharm. Bull.* **22**, 323 (1999).
- Wakasugi M., Noguchi T., Inoue M., Tawata M., Shindo H., Onaya T.: *Prostaglandins, Leukotrienes Essent. Fatty Acids* **44**, 233 (1991).
- Shindo H., Tawata M., Aida K., Onaya T.: *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **74**, 393 (1992).
- Tawata M., Aida K., Noguchi T., Ozaki Y., Kume S., Sasaki H., Chin M., Onaya T.: *Eur. J. Pharmacol.* **212**, 87 (1992).
- Matsuda H., Morikawa T., Toguchida I., Yoshikawa M.: *Chem. Pharm. Bull.* **50**, 788 (2002).
- Lim S. S., Jung S. H., Ji J., Shin K. H., Keum S. R.: *Chem. Pharm. Bull.* **48**, 1786 (2000).
- Lim S. S., Jung S. H., Ji J., Shin K. H., Keum S. R.: *J. Pharm. Pharmacol.* **53**, 653 (2001).

M. Chlupáčová^a and V. Opletalová^b (^aDepartment of Pharmaceutical Chemistry and Drug Control, ^bResearch Centre LN00B125, Faculty of Pharmacy, Charles University, Hradec Králové: **Chalcones as Potential Inhibitors of Aldose Reductase**)

Chalcone (1,3-diphenylprop-2-en-1-one) and its derivatives show numerous biological activities. In this review, their effects on aldose reductase, the enzyme that plays an important role in pathogenesis of secondary diabetic complications, are described. The highest potency was observed for derivatives with hydroxy derivatives in positions 2 and 4 of ring A, whilst the substitution pattern in the other ring seems to be less important. Structure – activity studies have also revealed that the presence of the enone grouping is not necessary for the inhibition of aldose reductase. Hence, corresponding dihydrochalcones could be used to prevent possible side effects resulting from the high reactivity of the enone grouping.