

О. С. Веселкина¹, И. Л. Соловцова^{2, 3}, Н. Н. Петрищев², Л. В. Галебская²,
М. Е. Боровитов¹, Д. И. Нилов¹, М. А. Соловьева², Е. А. Воробьев²,
К. С. Леньшина²

ВЛИЯНИЕ *N,N'*-ЗАМЕЩЕННЫХ ПИПЕРАЗИНОВ НА ЦИТОЛИЗ

¹ ЗАО “ВЕРТЕКС”, Россия, 199106, Санкт-Петербург, 24-я линия, 27А;

² ФГБУ “Первый Санкт-Петербургский государственный медицинский университет им. академика И. П. Павлова” МЗ РФ”, Россия, 197022, Санкт-Петербург, ул. Льва Толстого д. 6 – 8;

³ Санкт-Петербургский государственный политехнический университет, Россия, 195251, Санкт-Петербург, ул. Хлопина д. 5.

Исследована гемолитическая активность *N,N'*-замещенных пиперазинов, а также их влияние на гемолитический процесс, инициированный облучением (красный светодиод, 653 нм) в присутствии фотосенсибилизатора радахлорин (ООО “РАДАФАРМА”, Россия), и на комплементзависимый гемолиз. Все соединения в исследованном диапазоне концентраций (0,15 – 3,0 мМ) не вызывали лизиса эритроцитов человека, но обнаруживали дозозависимое ингибирование фотогемолиза, проявляющееся в увеличении времени 50 % лизиса клеток. На параметры лизиса эритроцитов активированным комплементом производные пиперазинов существенного влияния не оказывали. Следовательно, антигемолитический эффект *N,N'*-замещенных пиперазинов обусловлен их антиоксидантным действием.

Ключевые слова: *N,N'*-замещенные пиперазины; фотогемолиз; фотосенсибилизатор; антиоксидант; система комплемента.

Производные пиперазина имеют широкий спектр биологического действия и успешно применяются в разных областях медицины [1, 2]. Создание новых лекарственных препаратов на основе замещенных пиперазинов и всестороннее исследование их свойств представляет несомненный интерес. Так, ранее нами показано [3], что *N,N'*-замещенные пиперазины проявляют антиагрегантную, антикоагулянтную и вазодилаторную активность и могут быть использованы для создания лекарственных препаратов. При этом важно оценивать и цитолитическую активность препаратов, предназначенных для терапии заболеваний системы гемостаза, так как цитолитиз и, в частности, гемолиз, вызванный приемом препаратов, являются серьезной терапевтической проблемой [4, 5].

Известно, что незначительные изменения в структуре физиологически активных соединений приводят к существенному изменению их биологической активности [6].

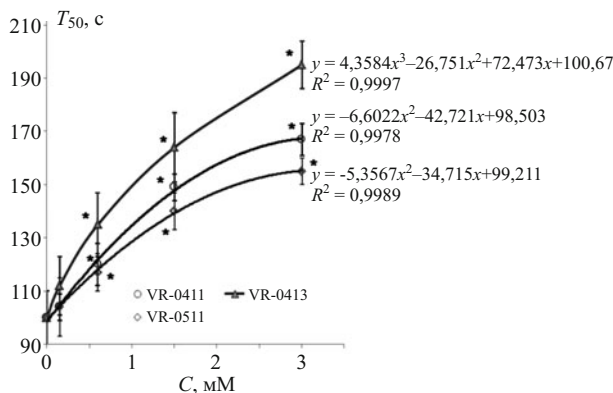
Целью настоящей работы явилось изучение цитолитической активности новых *N,N'*-замещенных пиперазинов (I, II, III, см. табл. 1), отличающихся по химической структуре, а также оценка их влияния на разные виды гемолиза: 1) фотогемолиз, обусловленный окислительным стрессом; 2) комплементзависимый гемолиз, не требующий участия активных форм кислорода. Синтез *N,N'*-замещенных пиперазинов проведен в службе по науке ЗАО “ВЕРТЕКС”.

Экспериментальная химическая часть

Контроль степени протекания реакций и чистоты полупродуктов на каждой стадии синтеза проводили методом ТСХ на пластинах Merck “TLC Silicagel 60

F₂₅₄” или Macherey-Nagel “ALUGRAM SIL G/UV₂₅₄” (проявляли с помощью УФ-облучения). Спектры ЯМР ¹³C и ЯМР ¹H регистрировали на спектрофотометре Bruker DRX-500 (Германия) с рабочей частотой 500,13 МГц для ядер ¹H и 125,76 МГц для ¹³C, в качестве стандарта использовали сигналы остаточного растворителя: CDCl₃ (7,28 м.д.), D₂O (4,80 м.д.), DMSO-d₆ (2,50 м.д.). Масс-спектры получали на масс-спектрометре Bruker AmaZon (ионизация по методу электроспрей). Оценку чистоты соединений проводили методом ВЭЖХ на хроматографе Alliance (Waters, США), использовали колонку Zorbax Eclipse XDB-C18, 3,5 мкм, 3 · 100 мм (Agilent Technologies, США), подвижная фаза — смесь буферного раствора pH 3,0, содержащего 0,0125 М натрия октансульфоната (Merck, #1,18307) и 0,03 М натрия дигидрофосфата (Merck, #1/06342) с ацетонитрилом (J. Baker, #9012) в соотношении 75:25, скорость потока подвижной фазы 0,5 мл/мин, элюирование проводили в изократическом режиме, детектирование — при 210 нм.

1-Карбимидамидо-4-(2,3,4,5-тетраметоксибензоил)пиперазина гемифумарат (I). 1-Карбимидамидо-4-(2,3,4,5-тетраметоксибензоил)пиперазина ацетат (IV) получают как описано нами ранее [3]. 39,0 г (95 ммоль) ацетата IV растворяют в горячей воде (125 мл, ~ 60 °С), к полученному раствору прибавляют горячий (~ 60 °С) раствор фумаровой кислоты (5,2 г, 45 ммоль) в воде (75 мл). Образовавшийся осадок отделяют фильтрованием и промывают на фильтре водой (3 × 75 мл) и перекристаллизовывают из горячей воды, получают I в виде бесцветных кристаллов (30,3 г, 78 %). Спектр ЯМР ¹H (DMSO-d₆), δ, м.д. (J, Гц): 3,25 (м., 2H, CH₂-пиперазинового фрагмента), 3,39 (м, 4H, CH₂-пиперазинового фрагмента и H₂O),



Зависимость времени лизиса 50 % эритроцитов (T_{50}) от концентрации соединений, % к контролю (физиологический раствор). Значение T_{50} для контроля (87 ± 15) с. * — различия статистически значимы по сравнению с контролем, $p < 0,05$ ($n = 5$).

3,51 (м, 2H, CH_2 -пиперазинового фрагмента), 3,65 (м, 5H, CH_2 -пиперазинового фрагмента и CH_3O -), 3,76 (м, 3H, CH_3O -), 3,78 (м, 3H, CH_3O -), 3,83 (м, 3H, CH_3O -), 6,21 (с, 1H, $\text{HO}_2\text{CCH}=\text{CHCO}_2\text{H}$), 6,67 (с, 1H, H-Ar), 9,43 (уш.с., 4H, $\text{C}(\text{NH}_2)(\text{N}^+\text{H}_2)$). Спектр ЯМР ^{13}C (DMSO-d_6), δ , м.д.: 40,64 (CH_2 -пиперазинового фрагмента), 44,29 (CH_2 -пиперазинового фрагмента), 44,82 (CH_2 -пиперазинового фрагмента), 45,63 (CH_2 -пиперазинового фрагмента), 56,17 (CH_3O -), 60,68 (CH_3O -), 61,06 (CH_3O -), 61,52 (CH_3O -), 105,43 (C6, Ar), 124,54 (C1, Ar), 136,56 ($\text{HO}_2\text{CCH}=\text{CHCO}_2\text{H}$), 143,04 (C2, Ar), 143,20 (C5, Ar), 146,48 (C4, Ar), 149,51 (C3, Ar), 157,43 ($\text{C}(\text{NH}_2)(\text{N}^+\text{H}_2)$), 166,16 (CON), 172,12 ($\text{HO}_2\text{CCH}=\text{CHCO}_2\text{H}$). Масс-спектр: MH^+ найдено — 353,20, MH^+ вычислено — 353,18. Чистота продукта по данным ВЭЖХ — 100 %.

1-Карбимидамидо-4-(2-[1-метилпропил]окси-3,4,5-триметоксибензоил)пиперазина гемифумарат (II)

2-Бром-3,4,5-трибутоксibenзойная кислота (V). К раствору 3,4,5-триметоксибензойной кислоты (106,0 г, 0,50 моль) в хлороформе (500 мл) прибавляют

воду (10 мл). Реакционную смесь нагревают до температуры кипения. К кипящей смеси при перемешивании добавляют по каплям раствор брома (32,2 мл, 99,8 г, 0,626 моль) в хлороформе (100 мл) в течение 30 мин, смесь кипятят с обратным холодильником в течение 10 ч. Охлажденную реакционную смесь промывают водой (3×200 мл) и сушат над безводным сульфатом магния. Осушитель удаляют фильтрованием. Фильтрат упаривают на ротационно-пленочном испарителе при пониженном давлении. Полупродукт получают в виде кристаллов бледно-кремового цвета (120,8 г, 83 %) и используют на следующей стадии без дополнительной очистки. Спектр ЯМР ^1H (CDCl_3), δ , м.д. (J, Гц): 3,92 (3H, CH_3O -), 3,93 (3H, CH_3O -), 3,98 (3H, CH_3O -), 7,42 (с, 1H, H-Ar), 11,00 (уш.с., 1H, CO_2H). Чистота полупродукта по данным спектроскопии ЯМР ^1H и ТСХ составляет 95 %.

2-Гидрокси-3,4,5-триметоксибензойная кислота (VI). К горячему раствору кислоты V (60,0 г, 0,206 моль) и гидроксида натрия (50,0 г, 1,25 моль) в воде (400 мл) прибавляют при перемешивании сульфат меди(II) в виде пентагидрата (51,4 г, 0,206 моль, 100 мол. %) и кипятят реакционную смесь в течение 3,5 ч (через 2 ч после начала кипячения для подавления пенообразования в реакционную смесь добавляют 1-бутанол (10 мл), реакционную смесь охлаждают. Образовавшийся осадок отделяют фильтрованием. Осадок суспендируют в 5 % растворе гидроксида натрия в воде (200 мл), перемешивают в течение 1 ч, после чего отделяют фильтрованием (данную операцию повторяют трижды). Выделенный осадок суспендируют в воде (200 мл) и подкисляют концентрированной соляной кислотой (50 мл, 60,0 г, 0,6 моль). Выпавший осадок отделяют фильтрованием, промывают на фильтре водой (3×100 мл) и сушат в вакууме. Продукт получают в виде кристаллов бледно-кремового цвета (8,46 г, 18 %).

Спектр ЯМР ^1H (CDCl_3), δ , м.д. (J, Гц): 3,87 (3H, CH_3O -), 3,95 (3H, CH_3O -), 4,05 (3H, CH_3O -), 5,5 (уш.с, 1H, HO-Ar), 7,17 (с, 1H, H-Ar), 10,31 (с, 1H, CO_2H). По

Таблица 1

Структура и свойства исследуемых N,N' -замещенные пиперазинов

| Соединение | Структурная формула | Молек. масса | lgP | pKa |
|------------|---------------------|--------------|-------|-------|
| I | | 410,15 | 0,2 | 11,55 |
| II | | 452,50 | 1,42 | 11,53 |
| III | | 474,49 | -0,36 | 11,51 |

данным спектроскопии ЯМР ^1H и ТСХ степень чистоты кислоты VI — 99,5 %.

Метил-2-гидрокси-3,4,5-триметоксибензоат (VII). К кипящему раствору кислоты VI (18,2 г, 0,080 моль) в ацетоне (150 мл) прибавляют при перемешивании порциями безводный карбонат натрия (20,4 г, 0,192 моль), а затем диметилсульфат (9,1 мл, 12,1 г, 0,096 моль). Реакционную смесь кипят с обратным холодильником при перемешивании в течение 3 ч. Осадок неорганических солей отделяют от охлажденной реакционной смеси фильтрованием. Фильтрат упаривают на ротационно-пленочном испарителе при пониженном давлении. Полученный остаток растворяют в этилацетате (200 мл) и последовательно промывают насыщенным раствором гидрокарбоната натрия в воде (2 × 50 мл), водой (2 × 50 мл) и насыщенным раствором хлорида натрия (50 мл), сушат над безводным сульфатом магния. Осушитель отделяют фильтрованием, фильтрат упаривают на ротационно-пленочном испарителе при пониженном давлении, остаток перекристаллизовывают из гептана. Эфир VII получают в виде крупных кристаллов песочного цвета (11,6 г, 60 %). Спектр ЯМР ^1H (CDCl_3), δ , м.д. (J, Гц): 3,84 (с, 3H, $\text{CH}_3\text{O}_2\text{C}$ -), 3,93 (3H, CH_3O -), 3,95 (3H, CH_3O -), 4,01 (3H, CH_3O -), 7,08 (с, 1H, H-Ar), 10,68 (с, 1H, HO-Ar).

Метил-2-(1-метилпропил)окси-3,4,5-триметоксибензоат (VIII). Растворяют эфир VII (4,95 г, 0,020 моль), 2-бромбутан (2,74 мл, 3,43 г, 0,025 моль), безводный карбонат калия (4,15 г, 0,030 моль) и калия йодид (0,33 г, 0,002 моль) в *N,N*-диметилформамиде (ДМФА) (15 мл). Реакционную смесь нагревают при перемешивании при температуре 65 °С в течение 5 ч. Охлажденную смесь выливают в воду (50 мл), подкисляют концентрированной соляной кислотой (20 мл, 24 г, ~ 0,240 моль) и экстрагируют *трет*-бутилметилловым эфиром (3 × 25 мл). Объединенные эфирные экстракты последовательно промывают водой (2 × 30 мл), насыщенным раствором гидрокарбоната натрия в воде (2 × 30 мл), 10 % раствором тиосульфата натрия в воде (2 × 20 мл) и насыщенным раствором хлорида натрия (30 мл), сушат над безводным хлористым кальцием. Осушитель отделяют фильтрованием, фильтрат упаривают на ротационно-пленочном испарителе при пониженном давлении. Полупродукт получают в виде желтого масла (5,90 г, 97 %) и используют на следующей стадии без дополнительной очистки.

2-(1-Метилпропил)окси-3,4,5-триметоксибензойная кислота (IX). К раствору метилового эфира VIII (5,90 г, 0,020 моль) в 95 % водном этаноле (20 мл) прибавляют гидроксид калия (1,40 г, 0,025 моль). Реакционную смесь кипятят с обратным холодильником при перемешивании в течение 1 ч, упаривают на ротационно-пленочном испарителе при пониженном давлении. Полученный остаток кипятят в диэтиловом эфире (50 мл). Осадок выделяют фильтрованием охлажденной суспензии, промывают на фильтре диэтиловым эфиром (40 мл) и сушат на воздухе. Полученный осадок кремового цвета растворяют в воде (50 мл), подкисляют концентрированной соляной кислотой (3 мл,

3,6 г, 0,036 моль) и экстрагируют диэтиловым эфиром (2 × 25 мл). Объединенные эфирные экстракты промывают водой (2 × 20 мл), насыщенным раствором хлорида натрия (20 мл) и сушат над безводным сульфатом магния. Осушитель отделяют фильтрованием, фильтрат упаривают на ротационно-пленочном испарителе при пониженном давлении. Полупродукт получают в виде жидкости желтого цвета (5,17 г, 89 %) и используют на следующей стадии без дополнительной очистки. Спектр ЯМР ^1H (CDCl_3), δ , м.д. (J, Гц): 1,06 (т, 3H, 6 Гц, $\text{CH}_3\text{CH}_2\text{C} \cdot \text{HCH}_3$), 1,29 (д, 3H, 6 Гц, $\text{CH}_3\text{CH}_2\text{C} \cdot \text{HCH}_3$), 1,8 (м, 2H, $\text{CH}_3\text{CH}_2\text{C} \cdot \text{HCH}_3$), 3,90 (с, 6H, 2x CH_3O -), 4,00 (с, 3H, CH_3O -), 4,73 (м, 1H, $\text{CH}_3\text{CH}_2\text{C} \cdot \text{HCH}_3$), 7,45 (с, 1H, H-Ar), 11,56 (ш.с 1H, CO_2H). Спектр ЯМР ^{13}C (CDCl_3), δ , м.д.: 9,92 ($\text{CH}_3\text{CH}_2\text{C} \cdot \text{HCH}_3$), 19,01 ($\text{CH}_3\text{CH}_2\text{C} \cdot \text{HCH}_3$), 29,54 ($\text{CH}_3\text{CH}_2\text{C} \cdot \text{HCH}_3$), 56,19 (CH_3O -), 61,22 (CH_3O -), 61,33 (CH_3O -), 83,51 ($\text{CH}_3\text{CH}_2\text{C} \cdot \text{HCH}_3$), 108,00 (C1, Ar), 117,20 (C6, Ar), 144,49 (C2, Ar), 145,96 (C5, Ar), 147,92 (C3, Ar), 149,70 (C4, Ar), 165,36 (CO_2H). По данным спектроскопии ЯМР ^1H и ТСХ степень чистоты кислоты VIII составляет 99,8 %.

2-(1-Метилпропил)окси-3,4,5-триметоксибензоилхлорид (X). К раствору кислоты IX (5,0 г, 0,018 моль) в хлористом метиле (25 мл) добавляют хлористый тионил (2,50 мл, 4,18 г, 0,035 моль) и ДМФА (0,01 мл). Смесь перемешивают при комнатной температуре в течение 1 ч, далее кипятят с обратным холодильником в течение 2 ч и упаривают на ротационно-пленочном испарителе при пониженном давлении. Полупродукт получают с количественным выходом (5,32 г, 100 %) в виде масла желтого цвета и используют на следующей стадии без дополнительной очистки.

1-(*трет*-Бутоксикарбонил)-4-(2-[1-метилпропил]окси-3,4,5-триметоксибензоил)пиперазин (XI). К раствору 1-(*трет*-бутоксикарбонил)пиперазина (3,76 г, 0,020 моль) и триэтиламина (4,20 мл, 3,02 г, 0,030 моль) в хлористом метиле (25 мл) при перемешивании добавляют по каплям раствор X (5,32 г, 0,018 моль) в хлористом метиле (25 мл), после чего реакционную смесь перемешивают в течение 3 ч, фильтруют, отделяя выпавший осадок гидрохлорида триэтиламина. Фильтрат последовательно промывают водой (2 × 20 мл), насыщенным раствором хлористого аммония (2 × 20 мл), водой (2 × 20 мл), насыщенным

Таблица 2
Параметры активации компонента человека в присутствии *N,N'*-замещенных пиперазинов, в % к контролю (физиологический раствор)

| Соединение | Концентрация, мМ | | | | | |
|------------|------------------|---------|-------------|---------|-------------|---------|
| | 0,15 (n = 5) | | 0,6 (n = 5) | | 1,5 (n = 5) | |
| | T-lag | V | T-lag | V | T-lag | V |
| I | 101 ± 10 | 102 ± 6 | 99 ± 9 | 107 ± 7 | 110 ± 10 | 99 ± 5 |
| II | 97 ± 11 | 101 ± 4 | 104 ± 16 | 101 ± 3 | 110 ± 14 | 98 ± 12 |
| III | 99 ± 13 | 106 ± 9 | 107 ± 12 | 100 ± 7 | 105 ± 10 | 103 ± 7 |

раствором гидрокарбоната натрия (2 × 20 мл), насыщенным раствором хлорида натрия (20 мл) и сушат над безводным сульфатом магния. Сушитель отделяют фильтрованием, фильтрат упаривают на ротационно-пленочном испарителе при пониженном давлении. Полупродукт получают с количественным выходом (7,95 г, 100 %) в виде масла желто-коричневого цвета, которое медленно кристаллизуется при стоянии в кристаллы кремового цвета, и используют на следующей стадии без дополнительной очистки. Спектр ЯМР ¹H (CDCl₃), δ, м.д. (J, Гц) (из-за затрудненного вращения вокруг амидной связи в ЯМР-спектре проявляются 2 изомера): 0,87 и 1,01 (два т., 7,4 и 7,6 Гц соответственно, суммарно 3H, CH₃CH₂C · HCH₃), 1,09 и 1,27 (два д, 5,9 и 5,9 Гц соответственно, 3H, CH₃CH₂C · HCH₃), 1,49 (с, 9H, (CH₃)₃C-), 1,66 (м, 2H, CH₃CH₂C · HCH₃), 3,0 – 4,0 (м, 17H, 4×CH₂-пиперазинового фрагмента и 3×CH₃O-), 4,19 (м, 1H, CH₃CH₂C · HCH₃), 6,60 и 6,62 (два с, суммарно 1H, H-Ar).

Гидрохлорид 1-(2-[1-метилпропил]окси-3,4,5-триметоксибензоил)пиперазина (XII). Смешивают основание XI (7,95 г, 0,018 моль) с концентрированной соляной кислотой (50 мл, 60,0 г, ~ 0,6 моль). Реакционную смесь перемешивают при комнатной температуре до полной гомогенизации (3 ч), упаривают на ротационно-пленочном испарителе при пониженном давлении. Остаток нагревают с 2-пропанолом (100 мл), после чего отделяют нерастворимые примеси фильтрованием через целит. Фильтрат упаривают на ротационно-пленочном испарителе при пониженном давлении. Полученный полупродукт XII (6,63 г, 97 %) используют на следующей стадии без дополнительной очистки.

1-Карбимидамидо-4-(2-[1-метилпропил]окси-3,4,5-триметоксибензоил)пиперазина ацетат (XIII). К раствору гидрохлорида XII (6,48 г, 17 ммоль) и гидрохлорида 1H-пиразол-1-карбоксимидамида (3,66 г, 25 ммоль) в ДМФА (20 мл), нагретому до температуры 50 °С, прибавляют диизопропилэтиламин (8,00 мл, 5,92 г, 46 ммоль), смесь перемешивают при температуре 50 °С в течение 10 ч, упаривают на ротационно-пленочном испарителе при пониженном давлении. Остаток растворяют в воде (120 мл) и экстрагируют *трет*-бутилметиловым эфиром (3 × 30 мл). Органические экстракты отбрасывают. Прозрачный водный слой подщелачивают 50 % раствором гидроксида натрия в воде (35 мл) и экстрагируют хлористым метиленом (3 × 30 мл). Объединенные органические экстракты промывают водой (2 × 20 мл), сушат над безводным карбонатом калия, сушитель отделяют фильтрованием. Фильтрат упаривают на ротационно-пленочном испарителе при пониженном давлении. Остаток, представляющий собой 1-карбимидамидо-4-(2-[1-метилпропил]окси-3,4,5-триметоксибензоил)пиперазин (3,90 г, 10 ммоль), растворяют в хлористом метиле (20 мл), к раствору прибавляют ледяную уксусную кислоту (0,56 мл, 0,59 г, 10 ммоль). Образовавшийся осадок отделяют фильтрованием, последовательно промывают на фильтре хлористым метиленом

(2 × 5 мл) и *трет*-бутилметиловым эфиром (3 × 10 мл), после чего осадок суспендируют в смеси ацетона (20 мл) и воды (2 мл). Полученную суспензию кипятят с обратным холодильником при перемешивании в течение 1 ч, охлаждают. Осадок отделяют фильтрованием, промывают на фильтре ацетоном (2 × 5 мл) и сушат в вакууме. Продукт XIII получают в виде мелких бесцветных кристаллов (4,00 г, 53 %). Спектр ЯМР ¹H (DMSO-d₆), δ, м.д. (J, Гц): 0,90 (т, 3H, 6 Гц, CH₃CH₂C · HCH₃), 1,09 (д, 3H, 6 Гц, CH₃CH₂C · HCH₃), 1,64 (м, 5H, CH₃CH₂C · HCH₃ и CH₃CO₂-), 3,0 – 4,0 (м, 17H, 4×CH₂-пиперазинового фрагмента и 3×CH₃O-), 4,12 (м, 1H, CH₃CH₂C · HCH₃), 6,62 (с, 1H, H-Ar), 8,20 (уш. с, 4H, C(NH₂)(N⁺H₂)). Спектр ЯМР ¹³C (DMSO-d₆), δ, м.д.: 10,31 (CH₃CH₂C · HCH₃), 20,02 (CH₃CH₂C · HCH₃), 25,83 (CH₃CO₂-), 30,16 (CH₃CH₂C · HCH₃), 41,50 (CH₂-пиперазинового фрагмента), 45,05 (CH₂-пиперазинового фрагмента), 45,63 (CH₂-пиперазинового фрагмента), 46,27 (CH₂-пиперазинового фрагмента), 56,99 (CH₃O-), 61,49 (CH₃O-), 61,72 (CH₃O-), 81,38 (CH₃CH₂C · HCH₃), 106,84 (C6, Ar), 126,32 (C1, Ar), 141,43 (C2, Ar), 144,31 (C5, Ar), 147,59 (C4, Ar), 150,18 (C3, Ar), 158,42 (C(NH₂)(N⁺H₂)), 167,44 (CON), 176,66 (CH₃CO₂H). Чистота по данным ВЭЖХ составляла 99,6 %, максимальная неидентифицированная примесь — 0,1 %, сумма неидентифицированных примесей — 0,3 %.

1-Карбимидамидо-4-(2-[1-метилпропил]окси-3,4,5-триметоксибензоил)пиперазина гемифумарат (II). Ацетат XIII (3,5 г, 7,7 ммоль) растворяют в горячей воде (10 мл, ~ 60 °С). К полученному раствору прибавляют горячий (~ 60 °С) раствор фумаровой кислоты (0,45 г, 3,85 ммоль) в воде (5 мл). Образовавшийся осадок отделяют фильтрованием, промывают на фильтре водой (3 × 5 мл), перекристаллизовывают из горячей воды. Получают гемифумарат II в виде бесцветных кристаллов (3,21 г, 92 %).

Спектр ЯМР ¹H (DMSO-d₆), δ, м.д. (J, Гц): 0,92 (т, 3H, 6 Гц, CH₃CH₂C · HCH₃), 1,11 (д, 3H, 6 Гц, CH₃CH₂C · HCH₃), 1,66 (м, 2H, CH₃CH₂C · HCH₃), 3,0 – 4,0 (м, 17H, 4×CH₂-пиперазинового фрагмента и 3×CH₃O-), 4,15 (м, 1H, CH₃CH₂C · HCH₃), 6,20 (с, 1H, HO₂CCH=CHCO₂H), 6,61 (с, 1H, H-Ar), 8,30 (ш.с, 4H, C(NH₂)(N⁺H₂)). Спектр ЯМР ¹³C (DMSO-d₆), δ, м.д.: 10,41 (CH₃CH₂C · HCH₃), 20,12 (CH₃CH₂C · HCH₃), 30,22 (CH₃CH₂C · HCH₃), 41,51 (CH₂-пиперазинового фрагмента), 45,15 (CH₂-пиперазинового фрагмента), 45,66 (CH₂-пиперазинового фрагмента), 46,37 (CH₂-пиперазинового фрагмента), 57,00 (CH₃O-), 61,59 (CH₃O-), 61,75 (CH₃O-), 81,40 (CH₃CH₂C · HCH₃), 106,88 (C6, Ar), 126,33 (C1, Ar), 136,55 (HO₂CCH=CHCO₂H), 141,45 (C2, Ar), 144,32 (C5, Ar), 147,60 (C4, Ar), 150,21 (C3, Ar), 158,44 (C(NH₂)(N⁺H₂)), 167,41 (CON), 172,13 (HO₂CCH=CHCO₂H). Масс-спектр: MH⁺ найдено — 395,22, MH⁺ вычислено — 395,23. Чистота продукта по данным ВЭЖХ 99,7 %, максимальное содержание неидентифи-

фицированной примеси — 0,1 %, сумма неидентифицированных примесей — 0,2 %.

1-Карбимидамо-4-(3,4,5-триметоксифенилсульфонил)пиперазина фумарат (III). 1-Карбимидамо-4-(3,4,5-триметоксифенилсульфонил)пиперазина гидрохлорид (5 г, 12,7 ммоль), полученный как описано нами ранее [3], обрабатывают 50 % раствором гидроксида натрия в воде (35 мл) и экстрагируют хлористым метилом (3 × 30 мл). Объединенные органические экстракты промывают 20 мл воды, сушат над безводным карбонатом калия, осушитель отделяют фильтрованием. Фильтрат упаривают на ротационно-пленочном испарителе. Остаток растворяют в воде, добавляют фумаровую кислоту (1,47 г, 12,7 ммоль), воду удаляют на ротационно-пленочном испарителе при пониженном давлении. Полученный остаток суспендируют в смеси ацетона (40 мл) и воды (2 мл), суспензию кипятят с обратным холодильником при перемешивании в течение 1 ч, охлаждают. Осадок отделяют фильтрованием, промывают на фильтре ацетоном (2 × 10 мл), сушат в вакууме. Продукт получают в виде мелких бесцветных кристаллов (3,3 г, 55 %).

Спектр ЯМР ^1H (DMSO-d_6), δ , м.д. (J, Гц): 3,03 (4H, м, $2 \times \text{CH}_2$ -пиперазинового фрагмента), 3,50 (4H, м, $2 \times \text{CH}_2$ -пиперазинового фрагмента), 3,77 (с, 3H, $\text{CH}_3\text{O-}$), 3,88 (с, 6H, $2 \times \text{CH}_3\text{O-}$), 6,41 (с, 2H, $\text{HO}_2\text{CCH}=\text{CHCO}_2\text{H}$), 6,89 (с, 2H, H-Ar), 8,50 (уш.с, 5H, $\text{C}(\text{NH}_2)(\text{N}^+\text{H}_2)$). Спектр ЯМР ^{13}C (DMSO-d_6), δ , м.д.: 44,18 (CH_2 -пиперазинового фрагмента), 45,22 (CH_2 -пиперазинового фрагмента), 56,36 ($2 \times \text{CH}_3\text{O-}$), 104,97 (C2, Ar), 129,56 (C1, Ar), 135,34 ($\text{HO}_2\text{CCH}=\text{CHCO}_2\text{H}$), 141,36 (C4, Ar), 153,12 (C3, Ar), 156,92 ($\text{C}(\text{NH}_2)(\text{N}^+\text{H}_2)$), 168,63 ($\text{HO}_2\text{CCH}=\text{CHCO}_2\text{H}$). Масс-спектр: MH^+ найдено – 358,15, MH^+ вычислено – 358,13. Чистота по данным ВЭЖХ – 99,7 %, максимальная неидентифицированная примесь – 0,1 %, сумма неидентифицированных примесей – 0,2 %.

В качестве показателя гидрофобности синтезированных соединений использовали значение lgP (логарифм отношения концентраций неионизованного соединения в системе октанол — вода), в качестве показателя основности — значение pKa (табл. 1). Расчет значений pKa проводили по программе, приведенной на сервере www.chemicalize.org (chemAxon), lgP — по программе, приведенной на сервере <http://www.organic-chemistry.org/prog/peo/> (OSIRIS Property Explorer).

Экспериментальная биологическая часть

В работе использована кровь практически здоровых людей (20 – 30 лет) и кроликов (2,5 – 3,0 кг, питомник “Рапполово”).

Эритроциты получали из цитратной крови центрифугированием при 1500 об/мин в течение 10 мин с последующим трехкратным отмыванием физиологическим раствором. Далее клетки стабилизировали не менее 1 сут при 4 °С в реактиве Олсвера. Перед использованием эритроциты трижды отмывали от реактива

физиологическим раствором и готовили стандартную взвесь клеток в 5 мМ вероналово-мединаловом буфере (pH 7,4). Оптическая плотность стандартной взвеси после разведения ее в 8 раз буферным раствором составляла ($0,560 \pm 0,020$) при 800 нм. Измерения проводили на спектрофотометре СФ 2000 (ЛОМО) в кювете с длиной оптического слоя 5 мм. Полученную стандартную взвесь клеток использовали в исследованиях.

Регистрацию цитолитической активности соединений осуществляли в термостатируемой кювете (длина оптического слоя 5 мм) спектрофотометра при 37 °С, в которую вносили раствор исследуемого соединения (от 0,01 до 0,2 мл), предварительно разведенного в физиологическом растворе. Объем смеси доводили вероналово-мединаловым буфером до 0,7 мл. После прогревания в течение 3 мин в смесь добавляли 0,1 мл стандартной взвеси эритроцитов. Регистрировали снижение оптической плотности взвеси при 800 нм через 5-секундные интервалы до полного гемолиза.

Антиоксидантные свойства соединений оценивали с использованием устройства для исследования фотоиндуцированного цитолиза по методике, опубликованной ранее [7]. Согласно этой методике в экранированной кювете с длиной оптического слоя 5 мм готовили инкубационную смесь, содержащую 0,1 мл стандартной взвеси эритроцитов, вероналово-мединаловый буферный раствор (pH 7,2 – 7,4), разные количества исследуемых соединений, фотосенсибилизатор радахлорин (0,35 % раствор для внутривенного введения, ООО “РАДАФАРМА”, Россия), основной субстанцией которого является (7S,8S)-13-винил-5-(карбоксиметил)-7-(2-карбоксиил)-2,8,12,17-тетраметил-18-этил-7H,8H-порфирин-3-карбоновая кислота. В контроле вместо исследуемого препарата добавляли физиологический раствор. Конечная концентрация радахлорина в пробе составляла 6,25 мкг/мл. Инкубационную смесь общим объемом 0,8 мл термостатировали в кюветном отсеке спектрофотометра в течение 3 мин при 37 °С и постоянном перемешивании, затем облучали источником монохроматического света (красный светодиод 653 нм, выходная мощность — 12 мВт, доза облучения — 1,4 Дж/см²). После завершения облучения регистрировали снижение оптической плотности раствора при 750 нм.

По регистрируемой гемолитической кривой, имеющей плавный S-образный характер, с помощью программного обеспечения компьютера определяли T_{50} — время от завершения облучения до лизиса 50 % эритроцитов инкубационной смеси [7]. По изменению величины T_{50} судили о скорости гемолитического процесса.

Регистрацию комплементзависимого гемолиза осуществляли в термостатируемой при 37 °С кювете спектрофотометра (длина оптического слоя 5 мм), в которую добавляли 0,05 мл сыворотки крови человека, и доводили объем до 0,7 мл с помощью 5 мМ вероналово-мединалового буфера (pH 7,4). После термостатирования смеси в течение 3 мин в нее добавляли 0,1 мл стандартной взвеси эритроцитов кролика. Реги-

стрировали снижение оптической плотности взвеси при 800 нм через 5-секундные интервалы. По гемолитическим кривым определяли параметры комплемент-зависимого гемолиза, а именно: продолжительность индукционного периода (T-lag) в секундах и скорость гемолиза (V), выраженную в миллионах эритроцитов, лизированных за 1 мин [8].

При изучении влияния исследуемого соединения на комплементзависимый гемолиз в инкубационную систему добавляли разные количества соединения в физиологическом растворе. В качестве контроля в инкубационную смесь добавляли такое же количество физиологического раствора.

Результаты и их обсуждение

N,N'-замещенные пиперазины (табл. 1) представляют собой основные соединения, гидрофобность (lgP) которых возрастает в порядке III, I, II. По основности (pKa) соединения практически не различались.

Все соединения в исследованном диапазоне концентраций (0,15 – 3,0 мМ) не вызывали лизиса эритроцитов человека.

Известно [9], что лизис эритроцитов инициируется облучением ультрафиолетовым или видимым светом в присутствии фотосенсибилизаторов, наиболее эффективными из которых являются порфирины и их производные [10], в частности — радахлорин. Выяснено, что фотодинамический эффект обусловлен прежде всего генерацией синглетного кислорода, а затем и других активных форм кислорода [11]. Связывание порфиринов с мембранами клеток приводит к снижению фотостабильности мембран [10, 12].

N,N'-замещенные пиперазины I, II и III статистически значимо, по сравнению с контролем, ингибировали гемолиз, индуцированный радахлорином, что проявлялось в увеличении времени гемолиза 50 % эритроцитов (T_{50}) (рисунок).

Как видно из полученных результатов, ингибирующая активность всех 3 соединений носит полиномиальный, дозозависимый характер. EC_{50} для II, I и III составляет 1,0, 1,6 и 2,3 мМ соответственно. Сравнение физико-химических свойств и активности (табл. 1, рис. 1) позволяет полагать, что активность соединений при ингибировании фотоиндуцированного гемолиза возрастает по мере увеличения гидрофобности соединений и количества алкоксильных заместителей в ароматическом цикле.

Чтобы выяснить, является причиной торможения гемолиза *N,N'*-замещенными пиперазинами их антиоксидантный эффект или мембранопротекторные свойства, исследовано влияние соединений на комплементзависимый гемолиз (табл. 2).

Комплементзависимый гемолиз протекает без участия активных форм кислорода. Активация системы комплемента, вызванная чужеродными агентами (эритроцитами кролика) приводит к образованию комплексов мембранной атаки, которые внедряются в мембраны чужеродных клеток, вызывая лизис [13].

Исследования влияния соединений на комплементзависимый гемолиз не выявили изменений ни T-lag, ни скорости (V) процесса гемолиза.

Полученные результаты указывают на наличие первичной антиоксидантной активности у всех исследованных *N,N'*-замещенных пиперазинов, проявляющейся в торможении окислительных процессов на уровне мембран при фотодинамическом воздействии на эритроциты.

Антиоксидантная активность *N,N'*-замещенных пиперазинов, изучаемых в настоящей работе, может быть обусловлена наличием 3 (соединение III) или 4 (соединения I и II) алкоксильных групп в ароматическом цикле (табл. 1). Более высокая антиоксидантная активность II по сравнению с I и III, может быть связана с тем, что введение *втор-*бутоксильного заместителя в ароматический цикл молекулы приводит к усилению гидрофобных и мембранотропных свойств соединения и, как следствие, к увеличению антиоксидантной активности.

Известно, что соединения, содержащие в структуре ароматические циклы с алкоксильными заместителями, например, триметоксибензойная кислота, являются ловушками радикалов [14].

Экспериментально показано, что цитопротективная активность триметазида (1-(2,3,4-триметоксибензил)пиперазина гидрохлорид) [15] обусловлена его способностью быть ловушкой свободных радикалов.

Антиоксидантные свойства подтверждены также для замещенных *N*-(арилоксиэтил)-*N'*-(2-метоксифенил)пиперазинов [16].

Используемый нами метод дает возможность судить о механизме антиоксидантного действия соединений на основании угнетения лизиса эритроцитов, вследствие окислительной фотодеградации компонентов мембран в присутствии радахлорина [17].

Результаты исследования позволяют сделать заключение о наличии антиоксидантной активности у всех протестированных *N,N'*-замещенных пиперазинов, обуславливающей, по-видимому, защиту мембран эритроцитов от повреждения активными формами кислорода.

Все исследованные соединения *N,N'*-замещенных пиперазинов в диапазоне концентраций 0,15 – 3,00 мМ не оказывали гемолитического действия на кровь доноров. На моделях индуцированного гемолиза установлено, что все соединения замедляют процесс фотогемолиза и не влияют на гемолиз, вызываемый активацией системы комплемента. Активность соединений не связана с прямым мембранопротекторным эффектом. Основываясь на механизме фотоиндуцированного гемолиза, можно полагать, что изученные *N,N'*-замещенные пиперазины защищают клетки от лизиса вследствие их антиоксидантного действия, проявляющегося при взаимодействии с мембранами клеток. Наибольший защитный эффект характерен для соединения II.

ЛИТЕРАТУРА

1. C. P. Meher, A. M. Rao, and Md. Omar, *Asian. J. Pharm. Sci. Res.*, **3**(1), 43 – 60 (2013).
2. A. Tomar, M. Mall, M. Verma, *Int. J. Res. Ayurveda Pharm.*, **2**(5), 1547 – 1548 (2011).
3. Патент РФ № 2 469 029 (2010); О. С. Веселкина, Н. Б. Викторов, Н. Н. Петрищев, Ю. В. Поплавская, *Бюл. изобрет.*, № 34 (2012).
4. J. A. Stockman III, B. Lubin, and F. A. Oski, *Pediat. Res.*, **12**, 927 – 931 (1978).
5. F. M. Poulet, K. Penraat, N. Collins, et al., *Toxicol. Pathol.*, **38**, 907 – 922 (2010).
6. R. B. Silverman, *Organic Chemistry of Drug Design and Drug Action*, Elsevier (2004), pp. 17 – 86.
7. <http://bankpatentov.ru/node/204090>
8. Л. В. Галевская, Е. В. Рюмина, Ю. В. Тарасова и др., *Клин. и лаб. диагн.*, № 3, 47 – 49 (2001).
9. S. Kumar, S. Devi, P. Misra, et al, *Ind. J. Exp. Biol.*, **47**, 906 – 910 (2009).
10. M. O. Senge and J. C. Brand, *Photochem. Photobiol.*, **87**, 1240 – 1296 (2011).
11. S. Sandberg and I. Romslo, *Clin. Chim. Acta*, **109**(2), 193 – 201 (1981).
12. W. An, Y. Jiao, C. Dong, et al., *Dyes Pigments*, **81**(1), 1 – 9 (2009).
13. D. W. Michaels, A. S. Abramovitz, C. H. Hammer, et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **73**(8), 2852 – 2856 (1976).
14. L. Lagnika, F. Gbaguidi, E. Anago, et al, *Int. J. Biol. Chem. Sci.*, **4**(3), 820 – 824 (2010).
15. I. Maridonneau-Parini and C. Harpey, *Br. J. Clin. Pharmacol.*, **20**, 148 – 151 (1985).
16. A. Pietrzyka, M. Stepniewski, A. Waszkielewicz, et al., *Acta Poloniae Pharmaceutica — Drug Res.*, **63**(1), 19 – 24 (2006).
17. Л. В. Галевская, И. Л. Соловцова, Е. В. Рюмина и др., *Ученые записки СПбГМУ им. акад. И. П. Павлова*, **XVI**(4), 45 – 47 (2009).

Поступила 11.06.14

THE INFLUENCE OF *N,N'*-SUBSTITUTED PIPERAZINES ON CYTOLYSIS

O. S. Veselkina¹, I. L. Solovtsova^{2,3}, N. N. Petrishchev², L. V. Galebskaya², M. E. Borovitev¹, D. I. Nilov¹, M. A. Solov'eva², E. A. Vorob'ev², and K. S. Len'shina²

¹ Vertex Company, St. Petersburg, 199106 Russia

² Pavlov First St. Petersburg State Medical University, St. Petersburg, 197022 Russia

³ Peter the Great St. Petersburg Polytechnic University, St. Petersburg, 195251 Russia

We have studied the hemolytic activity of *N,N'*-substituted piperazines and their influence on the hemolytic process initiated by irradiation (red LED, 653 nm) in the presence of radachlorine (Radafarma Co., Russia) photosensitizer and on the complement-dependent hemolysis. All compounds did not produce human RBC lysis in the concentration range 0.15 – 3.0 mM, but showed dose-dependent inhibition of photo-induced hemolysis, as manifested by an increase in the 50% lysis time. Piperazine derivatives did not change the parameters of complement dependent hemolysis. Since the photo-induced hemolysis is mediated by the formation of reactive oxygen species, it becomes evident that the action of *N,N'*-substituted piperazines is related to their antioxidant properties.

Keywords: *N,N'*-substituted piperazines; photo-induced hemolysis; photosensitizer; antioxidants; complement system.