

© Коллектив авторов, 2010

М. Г. Малакян<sup>1</sup>, С. А. Баджунян<sup>1</sup>, Л. А. Вардеванян<sup>1</sup>, О. А. Папоян<sup>2</sup>,  
А. У. Исаханян<sup>2</sup>, Г. А. Геворгян<sup>2</sup>

## АНТИОКСИДАНТНЫЕ И МЕМБРАНОСТАБИЛИЗИРУЮЩИЕ СВОЙСТВА ГИДРОХЛОРИДОВ 1-(4-ЗАМЕЩЕННЫХ ФЕНИЛ)-2Н-(ФЕНИЛ)-3-АМИНОПРОПАН-1-ОЛОВ *IN VITRO*

<sup>1</sup> Научный центр радиационной медицины и ожогов МЗ РА, Ереван, Армения, labbio@web.am;

<sup>2</sup> Институт тонкой органической химии им. О. Л. Мнджояна НАН РА, Ереван, Армения, gyulgev@gmail.com

В модельных системах *in vitro* исследованы антиоксидантные, мембраностабилизирующие свойства гидрохлоридов 1-(4-замещенных фенил)-2Н-(фенил)-3-аминопропан-1-олов. Согласно полученным данным впервые синтезированные вторичные аминопранолы не оказывают существенной антиоксидантной или антирадикальной активности ни в системе аскорбатзависимого Fe(II)-стимулируемого перекисного окисления, ни по методу, основанному на спектрофотометрическом мониторинге за уменьшением концентрации стабильного радикала 1,1-дифенил-2-пикрилгидразила, ни по фотохемилюминесцентному методу анализа. Однако на модели оксидативного стресса эритроцитов эти соединения проявляют выраженный антигемолитический эффект. Предполагается, что новые гидрохлориды 1-(4-замещенных фенил)-2Н-(фенил)-3-аминопропан-1-олов являются биологически активными соединениями со слабо выраженными антиоксидантными свойствами, способными оказывать мембраностабилизирующее действие за счет взаимодействия со структурными компонентами клеточных мембран.

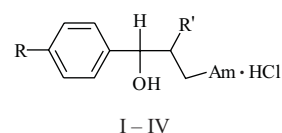
**Ключевые слова:** аминопранол-1-олы, антиоксидантная активность, мембраностабилизирующие свойства, эритроциты, гемолиз

Как известно, появление и развитие многих болезней связано с усиленной генерацией свободных радикалов [1] с параллельным уменьшением активности эндогенной антиоксидантной защиты организма, представленной как ферментативными, так и низкомолекулярными неферментативными антиоксидантами [2 – 4]. В результате развивается состояние оксидативного стресса, определяемого как дисбаланс между антиоксидантами и прооксидантами с превалированием последних, при котором организм не способен нейтрализовать формирующиеся в избыточном количестве агрессивные свободные радикалы. Негативное действие свободных радикалов проявляется в провоцировании воспалительных процессов в тканях, неправильном функционировании различных систем организма и ускорении старения, развитии диабета, неврологических нарушений, злокачественных новообразований и др. [5 – 8].

Рассматривая антиоксидантную способность как один из механизмов, лежащих в основе фармакологической активности [9], в исследованиях по скринингу биологически активных веществ среди синтезированных впервые соединений целесообразно проводить также изучение их антиоксидантных свойств в дополнение к другим методам тестирования.

С этой целью в Институте тонкой органической химии им. О. Л. Мнджояна НАН РА (Ереван) осуществ-

лен синтез гидрохлоридов 1-(4-замещенных фенил)-2Н-(фенил)-3-аминопропан-1-олов (I – IV) по [10] и в модельных системах *in vitro* исследованы антиоксидантная активность (АОА) и мембранотропные свойства этих соединений.



Ia: R = Br; Ib: R = CH<sub>3</sub>O; Iv: R = C<sub>2</sub>H<sub>5</sub>O; Ia, Ib, Iv: R' = H;

Iг: R = C<sub>2</sub>H<sub>5</sub>O; R' = C<sub>6</sub>H<sub>5</sub>; Am = 4-(2-фторфенилпиперазин);

Ид: R = Br, R' = H; Ие: R = i-C<sub>4</sub>H<sub>9</sub>O, R' = H; Am = 4-(2-метоксифенилпиперазин);

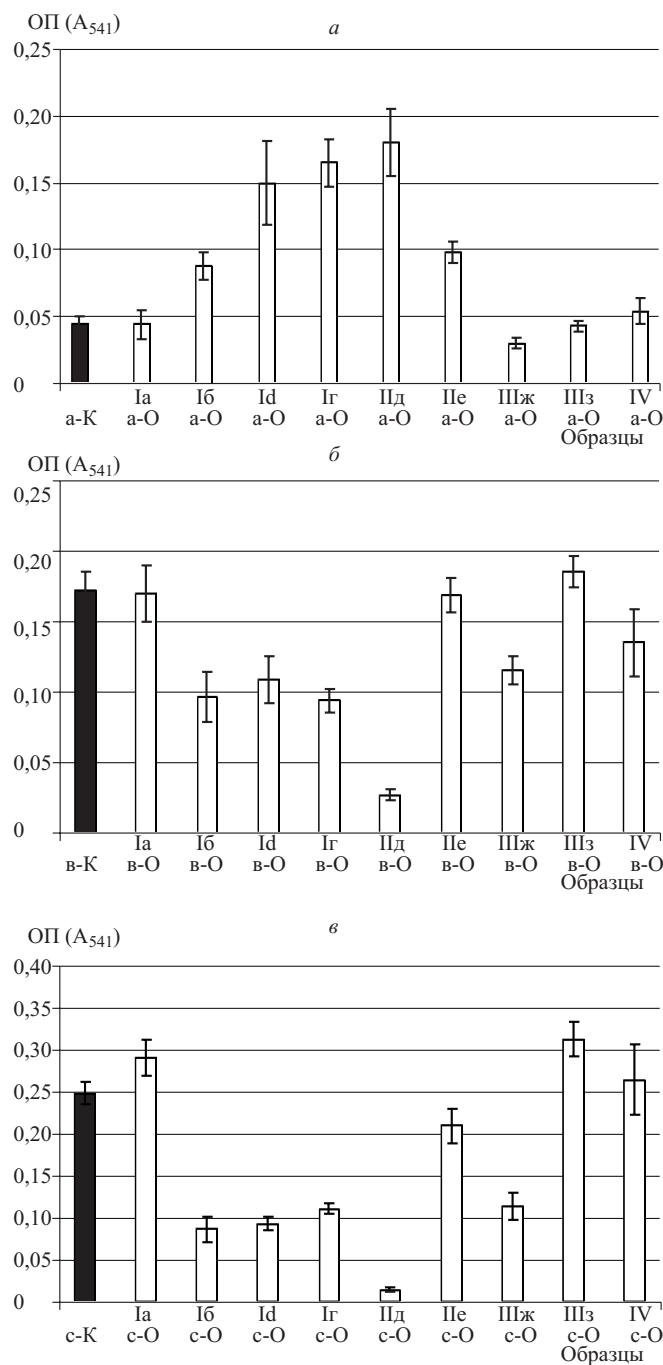
Иж: R = Cl, R' = H; Ииз: R = C<sub>2</sub>H<sub>5</sub>O, R' = H; Am = 4-метилпиперазин;

IV: R = CH<sub>3</sub>O; R' = H; Am = 4-метилпиперидин.

### Экспериментальная часть

АОА гидрохлоридов аминопранолов I – IV оценивали в модельных системах *in vitro* с использованием следующих методов:

1. В системе аскорбатзависимого Fe(II)-стимулируемого перекисного окисления — по степени подавления образования малонового диальдегида (МДА) в реакционной среде (в % по сравнению с контрольным образцом) [11]. Метод основан на способности к окислению кислородом воздуха в разбавленных водных растворах остатков олеиновой кислоты в составе тви-



Мембраностабилизирующее действие соединений I – IV: а) Оптическое поглощение  $A_{541}$  образцов суспензий эритроцитов как мера оценки степени гемолиза эритроцитов через 1 ч после инкубации при 37 °С: а) “а-К” —  $A_{541}$  контрольного образца суспензии эритроцитов без каких-либо включений; “а-О” —  $A_{541}$  опытных образцов в присутствии гидрохлоридов 1-(4-замещенных фенил)-2Н-(фенил)-3-аминопропан-1-олов в концентрации  $10^{-3}$  М. б) “б-К” —  $A_{541}$  контрольного образца суспензии эритроцитов после инкубации на фоне 0,015 %  $H_2O_2$ ; “б-О” —  $A_{541}$  опытных образцов в присутствии 0,015 %  $H_2O_2$  и  $10^{-3}$  М гидрохлоридов 1-(4-замещенных фенил)-2Н-(фенил)-3-аминопропан-1-олов. в) “с-К” —  $A_{541}$  контрольного образца в отсутствие вторичных аминопранолов; “с-О” —  $A_{541}$  опытных образцов, подвергнутых сочетанному воздействию  $H_2O_2$  и Х-лучей в условиях наличия в среде  $10^{-3}$  М гидрохлоридов 1-(4-замещенных фенил)-2Н-(фенил)-3-аминопропан-1-олов.

**Примечание:** ОП — оптическое поглощение  $A_{541}$  образцов суспензий эритроцитов как мера оценки степени гемолиза эритроцитов через 1 ч после инкубации при 37 °С

на-80 в присутствии кофакторов перекисного окисления – двухвалентного железа и аскорбиновой кислоты. Если изучаемое соединение по сравнению с контролем уменьшает содержание МДА более чем на 20 %, то можно считать его АОА существенной.

2. По методу, основанному на спектрофотометрическом мониторинге за уменьшением концентрации стабильного радикала 2,2-дифенил-1-пикрилгидразила (ДФПГ•,  $\lambda_{max} = 516$  нм) в метаноле под действием исследуемых соединений. Антирадикальную активность (АРА) оценивали по уменьшению оптической плотности раствора ДФПГ• при введении в среду возрастающих концентраций исследуемого вещества и вычисляли как  $1/C_{50}$ , где  $C_{50}$  — количество вещества в молях, необходимое для снижения начальной концентрации ДФПГ• на 50 % [12].

3. Используя фотохемиллюминесцентный метод анализа как чувствительный тест для обнаружения свободнорадикальной сквенджерной активности синтезированных соединений. В основе метода лежит антиоксидант-чувствительное ингибирование фотоиндуцированной хемиллюминесценции, сопровождающей окисление люминола [13, 14]. АОА гидрохлоридов 1-(4-замещенных фенил)-2Н-(фенил)-3-аминопропан-1-олов (I – IV) в концентрациях 1, 10 и 100 наномолей тестированы на аппарате PHOTOCHEM (AnalyticJena, Germany). Все измерения и программную обработку данных проводили автоматически сразу же после ввода образцов в прибор и включения режима “Измерение”. АОА соединений оценивали по степени подавления фотоиндуцированной хемиллюминесценции в сравнении с тролоксом как стандартом и выражали в единицах, эквивалентных количеству тролокса, проявляющего такую же активность (автоматически усредненные данные 3 экспериментов).

4. По способности веществ предотвращать  $H_2O_2$ -стимулированный, радиационно-усиленный гемолиз эритроцитов интактных крыс. Для этого под легким эфирным наркозом у животных получали пробы крови, в качестве антикоагулянта использовали гепарин. Двукратным последовательным центрифугированием при 3000 об/мин и отмыванием эритроцитов физиологическим раствором получали эритроцитарную массу. В 0,9 % растворе NaCl ресуспендировали 0,1 мл эритроцитарной массы (1 % гематокрит).

Для исследования свойств каждого соединения готовили следующие опытные (“О”) и контрольные (“К”) образцы:

“а-К”) суспензия эритроцитов в 0,9 % растворе NaCl без каких-либо включений;

“а-О”) введение исследуемого соединения в концентрации  $10^{-3}$  М в суспензию эритроцитов;

“б-К”) добавление перекиси водорода ( $H_2O_2$ ) в суспензионную среду в конечной концентрации 0,015 % с целью стимуляции гемолиза эритроцитов;

“б-О”) сочетанное введение в эритроцитарную суспензию 0,015 %  $H_2O_2$  и исследуемого соединения в концентрации  $10^{-3}$  М;

“с-К”) облучение суспензии эритроцитов (сразу после введения в среду  $H_2O_2$ ) рентгеновскими лучами в дозе 150 Гр для усиления  $H_2O_2$ -индуцированного оксидативного повреждения мембран эритроцитов: установка РУМ-17, напряжение 200 кВ, сила тока 20 мА, мощность дозы облучения 30 Гр/мин, расстояние от излучателя 0,5 см;

“с-О”) присутствие исследуемого соединения в концентрации  $10^{-3}$  М в суспензионной среде при комбинированном воздействии  $H_2O_2$  и ионизирующей радиации на образец.

После приготовления проб образцы инкубировали в течение 1 ч при 37 °С в условиях постоянного мягкого встряхивания. После инкубации образцы центрифугировали при 3000 об/мин для отделения надосадочной жидкости, содержащей вышедший из эритроцитов гемоглобин. На спектрофотометре СФ-46 (ЛОМО) определяли величину оптического поглощения супернатанта при длине волны 541 нм ( $A_{541}$ ). Проводили сравнительный анализ данных, полученных в контрольных и соответствующих опытных образцах с веществами. По наличию разницы в величине оптического поглощения в образцах судили об антигемолитической (или гемолитической) активности веществ. На основе полученных данных оценивали мембраностабилизирующее (или мембраноразрушающее) действие тестируемых соединений и их способность тушить свободные радикалы кислорода, индуцированные, в одном случае, в водной среде посредством только  $H_2O_2$ , в другом — комбинированным воздействием  $H_2O_2$  и ионизирующей радиации.

Все эксперименты были повторены по 3 раза для подтверждения постоянства полученного эффекта. Данные, характеризующие эффект, представлены в виде  $M \pm S. E.$

### Результаты и их обсуждение

Согласно полученным данным, в системе аскорбат-зависимого Fe(II)-катализируемого перекисного окисления липидов гидрохлориды 1-(4-замещенных фенил)-2Н-(фенил)-3-аминопропан-1-олов (I – IV) не проявляют существенной АОА.

Исследуемые вторичные аминоспирты обладают весьма слабой АРА: эти соединения не имеют достаточной активности для нейтрализации 50 % присутствующего в метаноле стабильного радикала ДФПГ., а снижают концентрацию ДФПГ• лишь до 70 – 80 % от исходной концентрации ДФПГ• в рабочем растворе, что не позволяет определить  $1/C_{50}$ .

При использовании фотохемилюминесцентного метода анализа выявлено, что только АОА исследуемых вторичных аминоспиртов в 6 – 10 раз ниже таковой Тролокса: в среднем, 10 наномолей количества каждого из изучаемых веществ производит такое же ингибирование детектируемого сигнала, как  $1,317 \pm 0,297$  наномолей тролокса.

Согласно результатам исследований, проведенных в четвертой модельной системе, после одночасовой ин-

кубации эритроцитов в физиологическом растворе в отсутствие каких-либо факторов воздействия (образцы “а-К”) фоновый уровень гемолиза (спонтанный гемолиз) характеризуется оптическим поглощением супернатанта, равным  $0,048 \pm 0,004$  (рисунок, а). Однако в условиях оксидативного стресса эритроцитов, вызванного, в одном случае, действием  $H_2O_2$  (образцы “b-К”), в другом — комбинированным воздействием  $H_2O_2$  и ионизирующей радиации (“с-К”), наблюдается многократное возрастание  $A_{541}$  вследствие деструкции эритроцитов и выхода гемоглобина в среду (рисунок, б). Соединения Ia, IIIж, IIIз и IV не проявляют мембранотропного эффекта и не вызывают нарушений в структурной организации мембран эритроцитов (о чем свидетельствуют или отсутствие изменений, или незначительные сдвиги в величине  $A_{541}$  надосадочной жидкости), тогда как соединения Ib, Iv, Ig, Id и оказывают детергентное действие на клеточные структуры, вызывая гемолиз эритроцитов (рис. 1, а).

В условиях  $H_2O_2$ -стимулированного оксидативного стресса эритроцитов соединения Ib, Iv, Ig, Id и IIIж в отличие от соединений Ia и IIа, проявляют выраженное антигемолитическое действие (рис. 1, средняя часть).

В образцах, подвергнутых комбинированному воздействию  $H_2O_2$  и ионизирующего излучения, соединения Ib, Iv, Ig, Id и IIIж оказывают выраженное антигемолитическое действие, тогда как на фоне соединений Ia, IIIз и IV наблюдается определенное усиление гемолитического разрушения эритроцитов (рис. 1, в).

Таким образом, результаты проведенных исследований дают основание полагать, что синтезированные вторичные аминоспирты обладают слабо выраженными антиоксидантными свойствами. Эти вещества могут проявлять также мембраностабилизирующее действие.

### ЛИТЕРАТУРА

1. B. Halliwell, J. M. C. Gutteridge, *Biochem. J.*, **219**, 1 – 14 (1984).
2. Priscilla M. Clarkson and Heather S. Thompson, *Am. J. Clin. Nutr.*, **72**(2), 637S – 646s (2000).
3. Ron Kohen, Abraham Nyska, *Toxicologic Pathology*, **30**(6), pp. 620 – 650 (2002).
4. Byung Pal Yu, *Phys. Rev.*, **74**(1), 139 – 162 (1994).
5. T. M. Hagen, S. Huang, J. Curnutte, et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **91**, 12808 – 12812 (1994).
6. P. J. Chowienczyk, S. E. Brett, N. K. Gopaul, et al., *Diabetologia*, **43**, 974 – 977 (2000).
7. B. Halliwell, *Free Radic. Biol. Med.*, **32**, 968 – 974 (2002).
8. S. Parthasarathy, N. Santanam, S. Ramachandran, O. Meilhack, *Free Radic. Res.*, **33**, 197 – 215 (2000).
9. Ashok K. Tiwari, *Antioxidants. Cur. Sci.*, **86**(8), 1092 – 1112 (2004).
10. А. У. Исаханян, А. Г. Агабабян, Г. А. Геворгян и др., *Хим. журн. Армении*, **48**(1 – 3), 139 – 144 (1995).
11. С. Г. Благородов, А. П. Шепелев, Н. А. Дмитриева и др., *Хим.-фарм. журн.*, **21**(3), 292 – 294 (1987).
12. W. Brand-Williams, M. E. Guvelier, C. Berset, *Lebensm. Wiss. Technol.*, **28**(1), pp. 25 – 30 (1995).
13. I. N. Popov, G. Lewin, *J. Biochem. Biophys. Methods*, **31**(1 – 2), 1 – 8 (1996).
14. I. Popov, G. Lewin, *Luminescence.*, **14**(3), 169 – 174 (1999).

## ANTIOXIDANT AND MEMBRANE-STABILIZING PROPERTIES OF HYDROCHLORIDES OF 1-(4-SUBSTITUTED PHENYL)-2H-(PHENYL)- 3-AMINOPROPAN-1-OLS *IN VITRO*

M. H. Malakyan<sup>1\*</sup>, S. A. Badzhinyan<sup>1</sup>, L. A. Vardevanyan<sup>1</sup>, O. A. Papoyan, A. U. Isakhanyan<sup>2\*\*</sup>, and G. A. Gevorgyan<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Scientific Center of Radiation Medicine and Burns, Ministry of Health of Armenia, Davidashen, P. O. Box 25, Yerevan 0048, Armenia;

<sup>2</sup> Institute of Fine Organic Chemistry, National Academy of Sciences of Armenia, Azatutyan str. 26, Yerevan 0048, Armenia; Phone

e-mail: \*labbio@web.am; \*\*gyulgev@gmail.com

Antioxidant and membrane stabilizing properties of hydrochlorides of 1-(4-substituted phenyl)-2-H(phenyl)-3-aminopropan-1-ols were studied on model systems *in vitro*. According to the results obtained, newly synthesized secondary aminopropanoles did not possess significant antioxidant or antiradical activity. This activity was observed neither in the system of Fe(II)-stimulated ascorbate-dependent peroxidation, nor by the method of spectrophotometric monitoring of a decrease in the concentration of stable 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl radical or by the photochemiluminescent method of analysis. However, these compounds caused a pronounced anti-hemolytic effect on the model of erythrocyte oxidative stress. It is suggested that the newly synthesized hydrochlorides of 1-(4-substituted phenyl)-2-H(phenyl)-3-aminopropan-1-ols are biologically active compounds with weakly expressed antioxidant properties, which are capable of producing a membrane stabilizing effect due to their interaction with some structural components of cell membranes.

**Key words:** 1-(4-substituted phenyl)-2H-(phenyl)-3-aminopropan-1-ols, antioxidant activity, membrane stabilizing properties, erythrocytes, hemolysis