

Н. В. Кандалицева<sup>1</sup>, О. И. Дюбченко<sup>1</sup>, Е. И. Терах<sup>1</sup>, А. Е. Просенко<sup>1</sup>,  
Я. Ш. Шварц<sup>2</sup>, М. И. Душкин<sup>2</sup>

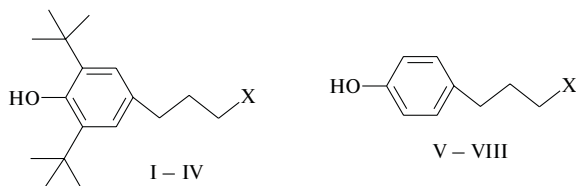
## АНТИОКИСЛИТЕЛЬНАЯ И ГЕПАТОПРОТЕКТОРНАЯ АКТИВНОСТЬ ВОДОРАСТВОРИМЫХ 4-ПРОПИЛФЕНОЛОВ, СОДЕРЖАЩИХ ГИДРОФИЛЬНЫЕ ГРУППЫ В АЛКИЛЬНОЙ ЦЕПИ

<sup>1</sup> Новосибирский государственный педагогический университет;

<sup>2</sup> НИИ Клинической иммунологии СО РАМН, Новосибирск

Одним из ведущих механизмов патогенеза токсических поражений печени является дестабилизация мембран гепатоцитов, обусловленная активизацией перекисного окисления липидов. При нарушениях функционального состояния печени выраженное защитное действие оказывают фенольные антиоксиданты (АО) —  $\alpha$ -токоферол [1], фенозан калия, синтетические производные оксикоричных кислот, ионол, убихинон и ряд других природных соединений [2]. По данным [3] производные коричных кислот превосходят  $\alpha$ -токоферол по гепатопротекторному действию. Высокая эффективность производных коричных кислот как гепатопротекторов может быть связана с их гидрофильностью, обуславливающей высокую скорость транспорта и биологическую доступность данных АО.

Настоящая работа посвящена сравнительному исследованию антиоксидантной активности и гепатопротекторных свойств новых водорастворимых производных 2,6-ди-*трет*-бутил-4-пропилфенола (I – IV) и их аналогов (V – VIII), не содержащих *трет*-бутильных групп:



X = SO<sub>3</sub>Na (I, V), SSO<sub>3</sub>Na (II, VI), SC(NH<sub>2</sub>)<sub>2</sub><sup>+</sup>Cl<sup>-</sup> (III, VII), N(C<sub>2</sub>H<sub>5</sub>)<sub>2</sub> · HCl (IV, VIII)

В качестве эталонов сравнения использовали 2,6-ди-*трет*-бутил-4-метилфенол (ионол, Acros Organics, USA),  $\beta$ -(3,5-ди-*трет*-бутил-4-гидроксифенил)пропионат калия (фенозан калия, Россия) и бис-(гамма-*L*-глутамил)-*L*-цистеинил-бис-глицин динатриевую соль (глутоксим, Россия).

### Экспериментальная химическая часть

Соединения I – VII получали из соответствующих 3-(4'-гидроксиарил)-1-галогенпропанов по описанным ранее методикам [4, 5] и очищали двукратной перекристаллизацией из этанола. Содержание основного вещества в исследованных образцах составляло 97 – 99 %. ПМР-спектр соединения VIII получен на спектрометре Bruker, 500 МГц (Германия), внешний стандарт — Si(CH<sub>3</sub>)<sub>4</sub>. ИК-спектр снят на Фурье-спек-

трометре Vektor 22 (Германия) в KBr (150:1). Температура плавления определена на приборе ПТП (Россия).

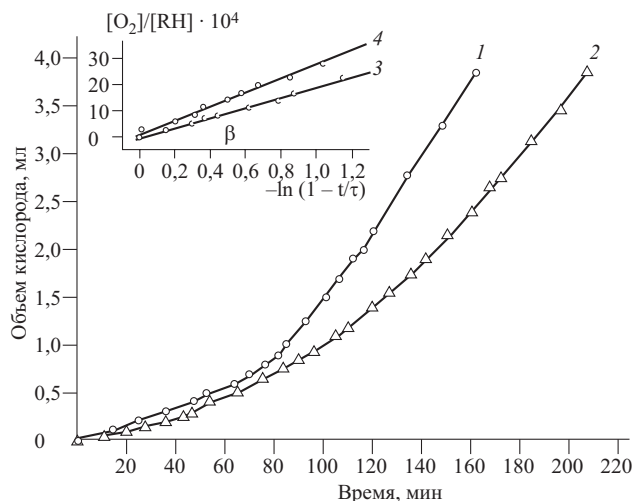
**Гидрохлорид [3-(4'-гидроксифенил)пропил]диэтиламина (VIII).** К смеси 4,15 мл (40 ммоль) диэтиламина, 2,9 г (20 ммоль) K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> и 20 мл диоксана при 50 °С и перемешивании в течение 0,5 ч прибавляют 2,15 г (10 ммоль) 3-(4'-гидроксифенил)-1-бромпропана в 20 мл диоксана. Реакционную смесь выдерживают 5 ч при 50 °С и охлаждают. Продукт экстрагируют бензолом; бензольный экстракт промывают насыщенным раствором NaCl, сушат Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, затем насыщают сухим хлористым водородом. Выпавший осадок отфильтровывают, промывают бензолом; получают 0,96 г (40 %) гидрохлорида VIII, т. пл. 150 – 152 °С.

ПМР-спектр (D<sub>2</sub>O),  $\delta$ , м.д.: 1,060 – 1,090 т (6H, CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>), 1,808 м (2H, ArCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>), 2,470 – 2,499 т (2H, ArCH<sub>2</sub>), 2,903 – 2,936 т (2H, ArCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>N), 2,986 – 3,029 кв (4H, NCH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>) 6,705 – 6,721 д (2H, H<sub>аром</sub>), 7,012 – 7,028 д (2H, H<sub>аром</sub>). ИК-спектр ( $\nu$ , см<sup>-1</sup>): 2958 (CH), 2666 (NH<sup>+</sup>). C<sub>13</sub>H<sub>22</sub>ClNO.

### Определение антирадикальной активности (АРА).

В качестве количественных характеристик антирадикальной активности соединений I – IV, ионола и фенозана калия определены константы скорости их взаимодействия с гидроперекисными радикалами метилолеата ( $k_7$ ) и величины коэффициентов ингибирования  $f$ , численно равные числу цепей, обрываемых одной молекулой АО. Значения  $k_7$  и  $f$  определяли на модельной реакции инициированного окисления метилолеата в хлорбензоле при 60 °С. Метилолеат (Acros Organics, USA) предварительно очищали от перекисей двукратной вакуумной перегонкой ( $\approx$  170 °С / 2 – 3 мм рт. ст.). Инициатор — азо-бис-изобутиронитрил (АИБН, Acros Organics, USA) предварительно перекристаллизовывали из этанола [6]. Рабочие концентрации компонентов в пробе (20 °С) составляли: метилолеата — 1,48 моль/л, АИБН — 12 ммоль/л, АО — 0,3 – 0,6 ммоль/л.

Объем поглощенного кислорода измеряли волюмометрически, с использованием методики и установки, описанной ранее [6], давление кислорода в системе составляло 1 атм., объем окисляемой пробы — 5 мл (20 °С). Период индукции ( $\tau$ ) определяли графически как точку пересечения двух касательных к кинетической кривой, тангенсы углов наклона которых составляют 0,5 и 0,75 от тангенса угла наклона прямой неингибированной реакции [6].



**Рис. 1.** Кинетические кривые поглощения кислорода в реакции инициированного окисления метилолеата в хлорбензоле при 60 °С: 1 — в присутствии 0,3 мМ ионола; 2 — в присутствии 0,5 мМ хлорида изотиурония III и их анаморфозы (3 и 4, соответственно)

Кинетические кривые поглощения кислорода и их анаморфозы в координатах зависимости  $[O_2] / [RH]$  от  $-\ln(1-t/\tau)$  для изотиуроний хлорида III и ионола представлены на рис. 1. По тангенсам угла наклона анаморфоз определяли соотношения  $k_2 / k_7$ , для расчета значений  $k_2$  воспользовались литературными данными [7], в соответствии с которыми в рассматриваемых модельных условиях для ионола  $k_7 = (2,6 \pm 0,4) \cdot 10^4$  л/моль · с. Коэффициент  $f$  определяли по уравнению:

$$f_{AO} = \frac{f_{\text{ионол}} [\text{ионол}] \tau_{AO}}{\tau_{\text{ионол}} [AO]},$$

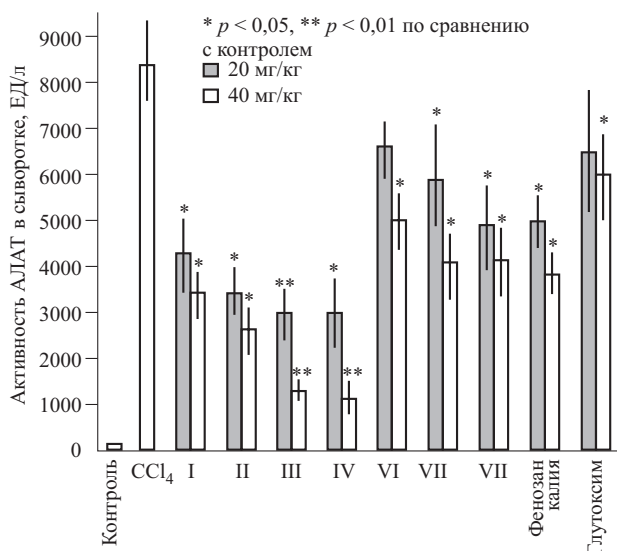
где  $f_{\text{ионол}} = 2$  [7].

#### Экспериментальная биологическая часть

**Методы исследования.** Общую антиокислительную активность (АОА) исследуемых соединений оце-

#### Характеристики антирадикальной и общей антиокислительной активности исследованных соединений

Соединение	$k_7 \cdot 10^{-4}$ , л/моль · с	$f$	ID <sub>50</sub> окисления ЛНП, мкМ	
			Cu <sup>2+</sup>	Fe <sup>2+</sup>
I	2,3 ± 0,3	1,1 ± 0,1	23	36
II	2,8 ± 0,5	1,6 ± 0,1	15	15
III	2,7 ± 0,3	1,2 ± 0,1	14	13
IV	1,9 ± 0,2	1,3 ± 0,1	13	14
V	...	...	2800	3000
VI	...	...	400	380
VII	...	...	470	530
VIII	...	...	550	470
Фенозан калия	1,5 ± 0,1	1,3 ± 0,1	18,5	17
Ионол	2,6 ± 0,4	2,0	15	15

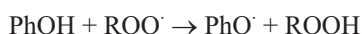


**Рис. 2.** Влияние фенольных соединений I – VIII на активность аланинаминотрансферазы в сыворотке крови мышей при токсичном гепатите, вызываемом тетрахлолорметаном

нивали по их способности ингибировать образование малонового диальдегида (МДА) при инкубации выделенных липопротеинов низкой плотности (ЛНП) с ионами металлов переменной валентности (Cu<sup>2+</sup>, Fe<sup>2+</sup>). Выделение ЛНП (1,019 – 1,063 г/мл) из плазмы доноров осуществляли методом последовательного ультрацентрифугирования в плотности KBr (105000 g, 20 ч и 105000 g, 24 ч) по [8], очистку ЛНП от KBr проводили хроматографически на сефадексе G-25. Содержание белка в ЛНП определяли методом Lowry. Окисление ЛНП проводили в присутствии 5 мкМ CuSO<sub>4</sub> или 25 мкМ FeSO<sub>4</sub> при 37 °С [9], рабочие концентрации АО составляли 1, 10 и 100 мкМ. Накопление МДА (реагирующего с тиобарбитуровой кислотой) измеряли флуоресцентным методом (Hitachi P3000) [10]. Об эффективности антиоксидантного действия соединений судили по их концентрации, обуславливающей 50 %-ное ингибирование накопления МДА (ID<sub>50</sub>) после 30 мин инкубации ЛНП с ионами металлов.

У мышей имбредной линии (C57Bl/6ХСВА)F<sub>1</sub> (по 6 животных в каждой группе) токсический гепатит вызывали внутрибрюшинным введением 10 %-ного раствора тетрахлолорметана в оливковом масле (0,2 мл на животное массой 25 г). Исследуемые соединения растворяли в физрастворе и вводили внутрибрюшинно за 2 ч до введения тетрахлолорметана. Концентрации фенольных соединений  $5 \cdot 10^{-5}$  и  $1 \cdot 10^{-4}$  М/кг соответствует 20 и 40 мг/кг для глутоксиима. Степень повреждения печени оценивали по активности в сыворотке крови аланинаминотрансферазы [11] через 24 ч после введения тетрахлолорметана с использованием реактивов “Bioson” УФ-методом [12]. Результаты выражали в ЕД активности фермента / л сыворотки крови. Статистическую обработку результатов проводили с использованием классического критерия Стьюдента.

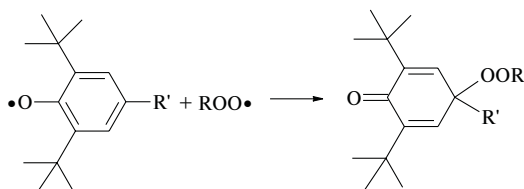
Результаты измерений параметров АОА исследованных соединений представлены в таблице. Показано, что все водорастворимые 2,6-ди-*трет*-бутил-4-алкилфенолы (I – IV) характеризуются сходными значениями константы скорости  $k_7$ , близкими к таковой для ионола, что вполне закономерно, поскольку ионогенный фрагмент, отделенный от ароматического ядра углеводородной цепью, не может оказывать существенного влияния на реакционную способность фенольной ОН-группы и устойчивость феноксильного радикала. В то же время соединения I – IV и фенозан калия уступают ионолу по величине коэффициента ингибирования  $f$ . Известно [13], что в основе антиокислительного действия фенольных соединений лежит реакция PhOH с гидроперекисным радикалом:



В условиях инициированного окисления основным путем разрушения феноксильных радикалов PhO $\cdot$  является образование хиноидных перекисей QP по реакции:



В силу особенностей распределения спиновой плотности и пространственной затрудненности *орто*-положения феноксила 2,6-ди-*трет*-бутил-4-алкилфенолов присоединяют ROO $\cdot$  с образованием преимущественно *пара*-изомеров QP:



По всей видимости, значительный объем и полярированность ионогенного фрагмента ( $R' = \text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{X}$ ) создают препятствие для подхода гидроперекисного радикала метилолеата в *пара*-положение фенольного кольца, что приводит к снижению константы скорости  $k_7$  и, как следствие, уменьшению величины коэффициента ингибирования  $f$ .

2,6-Ди-*трет*-бутил-4-алкилфенолы и их *орто*-незамещенные аналоги характеризуются, как правило, близкими значениями константы скорости  $k_7$  [13]. Однако соединения V – VIII практически не оказывают ингибирующего влияния на АИБН-инициированное окисление метилолеата, что обусловлено, вероятно, низкой стабильностью феноксильных радикалов, образуемых этими соединениями.

Производные пространственно-затрудненных фенолов I – IV оказывают выраженное ингибирующее влияние на перекисное окисление ЛНП и при этом существенно превосходят по эффективности свои *орто*-незамещенные аналоги V – VIII. Соединения II – IV характеризуются меньшей антирадикальной активно-

стью по сравнению с ионолом, но не уступают последнему по способности тормозить окисление ЛНП. Различия в антирадикальной и антиокислительной активности указанных фенолов могут быть связаны с наличием противокислительных свойств у их ионогенных фрагментов — тиосульфатной, изотиуруниевой и алкиламмониевой групп. По всей видимости, с присутствием этих групп связаны и противокислительные свойства *орто*-незамещенных фенолов VI – VIII. Показательно, что в отличие от последних сульфонат V практически не влияет на интенсивность окисления ЛНП.

По способности снижать активность аланинаминотрансферазы при токсическом гепатите исследованные соединения располагаются в следующем порядке:

алкиламмоний IV  $\approx$  изотиуруний III > тиосульфат II > сульфонат I > фенозан калия  $\approx$  алкиламмоний VIII > изотиуруний VII > тиосульфат VI > глутосим (рис. 2).

Таким образом, полученные данные свидетельствуют, что водорастворимые производные 2,6-ди(*трет*-бутил)-4-(*n*-пропил)фенола, содержащие в качестве гидрофильных фрагментов тиосульфатную, изотиуруниевую, алкиламмонийную группы (соединения II – IV), эффективно подавляют окисление ЛНП *in vitro* и оказывают гепатопротекторное действие *in vivo*. В связи с чем они представляют интерес для дальнейших доклинических исследований в качестве препаратов, обладающих гепатопротекторными свойствами.

Работа выполнена при поддержке РФФИ (грант № 01-04-49306 и 02-04-07560).

## ЛИТЕРАТУРА

1. Л. Ф. Виноградова, Т. С. Илларионова, Е. В. Харлицкая и др., *Бюл. exper. биол. и мед.*, **125**(4), 417 – 419 (1998).
2. И. В. Сорокина, А. П. Крысин, Т. Б. Хлебникова и др., *Роль фенольных антиоксидантов в повышении устойчивости органических систем к свободно-радикальному окислению*, ГПНТБ СО РАН, Новосибирск (1997), сс. 45 – 53.
3. С. М. Дроговоз, В. В. Слышков, И. С. Сальникова, *Экспер. и клинич. фармакол.*, **56**(5), 54 – 57 (1994).
4. А. Е. Просенко, С. Ю. Клепикова, Н. В. Кандалинцева и др., *Бюл. СО РАМН*, **99**(1) (2001).
5. Н. В. Кандалинцева, О. И. Дюбченко, А. Е. Просенко и др., *Хим.-фарм. журн.*, **35**(3), 22 – 25 (2001).
6. В. Ф. Цепалов, *Исследование синтетических и природных антиоксидантов in vivo и in vitro*, Сб. науч. статей, Наука, Москва (1992), сс. 16 – 26.
7. Г. Д. Кадочникова, *Свободно-радикальное окисление липидов в эксперименте и клинике*, Сб. науч. статей, Тюмень (1997), сс. 5 – 21.
8. В. Н. Орехович (ред.), *Современные методы в биохимии*, Москва (1977), сс. 533 – 537.
9. M. Dushkin, N. Zenkov, E. Menshikova, et al., *Atherosclerosis*, **114**, 9 – 18 (1995).
10. K. Yagi, *Biochem. Med.*, **15**, 212 – 216 (1976).
11. Д. Н. Маянский, Э. Виссе, К. Декер, *Новые рубежи гепатологии*, Новосибирск (1992).
12. H. Bergmeyer and A. Holder, *Clin. Chem. Acta*, **105**, 147 – 152 (1980).
13. В. А. Рогинский, *Фенольные антиоксиданты: Реакционная способность и эффективность*, Наука, Москва (1988).

Поступила 12.11.01.