

© Коллектив авторов, 2007

М. А. Симонян<sup>1</sup>, Х. Диб<sup>1</sup>, А. Н. Пашков<sup>2</sup>, А. В. Симонян<sup>1</sup>,  
О. В. Мячина<sup>2</sup>, О. В. Островский<sup>1</sup>

## СИНТЕЗ, АНТИРАДИКАЛЬНАЯ И АНТИОКСИДАНТНАЯ АКТИВНОСТЬ ЦИКВАЛОНА И ЕГО АНАЛОГОВ

<sup>1</sup> Волгоградский государственный медицинский университет;

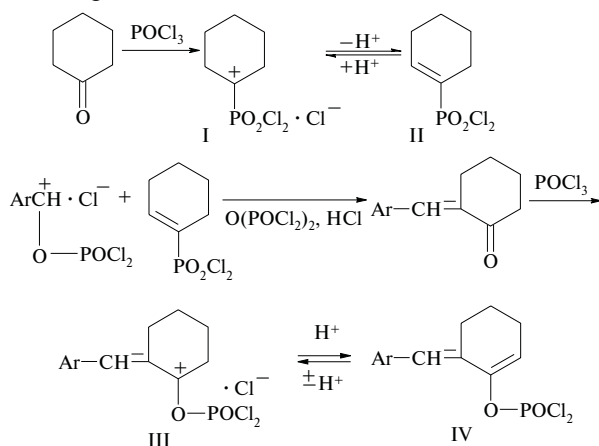
<sup>2</sup> Воронежская государственная медицинская академия им. Н. Н. Бурденко

Обоснован новый подход к активации компонентов реакции конденсации ароматических альдегидов с циклогексаноном, выступающих в роли СН-кислотного компонента. Конденсация проводится в избытке фосфора оксихлорида при нагревании и приводит к образованию с высокими выходами соответствующих производных 2,6-добензилиденциклогексанона. Для синтезированных соединений изучена антирадикальная и антиоксидантная активность и установлено, что максимальной активностью обладает циквалон. Препарат сравнения (дибунол) не показал гашения свободных радикалов и уступал циквалону по антиоксидантной активности.

Ранее мы сообщали о применении фосфора оксихлорида ( $\text{POCl}_3$ ) в синтезе замещенных в ароматическом фрагменте производных коричной кислоты, арил-амидов коричной кислоты, производных 4-бензилиден-оксазолон-5, последующим гидролизом которых получали  $\alpha$ -бензоиламинозамещенные коричной кислоты [1 – 3].

В медицинской практике применяется желчегонное и противовоспалительное средство циквалон [4]. Нашими исследованиями установлено, что циквалон обладает также антиоксидантной, мембраностабилизирующей, гепатопротекторной, противоязвенной активностью, а также способностью улучшать мозговое кровообращение [5, 6].

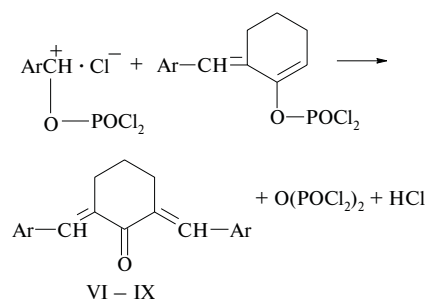
В промышленности циквалон получают взаимодействием 4-гидрокси-3-метоксибензальдегида с циклогексаноном в присутствии тока хлороводорода в течение 10 – 12 ч [7]. Мы предложили использовать в этом синтезе  $\text{POCl}_3$  вместо  $\text{HCl}$ . В данной реакции в роли СН-кислотного компонента выступает циклогексанон, который содержит в своей структуре два СН-кислотных центра.



Исходя из этого, мы предположили, что в условиях предлагаемой нами реакции циклогексанон под действием  $\text{POCl}_3$  образует соответствующие карбокатионы (I, III).

Образующиеся карбокатионы однозначно могут стабилизироваться депротонированием  $\alpha$ -метиленовых групп с образованием активных нуклеофилов (II, IV, V).

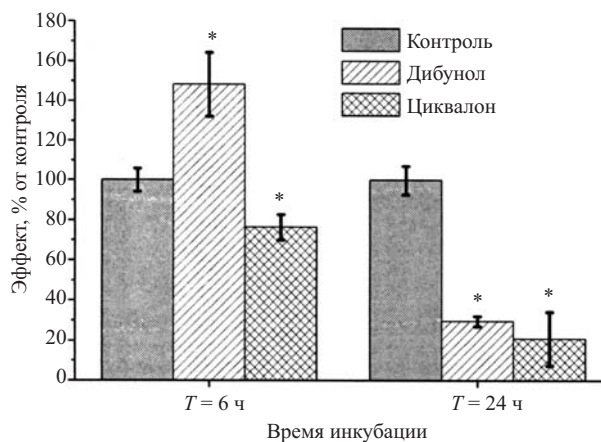
При взаимодействии активных нуклеофилов с карбокатионом, формирующимся из альдегидного компонента реакции, возможно образование производных 2,6-добензилиденциклогексанона (VI – IX):



Таким образом, при нагревании смеси 2 моль ароматического альдегида и 1 моль циклогексанона в присутствии  $\text{POCl}_3$  с хорошими выходами получены производные 2,6-добензилиденциклогексанона (VI – IX), в том числе известное лекарственное средство циквалон. В табл. 1 приведены сравнительные выходы соединений, полученных предлагаемым методом (метод Б) и известными способами (метод А).

Полученные результаты показывают, что предлагаемый метод синтеза производных 2,6-добензилиденциклогексанона имеет ряд преимуществ перед существующими: значительно упрощается и сокращается продолжительность синтеза, существенно увеличиваются выходы целевых продуктов.

Представляло интерес изучить антирадикальную (АРА) и антиоксидантную (АОА) активности синтези-



**Рис. 1.** Антиоксидантная активность дибунола и циквалона. \*  $p \leq 0,05$  по сравнению с контролем.

рованных соединений в сравнении с известным антиоксидантом дибунолом. Выбор дибунола продиктован тем, что одно из синтезированных аналогов циквалона (соединение VIII) содержит одинаковые с дибунолом заместители в ароматических циклах, расположенные в тех же положениях.

В табл. 2 приведены результаты исследований АРА соединений VI – IX в концентрации 3,3 мкг/мл. Полученные результаты свидетельствуют о том, что в данной группе соединений наибольшей АРА обладает соединение VII — циквалон как по отношению к контролю, так и по отношению к другим исследованным соединениям.

Следует обратить внимание на то, что дибунол, для которого описана АРА [4], исследуемая в тех же условиях и в тех же концентрациях, не показал гашения свободных радикалов даже в концентрации 1 мг/мл.

Для наиболее активного по АРА соединения VII (циквалон) были проведены исследования по определению его антиоксидантной активности (АОА), которую оценивали по методике, основанной на определении малонового диальдегида, образующегося при окислении полиненасыщенных жирных кислот кислородом воздуха, а также на модели свободнорадикального окисления (СРО) липосом.

Установлено, что по АОА на модели с образованием малонового альдегида циквалон уступает дибунолу ( $ЭД_{50}$  соответственно 350 и 50 мг/кг).

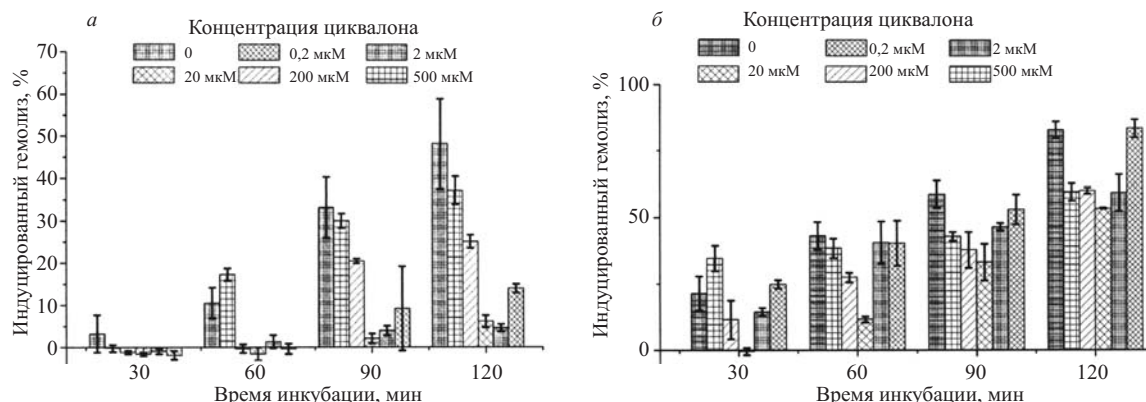
На модели неиндуцированного СРО липосом циквалон в концентрации 10 мкМ оказался значительно эффективнее дибунола, т. к. его антиоксидантное действие проявляется уже через 6 ч и ингибирование окисления составляет (23,6 %) от контроля (рис. 1).

Предполагается, что снижение резистентности эритроцитов отражает дисфункцию и деструкцию клеток организма, вызываемую эндогенными токсическими субстанциями, к которым относятся активные формы кислорода и другие свободные радикалы. Поэтому нам представлялось интересным изучить влияние циквалона и дибунола на резистентность эритроцитов к повреждающему действию активных форм кислорода.

Установлено, что циквалон в диапазоне концентраций 0,2 – 20 мкМ подавляет индуцированный ионами меди гемолиз (рис. 2, а). Константа ингибирования, рассчитанная по результатам 2 ч инкубации, составляет  $(5,3 \pm 1,4) \cdot 10^{-8}$  М. Повышение концентрации циквалона до 200 – 500 мкМ приводит к снижению его антигемолитического эффекта.

Сходные результаты получены и в случае гемолиза, индуцированного комбинацией ионов меди с перекисью водорода (рис. 2, б). Но, в отличие от индукции только медью, величина константы ингибирования циквалона, рассчитанная по результатам 2 ч инкубации существенно меньше  $(1,5 \pm 0,8) \cdot 10^{-6}$  М.

Как видно из данных, представленных на рис. 4, а, влияние дибунола при концентрациях ниже 200 мкМ на процесс гемолиза, индуцированный 200 мкМ хлорида меди, незначительно. Достоверное снижение степени гемолиза выявляется только при его концентрации 20 мкМ и при инкубации в течение 90 мин. Напротив, дибунол в концентрациях 200 и 500 мкМ приводит к увеличению скорости процесса на начальной стадии (инкубация до 90 мин, рис. 3, а). Как и в случае высоких концентраций циквалона, дибунол в концентрации 500 мкМ почти двукратно увеличивает степень гемолиза уже к 30 мин инкубации.



**Рис. 2.** Влияние циквалона на гемолиз эритроцитов крыс индуцированный: (а) хлоридом меди (200 мкМ); (б) хлоридом меди (200 мкМ) в сочетании с пероксидом водорода (5 мМ). Приведены результаты за вычетом спонтанного гемолиза (в физрастворе).

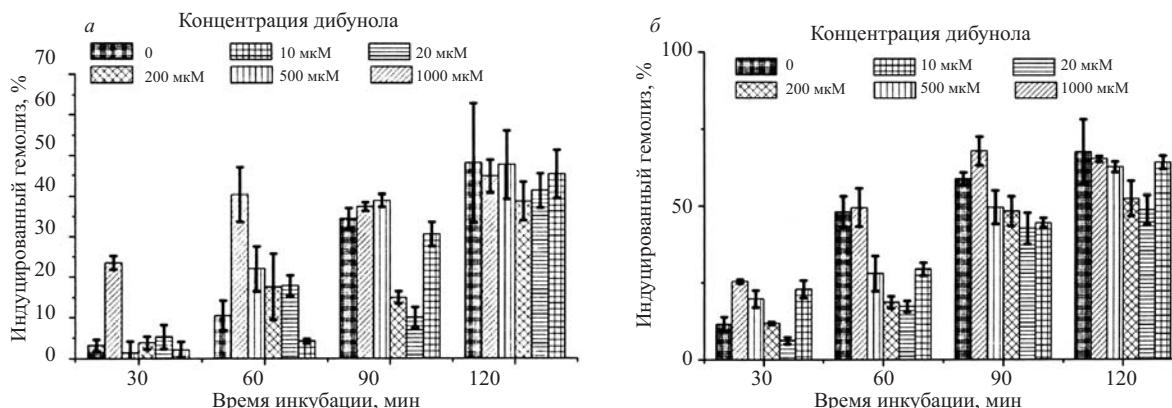


Рис. 3. Влияние дибутилола на гемолиз эритроцитов крыс индуцированный: (а) хлоридом меди (200 мкМ); (б) хлоридом меди (200 мкМ) в сочетании с пероксидом водорода (5 мМ). Приведены результаты за вычетом спонтанного гемолиза (в физрастворе).

В случае индукции гемолиза эритроцитов крыс комбинацией ионов меди и пероксида водорода (рис. 3, б) действие дибутилола более выражено. Диапазон концентраций, при которых наблюдается достоверное снижение степени индуцированного гемолиза, составляет 10 – 200 мкМ.

Полученные результаты свидетельствуют о том, что на модели медь-индуцированного гемолиза эритроцитов в диапазоне концентраций до 20 мкМ циквалон проявляет более выраженные антирадикальные свойства, чем дибутилол. Вместе с тем, как циквалон, так и дибутилол в концентрациях 200 – 500 мкМ вызывают увеличение степени гемолиза. Это может быть связано как с непосредственным изменением свойств липидного бислоя в присутствии столь высоких концентраций липофильных веществ, так и с накоплением радикальных форм собственно самих «ловушек» (циквалона и дибутилола).

#### Экспериментальная часть

##### Синтез соединений

Способ А. Соединения получены по известному способу, конденсацией циклогексанона (соединения

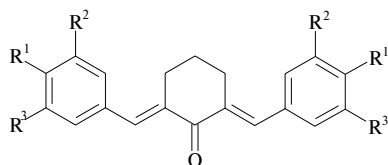
VI – IX) с соответствующими ароматическими альдегидами [7].

Способ Б. Смесь, состоящую из 0,02 моль соответствующего ароматического альдегида, 1,1 г (0,011 моль) циклогексанона (соединения VI – IX) и 2 мл  $\text{POCl}_3$ , нагревают при 80 – 90° С в течение 30 мин. После охлаждения реакционную смесь выливают в смесь, состоящую из 50 мл воды со льдом. Выделившийся осадок отделяют, промывают водой до нейтральной реакции и сушат. Кристаллизуют из этанола.

##### Определение антирадикальной активности

Определение степени торможения хемилюминесценции (в % от контроля) осуществляли со специальной приставкой для определения активности гасителей хемилюминесценции. В качестве системы, генерирующей свободные радикалы, использовали реакционную смесь, состоящую из карбонатного буфера pH 10,0 (0,1 М/л), ЭТДА (0,1 М/л), рибофлавина (0,1 М/л), люминола (10 мкМ/л) [8]. Исследуемые соединения растворяли в 75 % этиловом спирте. В рабочую кювету вносили 50 мкл спиртового раствора соединения. В качестве контроля использовали 75 % этиловый спирт в объеме 50 мкл.

Таблица 1  
Выходы производных 2,6-добензилиденциклогексанона



Соединение	R <sup>1</sup>	R <sup>2</sup>	R <sup>3</sup>	Выход, %	
				Метод А	Метод Б
VI	H	H	H	67	82
VII	OH	OCH <sub>3</sub>	H	74,5	85
VIII	OH	(CH <sub>3</sub> ) <sub>3</sub> C	(CH <sub>3</sub> ) <sub>3</sub> C	55	70
IX	OCH <sub>3</sub>	OCH <sub>3</sub>	H	68	93

Примечание. Строение полученных соединений установлено на основании данных хроматографического анализа, УФ-, ИК-спектров, элементного анализа, температур плавления.

Таблица 2  
Антирадикальная активность производных 2,6-добензилиденциклогексанона

Соединение	Концентрация, мкг/мл	Торможение хемилюминесценции, %
Этанол (контроль)	50 мкл	0,0
VI	3,3	28,0 ± 1,4 ( <i>p</i> < 0,05)
Этанол (контроль)	50 мкл	0,0
VII	3,3	66,7 ± 3,3* ( <i>p</i> < 0,05)
Этанол (контроль)	50 мкл	0,0
VIII	3,3	21,0 ± 1,1 ( <i>p</i> < 0,05)
Этанол (контроль)	50 мкл	0,0
IX	3,3	4,4 ± 0,2 ( <i>p</i> < 0,05)

\* *p* < 0,05 по отношению к соединениям VI, VIII, IX и контролю.

### Определение антиоксидантной активности

Оценку АОА проводили по концентрации соединений (в моль/л), вызывающей снижение накопления малонового диальдегида на 50 % ( $ЭД_{50}$ ) [9].

Липосомы готовили инъекторным способом: 5 мл физиологического раствора при интенсивном перемешивании быстро впрыскивали шприцом с тонкой иглой 0,25 мл раствора фосфолипида нужной концентрации в этаноле. Конечная концентрация фосфолипида в суспензии липосом в большинстве экспериментов составляла 2,38 мг/мл. Исследуемые вещества добавляли в раствор лецитина перед приготовлением липосом. Для инициации СРО в суспензии липосом использовали термическое воздействие (спонтанное или автоокисление). Количественное определение веществ, реагирующих с тиобарбитуровой кислотой (ТБК) проводили по следующей методике: к 0,25 мл суспензии липосом добавляют 0,5 мл 1 % раствора фосфорной кислоты, 0,5 мл 0,6 % раствора ТБК и 0,25 мл  $FeSO_4 \cdot 7H_2O$ , после чего реакционную смесь инкубируют в течение 10 мин на кипящей водяной бане и центрифугируют 10 мин при  $1800 \times g$  и фотометрируют при длине волны 532 нм. В пробах без тестируемых соединений содержание веществ, реагирующих с ТБК, колебалось около 100 % (на всех рисунках отмечены штрих-пунктирной линией), а тестируемые вещества либо снижали эти значения, либо увеличивали их. В первом случае можно говорить об антиоксидантном, а во втором — об прооксидантном эффекте [10]. Система генерации инициаторов процессов СРО включала  $Cu^{2+}$  и пероксид водорода (реакция Фентона). Детекцию интенсивности процессов проводили по скорости гемолиза, который, как известно, в этом случае определяется перекисным повреждением мембран [11, 12].

### Определение антигемолитического действия

Для определения выраженности гемолиза измеряли концентрацию гемоглобина прямым спектрофотометрическим методом. Конечный гематокрит в образцах

составлял 1 %, при полном гемолизе образца поглощение пробы было в диапазоне 1,5 – 1,8 о. е. Система генерации инициаторов процессов СРО включала  $Cu^{2+}$  и пероксид водорода (реакция Фентона). Детекцию интенсивности процессов оценивали по скорости гемолиза, который, как известно, в этом случае определяется перекисным повреждением мембран [11, 12]. Инкубация образцов проводилась при  $37^\circ C$  и постоянном перемешивании. В этих условиях инкубация образца в отсутствие индукторов приводила к гемолизу ~ 6 – 14 % эритроцитов. Константу ингибирования рассчитывали с использованием координат Эдди-Хефста [13].

### ЛИТЕРАТУРА

1. А. В. Симонян, *Хим.-фарм. журн.*, **33**(3), 43 – 44 (1999).
2. А. А. Аванесян, А. В. Симонян, *Хим.-фарм. журн.*, **35**(2), 37 – 38 (2001).
3. А. А. Аванесян, А. В. Симонян, М. А. Симонян, *Хим.-фарм. журн.*, **39**(7), 40 – 41 (2005).
4. М. Д. Машковский, *Лекарственные средства*, Медицина, Москва (1986).
5. А. В. Симонян, *Автореф. дис. ... д-ра фарм. наук*, Пятигорск (1992).
6. А. В. Симонян, В. Е. Погорелый, А. А. Аванесян, Н. Г. Ширяева, *Вестник Волгоградского гос. университета*, **59**(9), 52 – 55 (2003).
7. М. В. Рубцов, А. Г. Байчиков, *Синтетические хим.-фарм. препараты*, Медицина, Москва (1971), сс. 36 – 37.
8. А. Н. Пашков, *Клиническая лабораторная диагностика*, 5 – 6, Медицина, Москва (1992), сс. 62 – 63.
9. Л. П. Галантимонова, А. В. Молчанов, С. А. Ельчанинова, Б. Я. Варшавский, *Клин. лаб. диагностика*, **6**, 10 – 14 (1998).
10. В. Г. Зайцев, В. И. Закревский, *Вестник Волгоградской мед. академии*, Сб. научн. тр., **56**(6), 130 – 133 (2000).
11. E. Rock, A. Mazur, M. Jacqueline, P. Maxine, *Free Rad. Biol. Med.*, **28**(3), 324 – 329 (2000).
12. T. Nishikawa, I. S. L. Matusi, N. I. Shiraish, et al., *J. Biol. Chem.*, **272**(3), 2307 – 2341 (1997).
13. Э. Фершт, *Структура и механизм действия ферментов*, Мир, Москва (1980).

Поступила 17.10.05

### SYNTHESIS, ANTIRADICAL AND ANTIOXIDANT ACTIVITY OF CYCVALON AND ITS ANALOGS

M. A. Simonyan<sup>1</sup>, H. Deeb<sup>1</sup>, A. N. Pashkov<sup>2</sup>, A. V. Simonyan<sup>1</sup>, O. V. Myachina<sup>2</sup>, and O. V. Ostrovskii<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Volgograd State Medical Academy, Volgograd, Russia

<sup>2</sup> Voronezh State Medical Academy, Voronezh, Russia

A new approach to the activation of components in the reaction of aldehyde condensation with aromatic cyclohexanon (CH-acid component) has been justified. The condensation is carried out on heating in excess of phosphorus oxychloride and results in the formation of the corresponding 2,6-dibenzylidene cyclohexanon derivatives with high yields. The antiradical and antioxidant activity of the synthesized compounds has been studied. The maximum activity was observed for Cycvalon, which exceeded the reference drug (dibunol) in free radical scavenging and antioxidants activity.