



УДК 541.128.3:542.943.7:577.152.19:547.979.733

СИНТЕЗ И АНТИОКСИДАНТНАЯ АКТИВНОСТЬ АЗОЛЬНЫХ ПРОИЗВОДНЫХ ГЕМИНА

© 2000 г. Е. А. Рожкова[#], А. И. Лыско*, К. В. Кулешов, Р. П. ЕвстигнееваМосковская государственная академия тонкой химической технологии им. М.В. Ломоносова,
117571, Москва, просп. Вернадского, 86;

* НИИ фармакологии РАМН, 125315, Москва, ул. Балтийская, 8

Поступила в редакцию 22.12.99 г. Принята к печати 18.02.2000 г.

Синтезированы и охарактеризованы новые производные прото- и дейтерогемина IX, содержащие три- и тетразольные циклы. Обнаружена выраженная антиоксидантная активность данных соединений в Fe(II)-аскорбатзависимой системе перекисного окисления липидов гомогенатов печени крыс и мышей.

Ключевые слова: гемин; азолы, синтез, антиоксидантная активность; перекисное окисление липидов; гомогенаты печени.

ВВЕДЕНИЕ

Пятичленные гетероциклические соединения с двумя или более атомами азота – азолы, представляют собой обширную группу органических соединений, обладающих широким спектром биологической активности. Так, имидазол входит в состав важной аминокислоты гистидина и продукта ее декарбоксилирования гистамина. Триазолы и тетразолы используются в производстве лекарственных препаратов, фунгицидов и гербицидов [1]. *N*-Незамещенные тетразолы можно рассматривать как аналоги аминокислот и других природных карбоновых кислот (величины их pK_a сравнимы). Такой подход находит применение в медицинской химии [1]. Соединения данной группы обладают значительной комплексообразующей способностью, которая усиливается в ряду пиррол < имидазол < триазол < тетразол. Так, если пиррол не обладает выраженной комплексообразующей способностью (за исключением порфиринов, у которых комплексообразование с ионами переходных металлов обусловлено сопряжением в тетрапиррольном цикле), то исключительная биологическая важность комплексов переходных металлов с производными имидазола широко известна. В свою очередь 3-амино-1*H*-1,2,4-триазол является необратимым ингибитором гемсодержащего фермента каталазы, по-видимому, за счет комплексообразования с атомом железа протетической группы белка [2].

Комплексы железопорфиринов с производными имидазола, катализирующие широкий спектр окислительно-восстановительных реакций [3], применяются как модели активных центров гемсодержащих ферментов [4]. Гистидинсодержащие гемпептиды – фрагменты протеолитического расщепления цитохрома *c*, проявляют антиоксидантную активность. В частности, они блокируют окисление линолевой кислоты соевой липоксигеназой эффективнее, чем витамин Е и α -нафтол [5], а также ингибируют ферментативное перекисное окисление липидов в микросомах печени крыс [6]. Нами был предложен механизм антиоксидантного действия гемпептидов, заключающийся в каталитическом восстановлении гидроперекисей в присутствии кофакторов NAD(P)H [7–9]. В продолжение наших исследований комплексов гемина с азотсодержащими гетероциклами были синтезированы производные гемина (I) и (II), содержащие соответственно остатки триазола (IV) и гидроксифенилтетразола (VI) (схема), и исследована их антиоксидантная активность в реакции перекисного окисления липидов гомогенатов печени мышей и крыс в системе Fe(II)-аскорбиновая кислота.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Синтезированные азольные производные (I) и (II) представляют собой смеси изомеров, в каждом из которых модификации подвергся один из остатков пропионовой кислоты в 13- и 17-м положениях порфиринового цикла (схема).

Исходным веществом в синтезе амида (I) служил дейтерогемин (III). Ацилирование аминогруппы аминотриазола (IV) дейтерогеминном (III)

Сокращения: НОВТ – 1-гидроксибензотриазол; MDA – малоновый диальдегид; NTB – нитротетразолевый синий; ПОЛ – перекисное окисление липидов; ТРР – тетрафенилпорфирин; P-Fe – порфиринаг железа.

[#] Автор для переписки (e_rozhkova@yahoo.com (Internet); тел.: (095) 434-85-44).

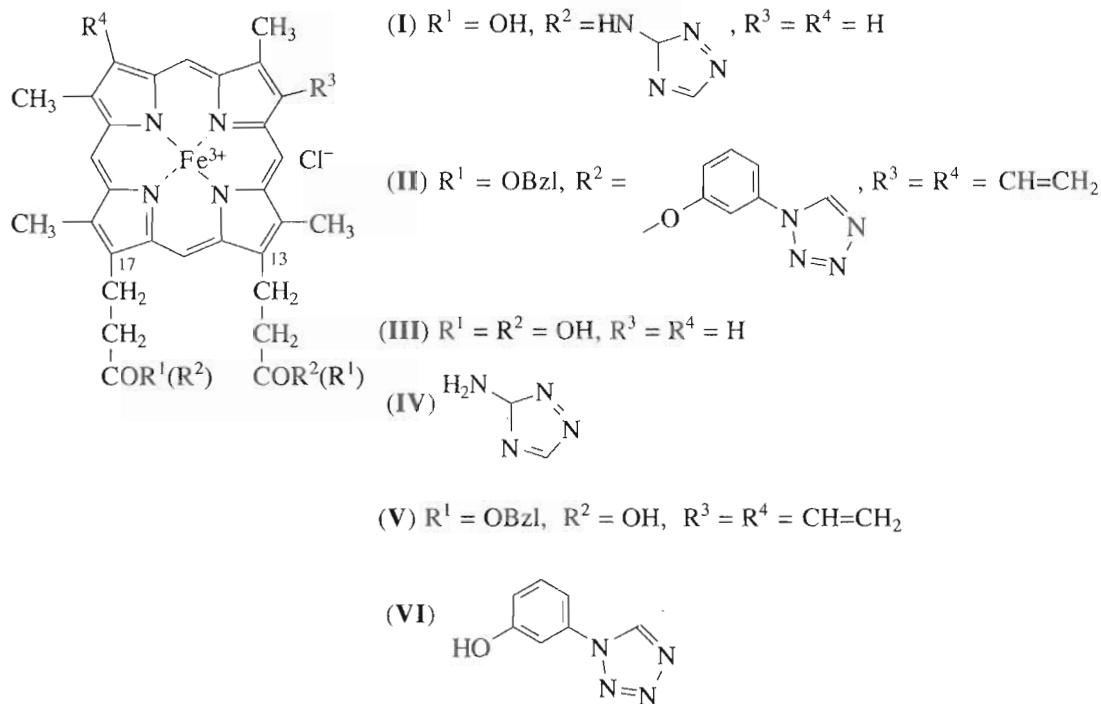


Схема.

осуществляли методом активированных эфиров в присутствии НОВТ и DCC в безводном DMF. С целью увеличения выхода моноамида дейтерогемина (I) применяли концентрационное разбавление. Синтез осуществляли без предварительной защиты одной из карбоксильных групп.

Для получения сложного эфира (II) исходным соединением был выбран монобензиловый эфир протогемина (V), полученный частичным омылением соответствующего дибензилового эфира по методу [10]. Конденсацию *m*-тетразолилфенола (VI) и монобензилового эфира протогемина IX (V) осуществляли с применением DCC.

Вследствие слабых различий в хроматографической подвижности исходных гемин (III) и (V) и их производных (I) и (II), очистку продуктов осуществляли не колоночной хроматографией, а препаративной ТСХ на силикагеле.

В качестве модели для изучения антиоксидантных свойств синтезированных соединений использовали Fe(II)-аскорбатзависимое перекисное окисление липидов (ПОЛ) гомогенатов печени крыс и мышей. ПОЛ прослеживали по кинетике накопления малонового диальдегида (MDA) с помощью реакции с тиобарбитуровой кислотой по стандартной методике [11]. Оказалось, что азольные производные гемина (I) и (II) в концентрации 40 мкМ приводили к заметному снижению образования MDA, при этом антиоксидантный эффект гемина (II) был сравним с действием ионола. Протогемин IX в интервале концентраций от 25 до

100 мкМ не оказывал достоверного воздействия на процесс ПОЛ. В свою очередь Fe(III)-TRP (VII), содержащий объемные фенильные заместители в *мезо*-положениях порфиринового цикла, оказывал менее заметное влияние на ПОЛ (рис. 1).

Как известно, гемсодержащие белки (гемоглобин, миоглобин и др.), а также свободный гемин могут усиливать процессы перекисного окисления полиненасыщенных жирных кислот [12]. Реакция

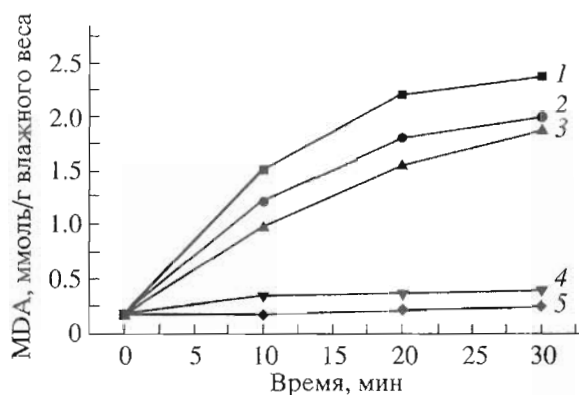


Рис. 1. Влияние производных гемина на накопление MDA в Fe(II)-аскорбатзависимой системе ПОЛ гомогенатов печени крыс. Результаты получены в присутствии Fe-TRP (2), соединения (I) – (3), соединения (II) – (4), ионола – (5). 1 – контроль: без прибавления Fe-порфиринов. Данные представляют собой среднее значение по крайней мере трех измерений.

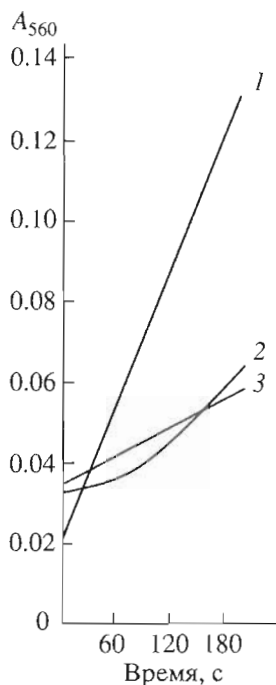
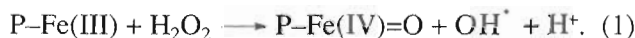


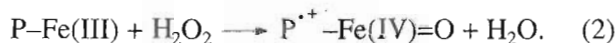
Рис. 2. Ингибирование восстановления НТВ в системе ксантин-ксантиноксидаза без прибавления Fe-порфиринов (1), в присутствии соединения (I) – (2) и соединения (II) – (3) в концентрации 20 мкМ.

гемина с гидроперекисями может осуществляться двумя путями. Во-первых, по уравнению 1 с образованием феррил-иона и высвобождением высококорреактивного гидроксильного радикала, роль которого в инициации и развитии ПОЛ хорошо известна [9]:



При этом происходит гомолитическое расщепление гидроперекиси.

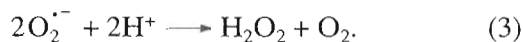
По второму пути (уравнение 2) может образовываться π -катион-радикал и вода:



Такое расщепление O–O-связи в гидроперекиси называется гетеролитическим и при наличии соответствующих доноров электронов осуществляется *in vivo* ферментами – каталазами и пероксидазами, что имеет важное значение в процессе полного восстановления перекиси водорода до воды, а гидропероксидов – до соответствующих спиртов.

Механизмы каталитической активности природных железопорфиринов и их синтетических моделей определяются строением координационной сферы атома железа, природой лигандов, а также заместителей в порфириновом макроцикле. Наши данные позволяют предположить, что введение азольных заместителей может вызы-

вать стабилизацию катион-радикальных форм гемина (уравнение 2), смещая направление реакции расщепления гидропероксидов в сторону гетеролиза. При этом донорами электронов могут служить присутствующие в гомогенатах тканей восстановители, например, NADH или NAD(P)H или даже супероксид-анион ($O_2^{\cdot-}$). С целью выяснения возможного взаимодействия исследуемых соединений (I) и (II) с супероксид-анионом мы наблюдали их поведение в системе окисления ксантина ксантиноксидазой (КФ 1.1.3.22) в присутствии красителя нитротетразолового синего (НТВ) [13]. Из рис. 2 видно, что характер кинетических кривых восстановления НТВ в присутствии геминов (I) (кривая 2) и (II) (кривая 3) резко отличается от соответствующей кривой для процесса в отсутствие Fe-порфиринов (кривая 1), что может объясняться конкуренцией производных гемина и НТВ за $O_2^{\cdot-}$. Известно [7, 9], что супероксид-анион сам по себе не является сильным окислителем вследствие низкого стандартного редокс-потенциала. Его прооксидантные эффекты, отчасти, могут быть обусловлены дисмутацией с образованием перекиси водорода по уравнению 3:



Поэтому снижение уровня супероксид-аниона должно приводить к снижению интенсивности ПОЛ.

Исходя из вышесказанного, можно предположить, что 1) наряду с другими восстановителями, например NAD(P)H, $O_2^{\cdot-}$ может служить восстановителем в каталитическом пероксидазном цикле восстановления гидроперекисей Fe-порфиринами; 2) выраженная антиоксидантная активность соединений (I) и (II) может быть обусловлена двойным эффектом – устранением супероксид-аниона и разложением гидроперекисей.

С целью дальнейшего выяснения механизма антиоксидантной активности производных гемина (I) и (II) нами планируется их изучение в реакциях непосредственного окисления полиненасыщенных жирных кислот *in vitro*, а также на клеточных моделях ПОЛ.

Таким образом, нами синтезированы новые производные дейтеро- и протогемина, содержащие три- и тетразольные заместители. Синтезированные соединения могут имитировать активность природных ферментативных систем, проявляя ярко выраженный антиоксидантный эффект, сравнимый с таковым для известного фенольного антиоксиданта ионола.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Растворители очищали по стандартным методикам. В работе использовали DCC и НОВТ производства фирмы "Fluka".

Дейтерогемин IX получали по стандартной методике [14].

Монобензиловый эфир протогемина IX (V) получали частичным омылением соответствующего дибензилового эфира по методу [10].

TRP и его Fe(III)-комплекс были синтезированы по методикам [15, 16].

m-(1)-Тетразолилфенол (VI) синтезировали в соответствии с работой [17].

MALDI TOF-спектры регистрировали на приборе VISION 2000.

Температуры плавления определяли на приборе Voetius (Германия) и не корректировали.

Электронные спектры регистрировали на приборах M 400 (Германия) и JASCO 7800 (Япония) в смеси растворителей хлороформ–метанол, 1 : 1.

Индивидуальность полученных соединений и ход реакций контролировали с помощью ТСХ на силикагеле в системе растворителей хлороформ–метанол, 9 : 1 (А), 8 : 2 (Б), бутанол–уксусная кислота–вода, 4 : 1 : 5 (В).

Препаративную ТСХ проводили на силикагеле L5/40 в системах растворителей А и Б.

В ходе биологических исследований производные порфиринов растворяли в 0.05 М калий-фосфатном буфере (рН 7.0) с добавлением 0.2–0.5% Твин-80 (Merck).

ПОЛ. 10% гомогенаты печени самцов беспородных крыс и мышей индуцировали прибавлением FeSO₄ и аскорбиновой кислоты, конечные концентрации которых составляли 3 мкМ и 0.5 мМ, соответственно. Инкубации проводили в открытых ячейках при постоянном перемешивании при 37°C. Продукты окисления (MDA) определяли спектрофотометрически при длине волны 532 нм по тесту с тиобарбитуровой кислотой [11] через 10, 20 и 30 мин инкубации. Время отсчитывали с момента внесения смеси FeSO₄ и аскорбиновой кислоты. Антиоксидантную активность производных Fe-порфиринов сравнивали с таковой для 2,6-ди-*трет*-бутил-4-метилфенола (ионол) (Fluka). Ксантиноксидаза (КФ 1.1.3.22) была использована при исследовании восстановления НТВ в системе с ксантином по методике [13].

Fe(III)-2,7,12,18-тетраметилпорфириного-13(17)-3-карбоксиэтил-17(13)-(1,2,4-триазол-3-ил)пропионамид (I). К охлажденному до 0°C раствору 0.1 г (0.15 ммоль) дейтерогемина (III) и 0.06 г (0.45 ммоль) НОВТ в 4 мл DMF при постоянном перемешивании медленно, небольшими порция-

ми прибавляли 0.03 г (0.15 ммоль) DCC. Через 30 мин прибавили 0.03 г (0.3 ммоль) 2-амино-1,3,4-триазола (IV). Смесь перемешивали при 0°C 2 ч и выдерживали при 5°C 24 ч. Растворитель удаляли в вакууме. Сухой остаток растворяли в хлороформе и очищали препаративной ТСХ в системе (А). Хроматографически однородные фракции объединяли. Выход амида (I) 0.04 г (40%), *R_f* 0,5 (Б), 0,8 (В), т. пл. 130–133°C. Электронный спектр, λ_{\max} , нм, ($\epsilon \times 10^{-3}$): 368.0 (плечо), 403 (55), 485.5 (5.2), 595 (3.95). Масс-спектр, *m/z*, 632 [*M*]⁺ (однозарядный ион P–Fe).

Fe(III)-2,7,12,18-тетраметил-3,8-дивинилпорфириного-13(17)-[(тетразол-1-ил)фенил-3]пропионат-17(13)-бензилпропионат (II). К охлажденному до 0°C раствору 0.1 г (0.17 ммоль) смеси монобензиловых эфиров протогемина (V) и 0.03 г (0.17 ммоль) *m*-тетразолилфенола (VI) в 3 мл DMF при постоянном перемешивании прибавляли 0.07 г (0.34 ммоль) DCC. Смесь перемешивали при 0°C 2 ч и выдерживали при 5°C 12 ч, растворитель удаляли в вакууме, сухой остаток растворяли в хлороформе и очищали препаративной ТСХ в системе (А). Хроматографически однородные фракции объединяли. Выход диэфира (II) 0.06 г (50%), *R_f* 0.75 (А), т. пл. 127.5°C. Электронный спектр, λ_{\max} , нм, ($\epsilon \times 10^{-3}$): 367.8 (плечо), 402.2 (48.40), 487.4 (6.21), 595.4 (3.93). Масс-спектр, *m/z*, 851 [*M* + Na]⁺ (P–Fe).

Работа выполнена при поддержке РФФИ (гранты № 97-03-33158а, 96-15-97709).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Джилкрист Т. Химия гетероциклических соединений / Ред. М.А. Юровская. М.: Мир, 1996. 464 с.
2. Досон Р., Эллиот Д., Эллиот У., Джонс К. Справочник биохимика: Пер. с англ. М.: Мир, 1991. 544 с.
3. Nistri F., Lombardi A., D'Andrea L.D., Sanseverino M., Maglio O., Pavone V. // Biopolymers (Peptide Science). 1998. V. 47. P. 5–22.
4. Mansuy D., Battioni P. // Metalloporphyrins in Catalytic Oxidations / Ed. R.A. Sheldon. N.Y.: Marcel Dekker, 1994. P. 99–132.
5. Murata M., Yasuda H., Baba Y. // Yakugaku Zasshi. 1975. V. 95. P. 659–664.
6. Vodnyanszky L., Marton A., Venkei I. // Biochim. Biophys. Acta. 1985. V. 835. P. 411–414.
7. Лыско А.И., Лукьянова Л.Д., Дудченко А.М., Арутюнян А.М., Журавлева Д.В., Кулиш М.А., Мионов А.Ф., Евстигнеева Р.П. // Докл. АН. 1990. Т. 315. С. 500–504.
8. Евстигнеева Р.П., Рожкова Е.А., Желтухина Г.А., Лыско А.И. // Докл. АН. 1995. Т. 342. С. 407–409.
9. Рожкова Е.А., Евстигнеева Р.П., Желтухина Г.А. // Кинетика и катализ. 1999. Т. 40. С. 256–260.

10. Молокоедов А.С., Филиппович Е.И., Евстигнеева Р.П., Казакова Н.А. // Журн. общей химии. 1977. Т. 47. С. 1165.
11. Ernster L. // Methods in Enzymology. N.Y.: Acad. Press, 1967. V. 10. P. 574–580.
12. Tappel A.L. // Arch. Biochem. Biophys. 1953. V. 44. P. 378–395.
13. Ernster L.C.B., Fridovich I. // Anal. Biochemistry. 1971. V. 44. P. 276–287.
14. Falk J.E. Porphyrins and Metalloporphyrins. Amsterdam; London; N.Y.: Elsev. Pub. Corp., 1964.
15. Adler A.D., Londo F.R., Goldmacher J., Assour J., Korsakoff B. // J. Org. Chem. 1967. V. 32. P. 467.
16. Dolphin D. The Porphyrins. V. 1. Structure and Synthesis. N.Y.; San Francisco; London: Acad. Press, 1978.
17. Гаппоник П.Н., Каравай В.П., Григорьев Ю.В. // Химия гетероциклических соед. 1985. № 1. С. 1521–1524.

The Synthesis and Antioxidant Activity of Azole Derivatives of Hemin

E. A. Rozhkova^{##}, A. I. Lysko^{**}, K. V. Kuleshov^{*}, and R. P. Evstigneeva^{*}

^{*}Lomonosov State Academy of Fine Chemical Technology, pr. Vernadskogo 86, Moscow, 117571 Russia

^{**}Research Institute of Pharmacology, Russian Academy of Medical Sciences,
ul. Baltiiskaya 8, Moscow, 125315 Russia

New derivatives of proto- and deuterohemin IX containing tri- and tetrazole rings were synthesized and characterized. A pronounced antioxidant activity was found for these compounds in the Fe(II)/ascorbate-dependent system of lipid peroxidation in murine liver homogenates.

Key words: hemin; azoles, synthesis, antioxidant activity; lipid peroxidation; liver homogenates

[#] To whom correspondence should be addressed; e-mail: e_rozhkova@yahoo.com; phone: +7 (095) 434-8544.

For the full text of English translation of this article, see *Russian Journal of Bioorganic Chemistry*, 2000, vol. 26, no. 6. It is also available (free) in PDF format through the Web Site <http://www.maik.rssi.ru/>.