

УДК 547.793.4

*А.М.ДЕМЧЕНКО, д-р фармац. наук, проф., В.О.ЯНЧЕНКО,
О.С.СМОЛЬСЬКИЙ, канд. біол. наук., В.О.АГЕЄВ,
М.О.ЛОЗИНСЬКИЙ, д-р хім. наук, акад. НАН України*

*Науково-дослідний центр «Фармадем»,
Чернігівське обласне комунальне підприємство «Ліки України»,
Чернігівський державний педагогічний університет ім. Т.Г.Шевченка,
Інститут органічної хімії НАН України*

СИНТЕЗ ТА АНТИОКСИДАНТНА АКТИВНІСТЬ ОСНОВ МАННІХА 4-АРИЛІДЕНАМІНО-4Н-1,2,4-ТРИАЗОЛ-3-ТІОЛІВ

В основі розвитку патологічних процесів організму знаходиться оксидативний стрес, який виникає внаслідок зміщення окисно-відновного гомеостазу у бік прооксидантної компоненти. Характерною ознакою цих процесів може бути інтенсифікація реакцій пероксидного окиснення ліпідів, яке, як відомо [3], є одним з найбільш загальних механізмів пошкодження клітинних структур, зокрема біологічних мембран. В організмах тварин за цих умов активуються компенсаторно-адаптивні реакції, що забезпечують зниження рівня продуктів вільнорадикального окиснення речовин та підтримування їх вмісту в нормі [1].

Інтенсивне вивчення окиснювальних процесів в організмі в останні роки пов'язано з накопиченням даних, які свідчать про те, що стресорні або екстремальні фактори, зокрема отруєння організму ксенобіотиками та іншими речовинами антропогенного походження, призводять до зміщення балансу в системі «прооксиданти—антиоксиданти», внаслідок чого і створюються умови для формування оксидативного стресу [9, 10].

У процесі розвитку окисного стресу відбувається утворення оксиду азоту (II) з його подальшим перетворенням у більш токсичний пероксинітрилрадикала (ONOO•) шляхом зв'язування оксиду азоту (II) з супероксидрадикалом [2]. Саме гіперпродукція ONOO• викликає «нітрозуючий стрес», який є однією з важливих ланок окисного стресу і може призводити до посттрансляційної модифікації білкових молекул та окиснення ліпідних компонентів мембран.

Слід відмітити, що NO• є універсальним регулятором метаболічних процесів у клітинах тварин та людини. Він може утворюватися під час екзогенного надходження в організм органічних нітрозосполук з лікарських засобів; з оксидів азоту (II), що потрапляють в атмосферу з опалювальних систем та двигунів внутрішнього згорання, а звідти в організм інгаляційним шляхом, а також з харчових продуктів та води [9].

На теперішній час існує значна кількість даних, які свідчать про винятково важливу роль оксиду азоту (II) у регуляції основних життєво важливих процесів. Синтезований NO-синтазами (NOS) пероксинітрилрадикал регулює функціонування системи транспорту газів [5], імунної реактивності у відповідь на інфікуючі агенти, бере участь у передачі сигналів у мозку, регулює функціонування серцево-судинної, травної та сечостатевої системи.

Оксид азоту (II) відіграє важливу роль у формуванні природної резистентності організму, стійкості до різноманітних супресорних факторів, у т.ч. до критичних і токсичних станів, які супроводжують майже всі патологічні процеси [6].

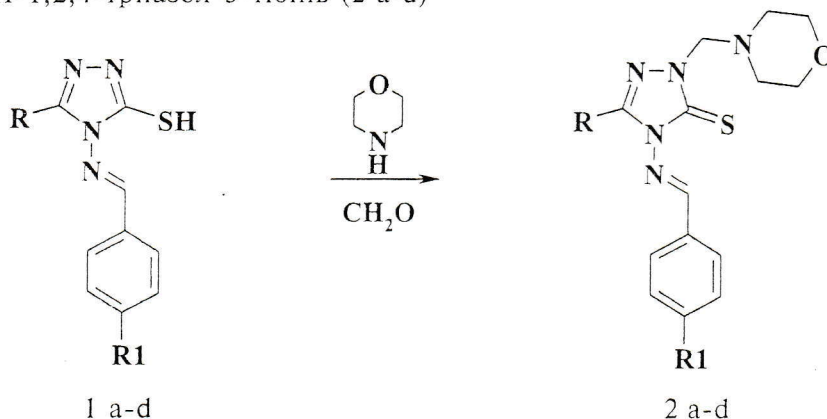
© Колектив авторів, 2004

За нормальних умов концентрація оксиду азоту (II) в організмі низька. Патологічні стани, що супроводжуються запальними процесами, і гіпоксичний стрес характеризуються збільшенням оксиду азоту (II) [7]. Хоча позитивна дія оксиду азоту (II) як азотогенного фактора при цьому не викликає сумніву, все більш очевидним стає той факт, що надмірне утворення цього радикала в організмі спричиняє низку метаболічних порушень. Це зумовлено ушкодженням функціонально важливих структурних компонентів клітин реактивними окислами азоту (NO^- , NO_2^- , N_2O_3 , ONOO^-), що утворюються з оксидом азоту (II).

Усе більш очевидним стає необхідність пошуку природних і синтезу нових потенційних регуляторів процесів генерації та шляхів перетворення оксиду азоту (II) в організмі. Подібні біологічно активні речовини у подальшому можна використовувати для корекції метаболічних порушень, пов'язаних з біологічним проявом вільного радикала оксиду азоту (II) та інших продуктів, які за умов патології і викликають окисний та «нітрозуючий» стрес.

Метою даної роботи був синтез речовин з антирадикальними властивостями та вивчення їх впливу на систему неферментативного утворення оксиду азоту (II) в дослідях *in vitro* за умов штучного окисного стресу.

На основі 4-ариліденаміно-4-меркапто-4H-1,2,4-триазолів 1 a-d в умовах реакції Манніха синтезовано ряд 1-морфолінометил-4-ариліденаміно-4,5-дигідро-1H-1,2,4-триазол-5-тіонів (2 a-d)



Для сполук 1, 2a: $\text{R}=\text{CH}_3$, $\text{R}_1=\text{OCH}_3$; b — $\text{R}=\text{CF}_3$, $\text{R}_1=\text{OCH}_3$; c — $\text{R}=\text{CF}_3$, $\text{R}_1=\text{F}$; d — $\text{R}=\text{CF}_3$, $\text{R}_1=\text{H}$.

Будову синтезованих сполук було підтверджено даними ПМР спектроскопії. Так, для сполук 2 a-d характерною особливістю є наявність сигналів морфолінового фрагменту молекули у вигляді двох триплетів при 2,68—2,75 м.д. та 3,55—3,59 м.д., двопротонного синглету NCH_2N -групи у ділянці 5,02—5,17 м.д. та однопротонного синглету CH -групи у ділянці 9,63—9,91 м.д. Протони арильних та інших замісників резонують з відповідною мультиплетністю в характеристичних ділянках спектра.

Антирадикальну активність синтезованих сполук оцінювали за ступенем інгібування активних форм оксиду азоту (II) *in vitro* за методом [8] в нашій модифікації. Метод ґрунтується на здатності натрію нітропрусиду до автоокиснення під дією світла з утворенням оксиду азоту (II) [4].

Індукцію оксиду азоту (II) викликали дією на проби з натрію нітропрусидом світла з люмінесцентного джерела потужністю 40 Вт. Опромінення проводили протягом 60 хв при 20 °С. Інкубаційна суміш містила натрію нітропрусид, аскорбінову кислоту і досліджувані речовини в концентраціях від 10^{-5} до 10^{-10} моль/л. Ефективність гальмування утворення активних форм оксиду азоту (II) визначали за інгібуванням окиснення аскорбінової кислоти

шляхом реєстрації зміни оптичної густини розчину при 265 нм на спектрофотометрі ЛОМО СФ-26. Антирадикальну активність виражали у відсотках інгібування окиснення аскорбату. Для врахування поглинання світла досліджуваними речовинами оптичну густину розчинів вимірювали до та після інкубації.

Результати досліджень, проведених *in vitro*, показали, що всі синтезовані сполуки (табл. 1, 2) при певних концентраціях мають різною мірою виражену антирадикальну активність на моделі утворення оксиду азоту (II) при автоокисненні натрію нітроприсуду (табл. 3).

Таблиця 1

Характеристики сполук 2 а-д

Сполука	Вихід, %	Т.топл., °С	Знайдено, %		Емпірична формула	Вираховано, %	
			N	S		N	S
2a	86	126	20,1	9,47	$C_{16}H_{21}N_3O_2S$	20,2	9,23
2b	81	104	17,3	8,13	$C_{16}H_{18}F_3N_3O_2S$	17,5	7,99
2c	76	123	18,2	8,07	$C_{15}H_{15}F_4N_3OS$	18,0	8,23
2d	69	86	18,8	8,66	$C_{15}H_{16}F_3N_3OS$	18,9	8,63

Таблиця 2

Спектральні характеристики сполук 2 а-д

Сполука	ПМР спектр (ДМСО- d_6) δ , м.д.					
	NCH_2 , т (4H)	OCH_2 , т (4H)	NCH_2N , с (2H)	CH , с (1H)	Н аром.	інші сигнали
2a	2,68	3,55	5,02	9,63	7,13 та 7,87 д-д (4H)	2,37(3H,с, CH_3); 3,85(3H,с, OCH_3)
2b	2,74	3,59	5,17	9,67	7,16 та 7,87 д-д (4H)	3,87 (3H,с, OCH_3)
2c	2,75	3,57	5,17	9,91	7,44 та 8,02 д-д (4H)	
2d	2,75	3,58	5,17	9,91	7,59–7,91 м (5H)	

Встановлено, що антирадикальна активність досліджуваних речовин істотно залежить як від радикала R на гетероциклі, так і від радикала R_1 у бензольному ядрі. Так, сполуки 2a і 2b з $R_1 = OCH_3$ достовірно мають пік антирадикальної активності при концентрації 10^{-9} – 10^{-10} моль/л. У той же час у сполуки 2a з метиловою групою у третьому положенні гетероциклічної системи цей пік на 9,8–11,3 % менший, ніж у сполуки 2b з трифторметилом у цьому ж положенні (табл. 3).

Сполуки 2c (з атомом фтору у бензольному ядрі) та 2d (без замісника) проявляють пік антиоксидантної активності при концентрації 10^{-8} моль/л, достовірно не відрізняючись при цьому одна від одної.

Для всіх синтезованих речовин характерна досить висока прооксидантна активність у концентрації 10^{-5} моль/л, а для речовин 2a і 2b — і в концентрації 10^{-6} моль/л.

Таким чином, найсуттєвішими антиоксидантами з вищезазначених речовин є речовини 2b та, особливо, 2d. Остання згідно з даними, наведеними в табл. 3, має найбільші значення інгібування аутоокиснення натрію нітроприсуду, що, на нашу думку, може бути обумовлено наявністю незаміщеного протона в положенні R_1 . При цьому всі речовини мають позитивні значення антирадикальної активності і можуть бути рекомендовані для подальших досліджень як антиоксиданти. У той же час речовину 2a в концентрації 10^{-5} моль/л можна використовувати при вивченні системи ПОЛ клітини в токсикологічних та фармакологічних дослідженнях як прооксидант. Крім того, аналізуючи характер, структурні особливості та вплив замісників R та R_1 на анти- та прооксидантні властивості речовин 2 а-д, вважаємо, що найбільше значення мають структура та властивості замісників R у третьому положенні гетероциклічної системи. Наявність же замісників R_1 у бензольному ядрі суттєво не впливає

Таблиця 3

Антирадикальна активність синтезованих сполук

Сполука	Концентрація, моль/л	Оптична густина			АРА, %
		до інкубації	після інкубації	зміна оптичної густини	
2a	Контроль	0,532 ± 0,023	0,100 ± 0,008	0,432	0,0
	10 ⁻⁵	1,134 ± 0,115	0,196 ± 0,006	0,938	-117,1*
	10 ⁻⁶	0,692 ± 0,016	0,125 ± 0,005	0,567	-31,3*
	10 ⁻⁷	0,550 ± 0,008	0,082 ± 0,004	0,468	-8,3
	10 ⁻⁸	0,446 ± 0,012	0,080 ± 0,003	0,366	15,3*
	10 ⁻⁹	0,458 ± 0,002	0,089 ± 0,005	0,369	14,6*
	10 ⁻¹⁰	0,436 ± 0,008	0,084 ± 0,010	0,352	18,5*
2b	Контроль	0,468 ± 0,011	0,093 ± 0,005	0,375	0,0
	10 ⁻⁵	0,748 ± 0,026	0,202 ± 0,005	0,546	-45,6*
	10 ⁻⁶	0,470 ± 0,006	0,094 ± 0,006	0,376	-0,3
	10 ⁻⁷	0,434 ± 0,006	0,086 ± 0,003	0,348	7,2
	10 ⁻⁸	0,396 ± 0,010	0,084 ± 0,002	0,312	16,8*
	10 ⁻⁹	0,352 ± 0,007	0,074 ± 0,002	0,278	25,9*
	10 ⁻¹⁰	0,358 ± 0,007	0,089 ± 0,005	0,269	28,3*
2c	Контроль	0,336 ± 0,010	0,109 ± 0,003	0,227	0,0
	10 ⁻⁵	0,768 ± 0,023	0,408 ± 0,005	0,360	-58,6*
	10 ⁻⁶	0,632 ± 0,047	0,194 ± 0,008	0,438	-93,0*
	10 ⁻⁷	0,370 ± 0,018	0,153 ± 0,009	0,217	4,4
	10 ⁻⁸	0,324 ± 0,014	0,161 ± 0,009	0,163	28,2*
	10 ⁻⁹	0,272 ± 0,008	0,094 ± 0,004	0,178	21,6*
	10 ⁻¹⁰	0,290 ± 0,011	0,088 ± 0,015	0,202	11,0
2d	Контроль	0,460 ± 0,036	0,117 ± 0,017	0,343	0,0
	10 ⁻⁵	0,812 ± 0,025	0,340 ± 0,009	0,472	-37,6*
	10 ⁻⁶	0,400 ± 0,008	0,125 ± 0,008	0,275	19,8*
	10 ⁻⁷	0,336 ± 0,008	0,092 ± 0,006	0,244	28,9*
	10 ⁻⁸	0,336 ± 0,010	0,097 ± 0,005	0,239	30,3*
	10 ⁻⁹	0,350 ± 0,006	0,088 ± 0,008	0,262	23,6*
	10 ⁻¹⁰	0,356 ± 0,003	0,083 ± 0,008	0,273	20,4*

*Антирадикальна/прооксидантна активність статистично достовірна ($p < 0,05$).

при цьому на досліджувані властивості даних сполук, що підтверджується властивостями сполуки 2d.

Експериментальна частина

Спектри ЯМР ¹H синтезованих сполук записано на приладі Bruker-300, робоча частота — 300 МГц, розчинник — ДМСО-d₆, внутрішній стандарт — ТМС.

Загальна методика синтезу 4-бензиліденаміно-1-морфолінометил-4,5-дигідро-1H-1,2,4-триазол-5-тіолів 2 a-d. До розчину 0,01 моль 4-бензиліденаміно-3-меркапто-4H-1,2,4-триазолу 1 a-d у 20 мл етанолу додають по 0,01 моль формаліну та морфоліну. Реакційну суміш кип'яють 3 год і охолоджують. Додають 50—60 мл води, осад, що випав, відфільтровують, промивають водою і сушать. Кристалізують з пропанолу-2. Фізико-хімічні та спектральні характеристики сполук 2 a-d наведено в табл. 1 та 2.

Висновки

1. На основі 4-ариліденаміно-4-меркапто-4Н-1,2,4-триазолів синтезовано ряд 1-морфолінометил-4-ариліденаміно-4,5-дигідро-1Н-1,2,4-триазол-5-тіонів.

2. Синтезовані сполуки проявляють антирадикальну та прооксидантну активність на моделі інгібування утворення оксиду азоту (II) *in vitro*, яка обумовлена структурними особливостями речовин та їх концентраційними властивостями.

3. Усі речовини можуть бути використані як типові антиоксиданти в концентраціях від 10^{-10} до 10^{-8} моль/л, а сполука 2а — як прооксидант в концентрації 10^{-5} моль/л.

1. Барабой В.А. Перекисное окисление липидов и радиация. — К.: Наук. думка, 1991. — 253 с.
2. Бленічев І.Ф., Коваленко С.І., Карпенко О.В. та ін. // Ліки. — 2002. — № 5—6. — С. 75—80.
3. Владимиров Ю.А., Арчаков А.И. Перекисное окисление липидов в биологических мембранах. — М.: Наука, 1972. — 257 с.
4. Губен—Вейль. // Методы органической химии. — 2-е изд., стер. — Т. 2. Методы анализа. — М.: Химия, 1967. — 1032 с.
5. Коробов В.М. // Укр. біохім. журн. — 2001. — Т. 73, № 4. — С. 13—18.
6. Малишев І.Ю., Манухина Е.Б. // Биохимия. — 1998. — Т. 63, № 7. — С. 992—1006.
7. Малишев І.Ю., Манухина С.И., Смирнов Е.В. и др. // Изв. РАН. Сер. биол. — 1999. — № 2. — С. 211—215.
8. Методи оцінки антиоксидантної активності речовин при ініціюванні вільнорадикальних процесів у дослідях *in vitro*: Метод. рекомендації. — К.: ДФЦ МОЗ України, 2002. — 26 с.
9. Реутов В.П. // Успехи биол. химии. — 1995. — Т. 35. — С. 189—228.
10. Fulton B., Jeffery E.H. // Toxicol. And Appl. Pharmacol. — 1994. — Vol. 127, № 1. — P. 291—297.
11. Lleshy S.F., Tomaro M.L. // Biochim. Et biophys. Acta. — 1994. — Vol. 1223, № 1. — P. 9—14.

Надійшла до редакції 12.12.2003.

А. М. Демченко, В. А. Янченко, А. С. Смольський,
В. О. Агеев, М. О. Лозинський

СИНТЕЗ И АНТИОКСИДАНТНАЯ АКТИВНОСТЬ ОСНОВАНИЙ МАННИХА 4-АРИЛИДЕНАМИНО-4Н-1,2,4-ТРИАЗОЛ-3-ТИОЛОВ

Исходя из 4-бензилиденамино-3-меркапто-4Н-1,2,4-триазолов синтезирован ряд 1-морфолінометил-4-ариліденаміно-4,5-дигідро-1Н-1,2,4-триазол-5-тіонів. Для последних изучена антирадикальная и антиоксидантная активность на модели ингибирования образования оксида азота *in vitro*.

А. М. Demchenko, V. O. Yanchenko, O. S. Smolskiy,
V. O. Aheyev, M. O. Lozynskiy

SYNTHESIS AND ANTIOXIDAZING ACTIVITY OF MANNICH BASE DERIVE FROM 4-ARYLIDENAMINO-4H-1,2,4-TRIAZOL-3-THIOL

SUMMARY

Originating from 4-arylideneamino-4H-1,2,4-triazol-3-thioles we have synthesized the series of 1-morpholinomethyl-4-arylideneamino-4,5-dihydro-1H-1,2,4-triazole-5-thiones.

These compounds reveal antiradical and oxidizing agent activity on the model of inhibition of Nitrogen oxide formation *in vitro*.

