

УДК 547-31/-39+542.978+547.56+547.57+547.822.3+547.732

ИССЛЕДОВАНИЕ АНТИОКСИДАНТНОЙ АКТИВНОСТИ НОВЫХ СОЕДИНЕНИЙ С 1,3-ТИАЗИН-2-ДИОНОВЫМ И ПИРРОЛИДИНОВЫМ ФРАГМЕНТАМИ[§]

© 2021 г. В. П. Осипова^{1,*}, М. А. Половинкина¹, М. Н. Коляда¹, А. Д. Осипова²,
Н. Т. Берберова², А. В. Великородов³

Представлено академиком РАН М.П. Егоровым 18.10.2021 г.

Поступило 16.07.2021 г.

После доработки 27.09.2021 г.

Принято к публикации 20.10.2021 г.

В модельной системе аутоокисления адреналина в щелочной среде, в ДФПГ-, НСТ-, CUPRAC-тестах исследована антиоксидантная активность новых соединений с 1,3-тиазин-2-дионовым и пирролидиновым фрагментами в сравнении с 2,6-ди-*трет*-бутил-4-меркаптофенолом. В ряду исследуемых соединений выявлен лидер, обладающий умеренной антирадикальной активностью в отношении ДФПГ-радикала, препятствующий накоплению токсичных продуктов хиноидного окисления адреналина и являющийся более эффективным одноэлектронным Cu^{2+} -восстанавливающим агентом, по сравнению с известными антиоксидантами – тролоксом и 2,6-ди-*трет*-бутил-4-меркаптофенолом.

Ключевые слова: 1,3-тиазин-2-дионовый фрагмент, пирролидин, ДФПГ-тест, CUPRAC-тест, НСТ-тест, антиоксидантная активность, адреналин, ксантиноксидаза, супероксид анион-радикал

DOI: 10.31857/S2686953521050137

Многофакторная природа различных патологий, сопряженных с развитием окислительного стресса, обуславливает актуальность целенаправленного поиска новых эффективных полифункциональных терапевтических препаратов, в том числе ингибиторов окислительных процессов [1–3]. Перспективным классом терапевтических средств с антиоксидантной активностью являются азот-, серосодержащие гетероциклы, в том числе производные 1,3-тиазина [4–6], а также пирролидина [7–9], который в последнее время рассматривается в качестве универсального каркаса для создания новых биологически активных соединений. Среди производных данных гетероциклов выявлены соединения, обладающие широким

спектром биоактивности, в том числе антиоксидантным действием.

Сочетание в структуре молекулы нескольких фармакофорных фрагментов, обладающих различным механизмом антиоксидантного действия, увеличивает вероятность возникновения внутримолекулярного синергического эффекта их антиокислительной активности. В качестве таких фармакофоров могут рассматриваться производные гидразинкарбоксамида, карбаматов. Ранее было установлено, что присутствие в структуре соединения гидразинкарбоксамидной группы в сочетании с другими фармакофорами наряду с антиоксидантной активностью обеспечивает проявление соединениями и других видов активности (антигликирующей, антибактериальной, противосудорожной, противотуберкулезной, противоопухолевой) [10–12]. Выявление антиоксидантных свойств карбаматов, обладающих ингибирующей активностью в отношении таких ферментов, как холинэстеразы и моноаминоксидазы, важно с точки зрения создания мультитаргетных препаратов, действующих одновременно на несколько молекулярных мишеней, участвующих в патогенезе многих нейродегенеративных заболеваний [13, 14].

В связи с этим в работе изучена антиоксидантная активность новых гетероциклических соеди-

[§] Работа представлена в виртуальный выпуск “Молодые ученые РАН”

¹ Федеральный исследовательский центр Южный научный центр Российской академии наук, 344006 Ростов-на-Дону, Россия

² Астраханский государственный технический университет, 414056 Астрахань, Россия

³ Астраханский государственный университет, 414056 Астрахань, Россия

*E-mail: osipova_vp@mail.ru

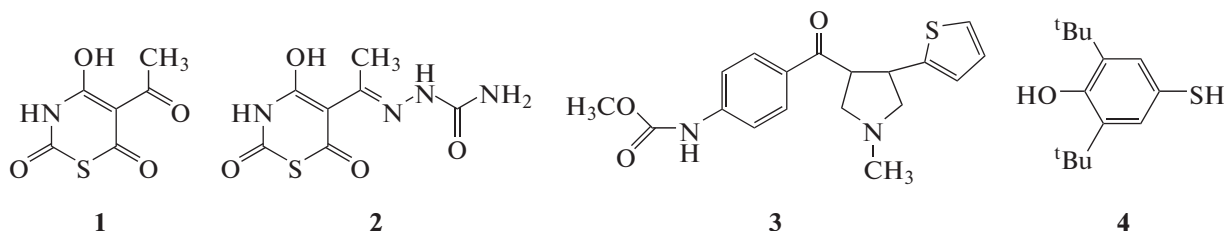


Рис. 1. Структурные формулы соединений: **1** – 5-ацетил-4-гидрокси-2H-1,3-тиазин-2,6(3H)-дион, **2** – 2-[(E)-1-(4-гидрокси-2,6-диоксо-3,6-дигидро-2H-1,3-тиазин-5-ил)этилиден]-1-гидразинкарбоксамид, **3** – метил-N-(4-{4-[4-(2-тиенил)-1-метилтетрагидро-1H-пиррол-3-ил]карбонил}фенил)карбамат, **4** – 2,6-ди-*т*-бутил-4-меркаптофенол.

нений **1–3** (рис. 1) в сравнении с активностью известного синтетического пространственно-затрудненного фенольного антиоксиданта 2,6-ди-*т*-бутил-4-меркаптофенола (**4**) (Sigma-Aldrich).

Соединение **1** получено конденсацией малоновой кислоты, тиоцианата калия и уксусного ангидрида в ледяной уксусной кислоте по методике, приведенной в работе [15]. Синтез соединения **3** осуществлен трехкомпонентной конденсацией соответствующего халкона с саркозином и параформом при кипячении в толуоле в течение четырех часов [16].

Соединение **2** синтезировано нагреванием смеси 0.374 г (2 ммоль) 5-ацетил-4-гидрокси-2H-1,3-тиазин-2,6(3H)-диона (**1**) и 0.23 г (2 ммоль) гидрохлорида семикарбазида в 10 мл этанола в течение 5 ч. После охлаждения выпавший осадок отфильтровали, высушили на воздухе и перекристаллизовали из диоксана. Выход продукта в виде бесцветных кристаллов составил 0.52 г (97%), т. пл. 249–252°C. ИК (ν , см^{-1}): 3100–3500 (NH, OH), 1712, 1700 (C=O), 1648 (C=N). ^1H ЯМР (δ , м. д.): 1.96 с (3H, CH_3), 6.74 с (2H, NH_2), 10.48 с [1H, $\text{NH}(\text{CO})$], 11.52 с (1H, NH тиазина), 12.59 с (1H, OH). ^{13}C ЯМР (δ , м. д.): 19.2 (CH_3), 98.5 (C^5), 161.4 (CONH_2), 163.6 (C^6), 167.4 (C^4), 173.7 (C^2), 179.8 (C=N). Найдено, %: C 32.20; H 3.16; N 22.63. Вычислено для $\text{C}_7\text{H}_8\text{N}_4\text{O}_4\text{S}$, %: C 32.42; H 3.30; N 22.94.

Антирадикальная активность соединений **1–4** определена *in vitro* спектральным методом в различных модельных системах: в отношении 2,2-дифенил-1-пикрилгидразильного радикала (ДФПГ-тест) [17], в отношении супероксид анион-радикала ($\text{O}_2^{\cdot-}$), генерированного в ферментативной системе ксантин/ксантиноксидаза (НСТ-тест) [18], в системе неферментативного окисления адреналина (1-(3,4-диоксифенил)-2-метиламиноэтанол) до адренохрома в щелочной среде [19]. В данных тестовых системах рассчитана эффективность действия (ЭД) исследуемых соединений по формуле:

$$\text{ЭД (\%)} = [(1 - \Delta D_i / \Delta D_0) \times 100\%],$$

где ΔD_i – изменение оптической плотности в присутствии исследуемого соединения, ΔD_0 – изменение оптической плотности в контрольном образце (без добавок соединений). Положительное значение показателя ЭД свидетельствует о проявлении тестируемым веществом антиоксидантной активности, а отрицательное – о прооксидантной.

Восстанавливающая способность соединений **1–4** определена также в реакции переноса электрона на Cu^{2+} (CUPRAC-тест) [20] и рассчитана в эквивалентах тролокса (TEAC, *trolox equivalent antioxidant capacity*). Активность тролокса – водорастворимого аналога токоферола – принимается за единицу, а значение параметра TEAC > 1 свидетельствует о большей восстановительной активности тестируемого соединения по сравнению с тролоксом.

Известно, что ДФПГ-тест широко используется для установления антирадикальной активности потенциальных антиоксидантов. Изучение способности соединений взаимодействовать со стабильным N-центрированным хромоген-радикалом 2,2-дифенил-1-пикрилгидразилом показывает, что все соединения, кроме **3**, проявляют антирадикальную активность, взаимодействуя с ДФПГ-радикалом (табл. 1). Реакция производных 1,3-тиазина с ДФПГ-радикалом протекает по механизму гомолитического отрыва атома водорода от гидроксильной группы фенола.

Среди исследуемых гетероциклических соединений наибольшую антирадикальную активность проявляет соединение **2**, что, предположительно, объясняется возможностью образования более стабильного интермедиата в результате сопряжения в тиазиновом кольце, стабилизацией заряда атомом серы, а также присутствием в данном соединении гидразинкарбоксамидной группировки, обладающей антиоксидантной активностью. При этом активность соединения **2** в данной модельной системе в 2 раза ниже активности 2,6-ди-*т*-бутил-4-меркаптофенола **4**.

Изучение восстанавливающей активности соединений **1–4** показало, что 1,3-тиазин производное соединения **2** является более активным восста-

Таблица 1. Антиоксидантная активность соединений 1–4

Соединение	Эффективность действия (ЭД), (%)			TEAC _{CUPRAC} ^б
	ДФПГ-тест ^а	НСТ-тест ^а	система аутоокисления адреналина ^б	
1	7.17 ± 0.02	–63.60 ± 0.11	–12.5 ± 0.01	0.06 ± 0.01
2	40.92 ± 0.05	неактивно	61.1 ± 0.02	1.57 ± 0.09
3	–0.90 ± 0.04	–80.32 ± 0.15	31.3 ± 0.03	неактивно
4	90.40 ± 0.25	45.70 ± 0.07	43.1 ± 0.06	0.74 ± 0.04

Концентрация соединений в тестовой системе: ^а 100 мкМ; ^б 25 мкМ.

навливающим агентом, по сравнению с тролоксом, в 1.57 раза, а соединения **1** и **3** не восстанавливают Cu²⁺ в данной модельной системе. Необходимо отметить, что протекание реакции восстановления Cu²⁺ антиоксидантами в реальной биосистеме может обуславливать их прооксидантную активность [21].

Изучение антирадикальной активности соединений **1–4** в отношении O₂^{•–}, образующегося в ферментативной системе ксантин/ксантиноксидаза (НСТ-тест), показало, что, в отличие от меркаптофенола **4**, соединение **2** не проявляет активность в отношении данной активной формы кислорода (АФК), а для соединений **1** и **3** установлено промотирование восстановления супероксидом нитросинего тетразолия до формазана, по сравнению с контрольным экспериментом. Супероксид-перехватывающая активность соединения **4** обусловлена возможностью окисления HO- и HS-групп анион-радикалом O₂^{•–} с образованием стабильных ароксильных и тиильных радикалов [22, 23]. Следует заметить, что промотирующее влияние соединений **1** и **3** на восстановление нитросинего тетразолия может быть связано с их способностью повышать активность фермента ксантиноксидазы [24].

В модельной системе аутоокисления адреналина в щелочной среде зафиксирована антиоксидантная активность всех соединений за исключением **1**, в присутствии которого промотируется накопление адренохрома. При этом ингибирующая активность соединения **2** значительно превышает активность антиоксиданта **4**. Учитывая тот факт, что при окислении адреналина в щелочной среде, кроме O₂^{•–} и пероксида водорода, образуются и другие АФК: анион-радикалы диоксида углерода и бикарбонатные анион-радикалы [25, 26], выявленная ингибирующая активность соединений в данной системе свидетельствует об их брутто-ингибирующей активности в отношении указанных радикалов.

Таким образом, проведенное исследование антиоксидантной активности новых гетероцик-

лических соединений **1–3** позволило выявить соединение-лидер **2**, активность которого превысила активность реперного антиоксиданта в модельных системах аутоокисления адреналина и в CUPRAC-тесте. Данное производное 1,3-триазины обладает умеренной антирадикальной активностью в отношении ДФПГ-радикала, препятствует накоплению токсичных продуктов хиноидного окисления адреналина, является более эффективным одноэлектронным восстанавливающим агентом по сравнению с известными антиоксидантами — тролоксом и 2,6-ди-*трет*-бутил-4-меркаптофенолом. Для создания на основе соединения **2** новых эффективных и безопасных мультитаргетных препаратов для терапии заболеваний, имеющих многофакторную природу, необходимы дальнейшие исследования активности данного соединения.

ИСТОЧНИКИ ФИНАНСИРОВАНИЯ

Работа выполнена при поддержке гранта РФФИ № 19-03-00006а (ДФПГ- и CUPRAC-тесты); в рамках госзадания, рег. № 01201354245 (НСТ-тест, аутоокисление адреналина).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Li W., Yang X., Song Q., Cao Z., Shi Y., Deng Y., Zhang L. // Bioorg. Chem. 2020. V. 97. P. 103107. <https://doi.org/10.1016/j.bioorg.2020.103707>
- Unzeta M., Esteban G., Bolea I., Fogel W.A., Ramsay R.R., Youdim M.B.H., Tipton K.F., Marco-Contelles J. // Front. Neurosci. 2016. V. 10. № 1. Article 205. <https://doi.org/10.3389/fnins.2016.00205>
- Bawa P., Pradeep P., Kumar P., Choonara Y.E., Modi G., Pillay V. // Drug Discov. Today. 2016. V. 21. № 12. P. 1886–1914. <https://doi.org/10.1016/j.drudis.2016.08.001>
- Alshamarri M.B., Mohamed A.H., Aly A.A., Bakht M.A., El-Sheref E.M. // J. Sulfur Chem. 2021. V. 42. № 3. P. 346–357. <https://doi.org/10.1080/17415993.2021.1887190>
- Ramos Rodríguez O.A., Magaña Vergara N.E., Mojica Sánchez J.P., Sumaya Martínez M.T., Sandoval Z.G., Cruz A., Organillo Á.R. // J. Mol. Struct. 2020. V. 1199.

- P. 127036.
<https://doi.org/10.1016/j.molstruc.2019.127036>
6. *Bedum S., Bedum A., Sujatha D., Bharathi K.* // Saudi J. Med. Pharm. Sci. 2016. V. 1–2. P. 326–338.
<https://doi.org/10.21276/sjimps.2016.2.12.2>
 7. *Petri G.L., Raimondi M.V., Spanò V., Holl R., Barraja P., Montalbano A.* // Top. Curr. Chem. 2021. V. 379. P. 34.
<https://doi.org/10.1007/s41061-021-00347-5>
 8. *Bhat C., Tilve S.G.* // RSC Adv. 2014. V. 4. P. 5405–5452.
<https://doi.org/10.1039/C3RA44193H>
 9. *Osipova V.P., Berberova N.T., Gazzaeva R.A., Kudryavtsev K.V.* // Cryobiology 2016. V. 72. P. 112–118.
<https://doi.org/10.1016/j.cryobiol.2016.02.006>
 10. *Beraldo H., Gambino D.* // Mini-Rev. Med. Chem. 2004. V. 4. № 1. P. 31–39.
<https://doi.org/10.2174/1389557043487484>
 11. *Arshia Fayyaz S., Shaikh M., Khan K.M., Choudhary M. I.* // J. Biomol. Struct. Dyn. 2021.
<https://doi.org/10.1080/07391102.2021.1897045>
 12. *Qazi S.U., Naz A., Hameed A., Osra F.A., Jalil S., Iqbal J., Shah S.A.A., Mirza A.Z.* // Bioorg. Chem. 2021. V. 115. 105209.
<https://doi.org/10.1016/j.bioorg.2021.105209>
 13. *Kurt B.Z., Gazioglu I., Kandas N.O., Sonmez F.* // ChemistrySelect. 2018. V. 3. P. 3978–3983.
<https://doi.org/10.1002/slct.201800142>
 14. *Yanovsky I., Finkin-Groner E., Zaikin A., Lerman L., Shalom H., Zeeli Sh., Weill T., Ginsburg I., Nudelman A., Weinstock M.* // J. Med. Chem. 2012. V. 55. № 23. P. 10700–10715.
<https://doi.org/10.1021/jm301411g>
 15. *Yuskovets V.N., Moskvina A.V., Mikhailov L.E., Ivin B.A.* // Russ. J. Gen. Chem. 2005. 75. P. 134–146.
<https://doi.org/10.1007/s11176-005-0185-2>
 16. *Velikorodov A.V., Stepkina N.N., Polovinkina M.A., Osipova V.P.* // Rus. J. Org. Chem. 2019. V. 55. P. 999–1004.
<https://doi.org/10.1134/S1070428019070157>
 17. *Brand-Williams W., Cuvelier M.E., Berset C.* // Food Sci. Technol. Int. 1995. V. 28. P. 25–30.
[https://doi.org/10.1016/S0023-6438\(95\)80008-5](https://doi.org/10.1016/S0023-6438(95)80008-5)
 18. *Toda S., Kumura M., Ohnishi M.* // Planta Med. 1991. V. 57. P. 8–10.
<https://doi.org/10.1055/s-2006-960005>
 19. *Sirota T.V., Miroshnikov A.I., Novikov K.N.* // Biophysics. 2010. T. 55. № 6. P. 911–915.
<https://doi.org/10.1134/S0006350910060047>
 20. *Apak R., Güglü K., Özyürek M., Karademir S.E.* // J. Agric. Food Chem. 2004. V. 52. P. 7970–7981.
<https://doi.org/10.1021/jf048741x>
 21. *Halliwel B., Gutteridge J.M.C.* // Methods Enzymol. 1990. V. 186. P. 1–85.
[https://doi.org/10.1016/0076-6879\(90\)86093-b](https://doi.org/10.1016/0076-6879(90)86093-b)
 22. *Osipova V., Polovinkina M., Gracheva Yu., Shpakovsky D., Osipova A., Berberova N.* // Arab. J. Chem. 2021. V. 14. 103068.
<https://doi.org/10.1016/j.arabjc.2021.103068>
 23. *Osipova V., Polovinkina M., Osipova A., Gracheva Yu., Okhlobystin A.* // Turk. J. Chem. 2019. V. 43. P. 1336–1349.
<https://doi.org/10.3906/kim-1904-40>
 24. *Сумбаев В.В., Розанов А.Я.* // Укр. биохим. журн. 1998. 70. № 6. С. 47–52.
 25. *Супота Т.В.* // Биомед. химия. 2015. Т. 61. № 1. С. 115–124.
<https://doi.org/10.18097/pbmc20156101115>
 26. *Половинкина М.А., Коляда М.Н., Осипова В.П., Берберова Н.Т., Чукичева И.Ю., Шумова О.А., Кучин А.В.* // Доклады АН. 2019. Т. 484. № 5. С. 48–51.
<https://doi.org/10.1134/S001250081902006X>

STUDY OF THE ANTIOXIDANT ACTIVITY OF NEW COMPOUNDS WITH 1,3-THIAZINE-2-DIONE AND PYRROLIDINE FRAGMENTS

V. P. Osipova^{a, #}, M. A. Polovinkina^a, M. N. Kolyada^a, A. D. Osipova^b,
 N. T. Berberova^b, and A. V. Velikorodov^c

^a Federal Research Centre the Southern Scientific Centre of the Russian Academy of Sciences, Rostov-on-Don, 344006, Russian Federation

^b Astrakhan State Technical University, Astrakhan, 414056, Russian Federation

^c Astrakhan State University, Astrakhan, 414056, Russian Federation

[#]E-mail: osipova_vp@mail.ru

Presented by Academician of the RAS M.P. Egorov 18.10.2021

The antioxidant activity of new compounds with 1,3-thiazine-2-dione and pyrrolidine fragments in comparison with 2,6-di-*tert*-butyl-4-mercaptophenol was studied in a model system of adrenaline autooxidation in an alkaline medium, in NBT-assay, DPPH- and CUPRAC-test. Among the investigated compounds, a leader has been identified that has a moderate antiradical activity against DPPH-radical, prevents the accumulation of toxic products of quinoid oxidation of adrenaline and is a more effective one-electron Cu²⁺-reducing agent in comparison with the known antioxidants – trolox and 2,6-di-*tert*-butyl-4-mercaptophenol.

Keywords: 1,3-thiazine-2-dione fragment, pyrrolidine, DPPH-test, CUPRAC-test, NBT-assay, antioxidant activity, adrenaline, xanthine oxidase, superoxide anion radical