

Новый ингибитор гликозилирования белков на основе ферроцена*

Е. Р. Милаева,^{а,б*} Д. Б. Шпаковский,^а Н. Н. Мелешонкова,^а С. И. Орлова,^а Е. Ф. Шевцова,^б Л. Г. Дубова,^б
Е. Г. Киреева,^б В. А. Косолапов,^в В. А. Кузнецова,^в Д. В. Сороцкий,^в О. А. Соловьева,^в А. А. Спасов^в

^аМосковский государственный университет им. М. В. Ломоносова,
Российская Федерация, 119991 Москва, Ленинские горы, 1, стр. 3.

Факс: (495) 939 5546. E-mail: milaeva@med.chem.msu.ru

^бИнститут физиологически активных веществ Российской академии наук,
Российская Федерация, 142432 Черноголовка Московской обл., Северный пр-д, 1

^вВолгоградский государственный медицинский университет,
Российская Федерация, 400131 Волгоград, пл. Павших борцов, 1

Изучена антиоксидантная и антигликирующая активности 2,6-ди-*трет*-бутил-4-[*N*-(4-пиридилметил)иминометил]фенола (1), 2,6-ди-*трет*-бутил-4-[*N*-(3-пиридилметил)иминометил]фенола (2) и *N*-(3,5-ди-*трет*-бутил-4-гидроксифенил)иминометилферроцена (3). Показано, что антиоксидантная активность 2,6-ди-*трет*-бутилфенола с ферроценойльной группой существенно выше, чем активность соединений 1 и 2. На основе данных, полученных в сопоставлении с аминуганидином — эффективным ингибитором гликозилирования белков, установлено, что введение фрагмента ферроцена в 2,6-ди-*трет*-бутилфенол приводит к резкому возрастанию антигликирующей активности, превышающей таковую для аминуганидина.

Ключевые слова: 2,6-ди-*трет*-бутилфенол, ферроцен, пероксидное окисление липидов, антиоксидантная активность, гликозилирование белков.

Неферментативная реакция моносахаридов, в частности глюкозы со свободными аминогруппами белковых молекул *in vivo* (реакция Мейларда), сопровождается образованием химических соединений — конечных продуктов гликозилирования (КПГ)¹. Внутри- и внеклеточное накопление КПГ является важным фактором патогенеза таких заболеваний, как атеросклероз²; сердечная недостаточность; воспаление; ревматоидный артрит и остеоартрит³; нейродегенеративные заболевания, в том числе болезни Альцгеймера и Паркинсона⁴. Данный процесс особенно интенсивно протекает при сахарном диабете и является одной из причин развития осложнений^{5–7}.

В настоящее время ведется поиск лекарственных средств, действующих как ингибиторы реакции Мейларда. Интерес к поиску таких ингибиторов, снижающих образование конечных продуктов гликозилирования, т.е. обладающих антигликирующей активностью, и тем самым предотвращающих развитие осложнений сахарного диабета, неуклонно растет. Однако в клинической практике пока не существует препаратов, специфически угнетающих образование КПГ. Первым и наиболее изученным соединением, ингибирующим гликозилирование белков, является аминуганидин (АГ). Механизм антигликирующего действия аминуганидина связывают с его способностью захватывать реакционноспособные дикарбонильные интермедиаты⁸.

Реакция Мейларда является, по сути, каскадом неферментативных превращений, включающим взаимодействие аминогрупп белков, ферментов, нуклеиновых кислот и фосфолипидов с карбонильными группами восстановленных моносахаридов. В результате реакции образуются соответствующие основания Шиффа, которые подвергаются перегруппировке Амандори и дальнейшей окислительной модификации. Эти процессы индуцируются активными метаболитами кислорода, что обуславливает важную роль окислительного стресса в гликозилировании белков и других биомолекул^{9,10}. Продукты гликозилирования промотируют внутриклеточный окислительный стресс, сопровождающийся накоплением активных метаболитов кислорода, которые также вовлечены в повреждение клеточных структур¹¹. В связи с этими данными поиск ингибиторов гликозилирования биомолекул ведется в ряду антиоксидантов¹².

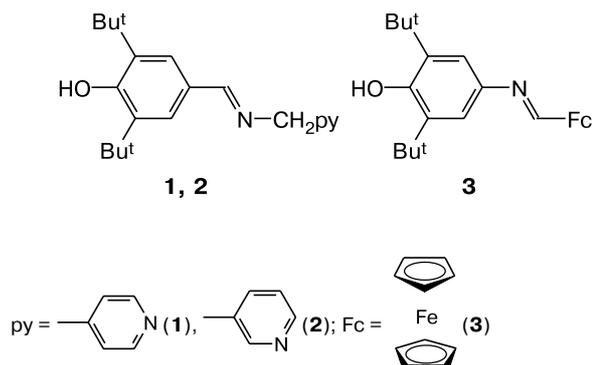
Кандидатами в лекарственные препараты являются метморфин, дипептид карнозин, пиридоксамин (витамин В₆), *N*-[2-(гидразиоиминометил)аминоэтил]ацетамид (ALT-946), 4-оксо-*N*-фенил-4,5-дигидро-2-[(1-метилэтилиден)гидразино]-5-тиазолацетамид (ОРВ-9195), *N*-фенилацетилтиазол. Интерес представляют также пирокатехины, замещенные полифенолы и другие антиоксиданты, которые взаимодействуют с реакционноспособными радикальными частицами^{8,13,14}.

В последнее время развивается новый подход в создании перспективных лекарственных препаратов, заключающийся в возможности управления актив-

* Посвящается академику Российской академии наук Н. С. Зефинову в связи с его 80-летием.

ностью физиологически активных органических соединений путем введения в их состав молекул металлоорганических фрагментов, в частности, ферроцена^{15–18}. Так, отечественный препарат Ферроцерон (натриевая соль *орто*-карбокситбензоилферроцена) известен как терапевтическое средство при железодефицитной анемии. Клинические испытания проходят Феррохин (*Ferroquine*, 7-хлор-*N*-(2-[(диметиламино)метил]ферроцил)хинолин-4-амин, SR97193, II фаза) в качестве антималярийного средства, а также модифицированный введением ферроцильной группы противоопухолевый препарат Тамоксифен — Ферроцифен (*Ferrocifen*, II фаза)¹⁵. Усиление протекторной активности аналогов ионола обнаружено при введении ферроцильной группы в производные 2,6-ди-*трет*-бутилфенола¹⁹.

В данной работе с целью поиска новых антигликирующих агентов и сравнительного исследования антиоксидантной и антигликирующей активности, а также установления влияния металлоорганического фрагмента осуществлен синтез оснований Шиффа на базе известного антиоксиданта — 2,6-ди-*трет*-бутилфенола, содержащих в *пара*-положении фрагменты пиридина (**1**, **2**) или ферроцена (**3**).



Для доказательства образования радикальных частиц окисление соединений **1–3** было изучено методом ЭПР. Антиоксидантную активность соединений оценивали как с помощью ряда модельных реакций, включая метод ABTS²⁰, основанный на способности антиоксидантов восстанавливать стабильный катион-радикал 2,2-азино-бис(3-этилбензтиазолин-6-сульфоновой кислоты) (ABTS^{•+}), так и *in vitro* на моделях аскорбат-зависимого пероксидного окисления липидов (ПОЛ) гомогенатов печени²¹ и в изолированных митохондриях печени крыс с Fe^{3+} и *трет*-бутилгидропероксидом (Bu^tOOH) в качестве индукторов ПОЛ²². В ряде тестов использовали тролокс как препарат сравнения. Кроме того, на изолированных митохондриях печени крыс оценивали влияние соединения-лидера на мембранный потенциал митохондрий и индукцию процесса скачка митохондриальной проницаемости (mitochondrial permeability transition, MPT). Реакцию гликозилирования изучали на примере бычьего сывороточного альбумина и глюкозы²³. Острую токсичность (LD_{50}) определяли *in vivo* с ис-

пользованием лабораторных животных (нелинейные мыши-самки)²⁴.

Обсуждение полученных результатов

С целью установления влияния ферроцильной группы на антиоксидантную и антигликирующую активности оснований Шиффа на основе известного антиоксиданта — 2,6-ди-*трет*-бутилфенола — осуществлен синтез и проведено сравнительное исследование свойств производных пиридина (**1**, **2**) и ферроцена (**3**).

Соединения **1** и **2** получены взаимодействием эквимолярных количеств 3,5-ди-*трет*-бутил-4-гидроксибензальдегида и пиколиламинов при кипячении с азеотропной отгонкой воды в течение 2 ч в 20 мл абсолютного бензола. Соединение **3** получали по описанной нами ранее методике²⁵. Основания Шиффа **1–3** являются кристаллическими веществами, устойчивыми на воздухе и в растворах. Их строение подтверждено данными ИК-, УФ-, ЯМР-спектроскопии и элементного анализа. В спектрах ИК и ЯМР ^1H , ^{13}C наблюдаются характеристические сигналы фрагментов фенола и замещенных ароматических колец пиридина и ферроцена. В ИК-спектрах соединений **1–3** присутствуют узкие полосы поглощения в области $3550\text{--}3650\text{ см}^{-1}$, соответствующие валентным колебаниям связи O—H пространственно-затрудненной неассоциированной группы 2,6-ди-*трет*-бутилфенола. В спектрах ЯМР ^1H соединений **1–3** в CDCl_3 наблюдаются сигналы протонов *трет*-бутильных групп в области 1.43–1.50 м.д., протонов фенольной группы в области 5.10–5.70 м.д., а также сигналы протонов ферроцильного фрагмента в области 4.26–4.81 м.д. (для соединения **3**).

Для доказательства образования радикальных частиц, ответственных за антиоксидантную активность, окисление соединений **1–3** проводили непосредственно в резонаторе спектрометра ЭПР в вакуумированных ампулах при действии PbO_2 в толуоле (табл. 1). Спектры ЭПР радикалов, зарегистрированных при окислении **1–3**, представляют собой мультиплеты, характеризующиеся взаимодействием спина неспаренного электрона с двумя эквивалентными *мета*-протонами феноксильного кольца, протонами $\text{CH}=\text{N}$ - или CH_2 -группы и ядром N . Радикальные

Таблица 1. Параметры спектров ЭПР феноксильных радикалов **1'–3'**, образующихся при окислении соединений **1–3** (толуол, PbO_2 , 290 К)

Радикал	g -Фактор	a_{N}	$a_{\text{H}}(2\text{H})$ /мТс	a_{H}	Число линий в спектре
1'	2.0049	0.316	0.17 0.19	0.48 0.29	14
2'	2.0046	0.314	0.18	0.65 0.48	14
3' (см. лит. ²⁵)	2.0055	0.59	0.10	—	9

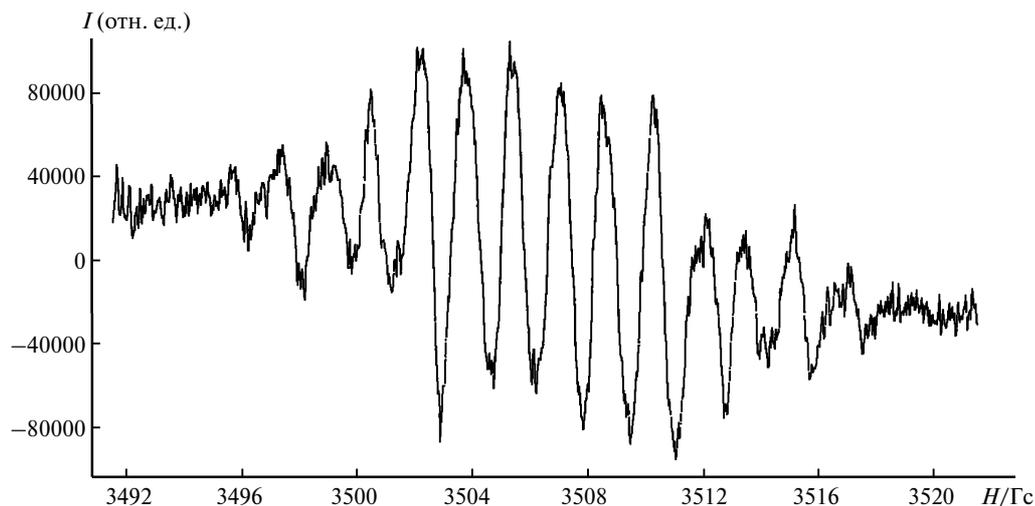


Рис. 1. Спектр ЭПР радикала, полученного при окислении соединения **1** (PbO_2 , толуол, 295 К).

частицы относительно устойчивы в течение нескольких минут. На рисунке 1 представлен спектр ЭПР феноксильного радикала, полученного при окислении соединения **1**.

По данным спектроскопии ЭПР не наблюдается взаимодействия спина неспаренного электрона с протонами ароматических колец пиридина в радикалах **1'**, **2'** и с протонами циклопентадиенильных колец ферроценильной группы в радикале **3'**. Этот факт, по-видимому, обусловлен тем, что вклад в стабилизацию радикалов вносит распределение спиновой плотности неспаренного электрона с участием связи $\text{C}=\text{N}$.

Антиоксидантную активность соединений **1–3** оценивали с помощью метода ABTS на примере модельной реакции, основанной на способности антиоксидантов восстанавливать стабильный катион-радикал 2,2-азино-бис(3-этилбензтиазолин-6-сульфоновой кислоты) ($\text{ABTS}^{\bullet+}$)²⁰ (табл. 2). В качестве соединения сравнения использовали тролокс – функциональный фрагмент природного липофильного антиоксиданта α -токоферола (витамина E). Из полученных значений IC_{50} видно, что активность соединения **3**, содержащего ферроценильную группу, превышает активность фенолов **1** и **2** в ~7.5 и 14 раз соответственно. Следует отметить, что активность соединения **3** по величине IC_{50} также превышает активность эталонного антиоксиданта тролокса в 4.3 раза. Столь существенное возрастание активности ферроценильного производного **3** может являться следствием внутримолекулярных редокс-процессов в феноксильном радикале **3'**, ответственном за проявление антиоксидантных свойств. При наличии системы сопряжения ферроценильная группа, по-видимому, выступает в качестве внутримолекулярного восстановителя нейтральной (радикал) или заряженной (катион-радикал) частиц²⁵, обеспечивая таким образом большее число циклов при действии антиоксиданта.

С целью установления вклада различных механизмов антиоксидантного действия для соединения **3** проведен комплекс исследований с использованием набора методов, определяющих возможные механиз-

Таблица 2. Антиоксидантная активность соединений **1–3**, определенная по методу ABTS (концентрации **1–3** и тролокса составляли 1–1000 мкмоль \cdot л⁻¹)

Соединение	$\text{IC}_{50}/\text{мкмоль} \cdot \text{л}^{-1}$
1	156.9 \pm 12.3
2	293.2 \pm 15.1
3	21.1 \pm 1.2
Тролокс	54.2 \pm 3.7

мы активности. К таким механизмам относятся: 1) перенос атома водорода, определяемый с помощью ДФПГ-теста на примере реакции со стабильным радикалом 1,1-дифенил-2-пикрилгидразилом и радикалом $\cdot\text{OH}$ ²⁶; 2) перенос электрона с участием фенольной или ферроценильной группы, фиксируемый с помощью CUPRAC-теста²⁷, который основан на способности антиоксиданта восстанавливать ион меди(II) в комплексе с неocupроином²⁸, в реакции с H_2O_2 , а также с помощью ферментативного метода, основанного на взаимодействии с супероксид анион-радикалом в системе ксантин–ксантиноксидаза²⁹; 3) ингибирование цепного радикального процесса пероксидного окисления ненасыщенного субстрата на примере линолевой кислоты, входящей в состав липидов³⁰.

Полученные данные (табл. 3) свидетельствуют о существенном вкладе в механизм антиоксидантной активности соединения **3** процессов переноса атома водорода и электрона. Значение TEAC (тролокс-эквивалентная антиоксидантная способность) в CUPRAC-тесте близко к таковому для тролокса (~0.7), а величина концентрации EC_{50} в ДФПГ-тесте составляет менее 50 мкмоль \cdot л⁻¹, что характерно для эффективных антиоксидантов. Легкость окисления ферроценильной группы с образованием иона феррициния, о чем свидетельствуют полученные нами ранее данные²⁵ (потенциал окисления составляет 0.48 В, что сравнимо с потенциалом окисления незамещенного ферро-

Таблица 3. Антиоксидантная активность соединения 3, определенная различными методами

Соединение	EC ₅₀ ^a /мкмоль·л ⁻¹	TEAC ^b	Активность ^c (%)	% от контроля ^d	Ингибирование реакции (%) ^e	
					I	II
3	29.3±1.2	0.67±0.03	4.1±1.3	115.9±1.3	76.5±8.3	42.8±3.2

^a Определено с использованием ДФПГ-теста. ^b Определено с использованием CUPRAC-теста, выражено в эквивалентах тролокса (Trolox Equivalent Antioxidant Capacity). ^c Оценена по способности соединения (концентрация 2 ммоль·л⁻¹) реагировать с ·ОН-радикалом. ^d Оценка проведена по способности соединения нейтрализовать анион-радикал O₂^{·-}. ^e Оценка проведена по способности соединения взаимодействовать с H₂O₂ (I) и влиять на процесс окисления липолевой кислоты (II) (концентрация соединения 3 равна 2 ммоль·л⁻¹).

цена — 0.51 В), обеспечивает возможность действия соединения 3 как эффективного донора электрона и обуславливает высокую активность. Вместе с тем низкая эффективная концентрация в процессе транспорта атома водорода от 2,6-ди-*трет*-бутилфенольной группы и образование относительно стабильного феноксильного радикала вносит вклад в активность по механизму, принятому для витамина Е, тролокса и других фенольных антиоксидантов. Таким образом, сочетание в молекуле 2,6-ди-*трет*-бутилфенольного функционального фрагмента (биомиметика природного антиоксиданта витамина Е) и редокс-активной ферроценильной группы определяет высокую эффективность соединения 3.

С целью подтверждения эффективности соединения 3 не только в модельных реакциях, но и в экспериментах *in vitro*, проведено исследование его действия на процесс пероксидного окисления липидов гомогенатов печени и митохондрий, изолированных из печени крыс (табл. 4, рис. 2).

Результаты, полученные при изучении влияния соединений 1–3 на аскорбатзависимое пероксидное окисление липидов печени (см. табл. 4), подтверждают несомненное преимущество соединения 3 при всех исследуемых концентрациях по сравнению с его аналогами 1 и 2, не содержащими ферроценильной группы. Однако значение IC₅₀ для этих соединений на порядок ниже, чем таковое для тролокса.

Одной из основных физиологических функций печени является детоксикация, в связи с чем гомогенат

Таблица 4. Антиоксидантная активность соединений 1–3 в *in vitro* процессе аскорбат-зависимого пероксидного окисления липидов гомогенатов печени крыс

Соединение	Ингибирование реакции (%) ^a			IC ₅₀ /мкмоль·л ⁻¹
	I	II	III	
1	5.5±0.9	11.9±1.2	32.2±2.6	—
2	3.6±0.7	3.6±0.4	24.4±2.2	—
3	28.5±2.3	85.2±3.9	91.3±5.1	65.7±2.7
Тролокс	53.9±4.3	68.8±4.1	82.3±2.9	5.1±0.7

^a При концентрации соединений 10 (I), 100 (II) и 1000 мкмоль·л⁻¹ (III).

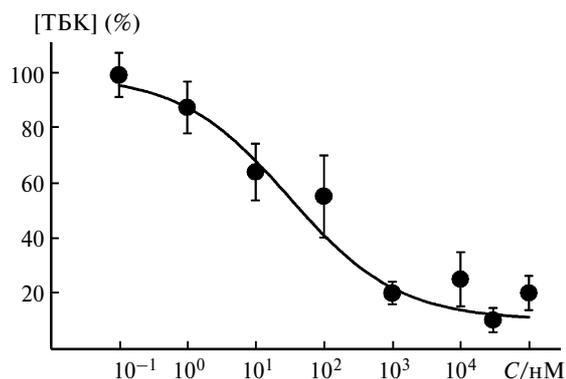


Рис. 2. Концентрационная зависимость накопления ТБК-зависимых продуктов (ТБК, %) в присутствии соединения 3 при процессе *in vitro* Fe³⁺-индуцированного пероксидного окисления липидов изолированных митохондрий печени крыс.

нат печени содержит значительное количество цитозольных белков, способных связывать экзогенные соединения, которые в интактной клетке локализованы в специализированных органеллах. Поскольку основным участком продукции свободных радикалов в клетке являются митохондрии, нами исследовано влияние соединения 3 на ПОЛ мембран изолированных митохондрий печени крыс. В качестве индукторов ПОЛ использовали как Bu⁴ООН, так и Fe³⁺ (см. лит.³¹). В условиях эксперимента тролокс проявляет антиоксидантный эффект, сравнимый с наблюдаемым для гомогената печени. Значения IC₅₀ составляют 4.94±0.93 и 5.79±0.90 мкмоль·л⁻¹ для тБГП- и Fe³⁺-индуцированного ПОЛ соответственно. Соединение 3, в отличие от тролокса, не подавляет ПОЛ, индуцированное Bu⁴ООН, до концентрации 100 мкмоль·л⁻¹, но проявляет значительный антиоксидантный эффект по отношению к Fe³⁺-индуцированному ПОЛ: значение IC₅₀ лежит в наномолярном диапазоне и составляет 31.2±17.0 нмоль·л⁻¹ (см. рис. 2), что на два порядка ниже значения IC₅₀ для тролокса в аналогичных условиях и на три порядка ниже соответствующего показателя в случае аскорбат-иницированного ПОЛ гомогената печени. Эти факты могут свидетельствовать как об экранировании реального антиоксидантного потенциала соеди-

нения белками гомогената, так и о более выраженном действии *in vitro* соединения **3** по отношению к липидам митохондриальных мембран, т.е. на участке, в котором генерируются активные метаболиты кислорода. Таким образом, можно сделать вывод о том, что по сравнению с тролоксом, антиоксидантная активность которого определяется участием фенольной группы в процессе переноса атома водорода, механизм действия соединения **3** может отличаться и включать также стадию переноса электрона с участием ферроценильной группы.

Ранее нами было изучено влияние замещенного 2,6-ди-*трет*-бутилфенола, содержащего фрагмент ферроцена, на функциональные характеристики митохондрий печени крыс: мембранный потенциал, который является важной характеристикой энергетической функции митохондрий, и специфический процесс кальций-активируемого скачка митохондриальной проницаемости (mitochondrial permeability transition, МРТ), являющегося ключевым этапом каскада гибели клетки¹⁹. Следует отметить, что только высокие концентрации соединения **3** способны вызвать незначительную деполяризацию митохондрий (<20%) и существенно более выраженное подавление МРТ (снижение начальной скорости «набухания» митохондрий >80%). На основании указанного выше можно сделать предположение о потенциально низкой токсичности соединения и, более того, о его возможном цитопротекторном эффекте.

Совокупность результатов, подтверждающих высокую эффективность действия 2,6-ди-*трет*-бутилфенола **3**, содержащего ферроценильную группу, позволяет сделать предположение о его способности проявлять активность в качестве антигликирующего агента. Для подтверждения высказанного предположения был изучен процесс гликозилирования бычьего сывороточного альбумина глюкозой в присутствии соединений **1–3** в сопоставлении с аминогуанидином (рис. 3). Антигликирующая активность аминогуанидина составляет 70.7%, в то время как соединение **3** ингибирует данный процесс полностью (100%). Следует отметить, что 2,6-ди-*трет*-бутилфенолы **1** и **2** не только не проявляют активность в процессе глико-

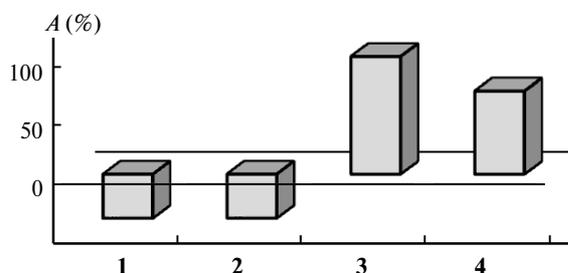


Рис. 3. Антигликирующая активность (*A*, %) соединений **1–3** ($1 \cdot 10^{-3}$ моль \cdot л $^{-1}$) и аминогуанидина (**4**) *in vitro* (1 мг \cdot мл $^{-1}$ бычьего сывороточного альбумина, глюкозы (500 ммоль \cdot л $^{-1}$), фосфатный буфер (рН 7.4)). Данные достоверны по отношению к позитивному контролю, критерий Краскела—Уоллиса с посттестом Данна ($p < 0.05$).

Таблица 5. Показатели острой токсичности (LD_{50}), ингибирующей концентрации (IC_{50}) и терапевтического индекса (LD_{50}/IC_{50}) соединения **3** и аминогуанидина *in vivo*

Соединение	IC_{50} /мкмоль \cdot л $^{-1}$	LD_{50} /мг \cdot кг $^{-1}$	LD_{50}/IC_{50}
3	277.1	866.7	7.49
Аминогуанидин	460.0	562.6	11.07

зилирования, но и промотируют его (процент ингибирования имеет отрицательные значения и составляет -37.4% для обоих соединений).

Для замещенного 2,6-ди-*трет*-бутилфенола, содержащего фрагмент ферроцена, определены острая токсичность на белых нелинейных мышках-самках при внутрибрюшинном введении соединения **3** в сопоставлении с аминогуанидином. Гибель животных и потенциальную токсичность регистрировали в течение 14 суток. При этом рассчитывали величину токсикологического показателя LD_{50} , показатели эффективной концентрации IC_{50} антигликирующей активности, а также условный терапевтический индекс, являющийся отношением показателя LD_{50} к IC_{50} антигликирующей активности (табл. 5). Представленные данные позволяют сделать вывод о том, что соединение **3** уступает аминогуанидину по значению терапевтического индекса, однако существенно превосходит аминогуанидин по величинам токсикологического показателя LD_{50} и эффективной концентрации IC_{50} .

Таким образом, предлагаемый подход, основанный на введении в молекулу антиоксиданта 2,6-ди-*трет*-бутилфенола фрагмента ферроцена, может представлять интерес для создания эффективных ингибиторов гликозилирования белков, а следовательно, для поиска новых препаратов для терапии заболеваний, в патогенез которых вовлечен процесс ферментативного гликозилирования.

Экспериментальная часть

Электронные спектры поглощения регистрировали на спектрофотометрах «Evolution 300» («Thermo Scientific»), «Zenyth200rt» («Anthos»), «Apel PD-303UV». ИК-спектры поглощения записывали на спектрофотометре «IR200» («ThermoNicolet») с фурье-преобразованием в таблетках с KBr. Спектры ЯМР получали на спектрометре «Bruker AMX-400» (1H , 400 МГц; ^{13}C , 100 МГц) в $CDCl_3$. Спектры ЭПР регистрировали на радиоспектрометре «Bruker EMX» при 9.84 ГГц. Измерения выполняли после предварительного вакуумирования ампул с растворами образцов в толуоле (концентрации $1 \cdot 10^{-4}$ моль \cdot л $^{-1}$). Окислитель PbO_2 использовали в десятикратном избытке. При выполнении экспериментов использовали рН-метр лабораторный «Аквилон рН-410», центрифуги «Elmi CM-6M», термостат водяной EL-20 «Votice».

В работе использовали следующие вещества: 3-пиколил-амин, 4-пиколиламин («Aldrich», 99%), 3,5-ди-*трет*-бутил-4-гидроксibenзальдегид («Sigma», 99%), 2-тиобарбитуровую кислоту (ТБК) («Fluka», 99%), аскорбиновую кислоту

(«Сметарол», 99%), 2,2'-азино-бис-(3-этилбензтиазолин-6-сульфовую кислоту) («MP Biomedicals», 99%), гемоглобин («Sigma»), тролокс («Fluka», 99%). Растворители ДМСО, CHCl_3 , $\text{C}_2\text{H}_5\text{OH}$, C_6H_6 , ацетон (все марки «х.ч.») использовали без дополнительной очистки.

Получение 2,6-ди-*трет*-бутил-[*N*-(пиридилметил)иминометил]фенолов (1, 2) (общая методика). Смесь эквимолярных количеств 3,5-ди-*трет*-бутил-4-гидроксibenзальдегида и пиколиламина перемешивали при кипячении с азеотропной отгонкой воды в течение 2 ч в 20 мл абс. бензола. Растворитель отгоняли в вакууме. Остаток обрабатывали петролейным эфиром. Полученный осадок отфильтровывали, промывали петролейным эфиром, сушили на воздухе в течение 24 ч.

2,6-ди-*трет*-бутил-4-[*N*-(4-пиридилметил)иминометил]фенол (1). Порошок бежевого цвета. Выход 89%. Т.пл. 135 °С. ИК-спектр, $\nu/\text{см}^{-1}$: 3631.3 (ОН), 2958—3075 (СН), 1641 (С=N). Спектр ЯМР ^1H (δ , м.д.): 1.49 (с, 18 H, Bu^t); 4.79 (с, 2 H, CH_2); 5.63 (с, 1 H, ОН); 7.30 (д, 2 H, Py , $J_{\text{H-H}} = 4$ Гц); 7.65 (с, 2 H, $\text{CH}_{\text{аром}}$); 8.34 (с, 1 H, CH=N); 8.56 (с, 2 H, Py , $J_{\text{H-H}} = 4$ Гц). Спектр ЯМР ^{13}C (CDCl_3 , δ , м.д., $J/\text{Гц}$): 30.20 ($\text{C}(\text{CH}_3)_3$); 34.38 (CMe_3); 63.51 (CH_2); 122.78 (2 C, Py); 125.61 (2C); 127.35, 136.32 (2 C, $\text{C}-\text{CMe}_3$); 149.03 (Py); 149.75 (2 C, Py); 156.74 (C—ОН); 163.91 (СН=N). Найдено (%): С, 78.08; Н, 8.88; N, 8.72. $\text{C}_{21}\text{H}_{28}\text{N}_2\text{O}$. Вычислено (%): С, 77.74; Н, 8.70; N, 8.63. УФ-спектр (CHCl_3), $\lambda_{\text{max}}/\text{nm}$ (ϵ): 237 (6780); 276 (8410); 387 (6320).

2,6-ди-*трет*-бутил-4-[*N*-(3-пиридилметил)иминометил]фенол (2). Порошок бежевого цвета. Выход 95%. Т.пл. 124 °С. ИК-спектр, $\nu/\text{см}^{-1}$: 3625,5 (ОН), 2869.5—3035.41 (СН), 1637.3 (С=N). Спектр ЯМР ^1H (CDCl_3 , δ , м.д., $J/\text{Гц}$): 1.48 (с, 18 H, Bu^t); 4.80 (с, 2 H, CH_2); 5.66 (с, 1 H, ОН); 7.26—7.29 (1 H, Py); 7.63 (с, 2 H, $\text{C}_6\text{H}_{2\text{аром}}$); 7.67 (д, 1 H, Py , $J_{\text{H-H}} = 8$); 8.35 (с, 1 H, CH=N); 8.51 (д, 1 H, Py , $J_{\text{H-H}} = 4$); 8.62 (с, 1 H, Py). Спектр ЯМР ^{13}C (CDCl_3 , δ , м.д., $J/\text{Гц}$): 30.20 ($\text{C}(\text{CH}_3)_3$); 34.39 ($\text{C}(\text{CH}_3)_3$); 62.29 (CH_2); 126.89, 128.49, 148.05, 157.56, 123.29, 125.57, 135.55, 148.27, 149.40 ($\text{C}_{\text{аром}}$); 163.37 (СН=N). Найдено (%): С, 77.08; Н, 8.88; N, 8.72. $\text{C}_{21}\text{H}_{28}\text{N}_2\text{O}$. Вычислено (%): С, 77.77; Н, 8.80; N, 8.67. УФ-спектр (CHCl_3), $\lambda_{\text{max}}/\text{nm}$ (ϵ): 274.5 (12790), 340 (1730).

***N*-(3,5-ди-*трет*-бутил-4-гидроксибензил)иминометилферроцен (3).** Соединение 3 получали по описанной нами ранее методике²⁵. Порошок оранжевого цвета. Выход 66%. Т.пл. 184 °С. ИК-спектр, $\nu/\text{см}^{-1}$: 3639 (ОН), 2870—2958 (СН), 1654 (С=N). Спектр ЯМР ^1H (CDCl_3 , δ , м.д.): 1.50 (с, 18 H, Bu^t); 4.26 (с, 5 H, C_5H_5); 4.47 (с, 2 H, Fc); 4.81 (с, 1 H, Fc); 5.13 (с, 1 H, ОН); 7.05 (с, 2 H, $\text{C}_6\text{H}_{2\text{аром}}$); 8.35 (с, 1 H, CH=N). Спектр ЯМР ^{13}C (CDCl_3 , δ , м.д.): 30.29 ($\text{C}(\text{CH}_3)_3$); 34.47 ($\text{C}(\text{CH}_3)_3$); 68.81 (C_5H_4); 69.17 (C_5H_5); 69.64 (C_5H_4); 70.94 (C_5H_4); 117.39 (C_6H_2); 128.28, 136.66 (C— CMe_3); 151.89, 158.69 (СН=N). Найдено (%): С, 71.88; Н, 7.49; N, 3.65; Fe, 13.28. $\text{C}_{25}\text{H}_{31}\text{FeNO}$. Вычислено (%): С, 71.95; Н, 7.49; N, 3.36; Fe, 13.42. УФ-спектр (CHCl_3), $\lambda_{\text{max}}/\text{nm}$ (ϵ): 457 (4.3), 330 (6.9).

Определение антиоксидантной активности методом ABTS. К смеси 600 мкл раствора ABTS (0.5 мг·мл⁻¹) и 300 мкл раствора гемоглобина (1 мг·мл⁻¹) добавляли 300 мкл раствора соединения (концентрации составляли 1000, 100, 10 и 1 мкмоль·л⁻¹). Затем добавляли 1.2 мл фосфатного буфера (рН 6.8) и 600 мкл пероксида водорода (0.612 ммоль·л⁻¹). Оптическую плотность измеряли при длине волны 734 нм с интервалом в 5 мин в течение 30 мин. Показатель активности соединений (% ингибирования) рассчитывали на десятую минуту реакции. В качестве препарата сравнения использовали тролокс. Активность соединений 1—3 выражали в процентах и рассчитывали по формуле:

$$\% \text{ ингибирования} = 100 - (E_{\text{оп}}/E_{\text{контр}}) \cdot 100,$$

где $E_{\text{оп}}$ — оптическая плотность раствора с соединением, $E_{\text{контр}}$ — оптическая плотность раствора, не содержащего соединений 1—3.

Соединения с высоким значением активности исследовали в широком диапазоне концентраций и для них рассчитывали величину IC_{50} (концентрация, ингибирующая реакцию на 50%). Статистическую оценку результатов проводили с использованием параметрического t -критерия Стьюдента в программе Statistica 6.0 (StatSoft, США).

Определение антирадикальной активности соединений с использованием ДФПГ-теста. Оценку антиоксидантной активности исследуемых соединений с использованием стабильного радикала 1,1-дифенил-2-пикрилгидразила (ДФПГ) проводили спектрофотометрически²⁷. Известная методика была модифицирована для использования планшетного спектрофотометра. Реакцию проводили в ячейках планшета (96 лунок). Реакционная смесь содержала 0.1 мл раствора ДФПГ в концентрации $0.2 \cdot 10^{-3}$ моль·л⁻¹ и 0.1 мл раствора исследуемого вещества различной концентрации (0.01 — $0.2 \cdot 10^{-3}$ моль·л⁻¹). Реакцию проводили в течение 30 мин при 25 °С. Из полученных данных рассчитывали значение антиоксидантной активности в процентах (I , %) по формуле:

$$I = (A_0 - A_1)/A_0 \cdot 100,$$

где A_0 — оптическая плотность контрольного раствора ДФПГ, A_1 — оптическая плотность раствора реакционной смеси. Величину EC_{50} (эффеkтивную концентрацию) определяли путем аппроксимирования концентрационной зависимости логистической кривой общего вида

$$I = 100 \cdot (1/(1+[C]/\text{EC}_{50})),$$

где C — концентрация исследуемого вещества.

Определение активности соединений в реакции переноса электрона с использованием CUPRAC-теста. Метод получил свое название от аббревиатуры CUPRAC (Copper Reducing Antioxidant Capacity — способность антиоксиданта восстанавливать ион меди(II))²⁶. Данный метод основан на реакции восстановления Cu^{2+} в комплексе с неocupроином (2,9-диметил-1,10-фенантролин) и дает представление о способности исследуемого вещества выступать в качестве донора электрона. О ходе эксперимента судили по увеличению оптической плотности раствора при длине волны $\lambda_{\text{max}} = 450$ нм. Измерения проводили с использованием планшетного (96 лунок) спектрофотометра. Объем реакционной смеси составлял 0.2 мл и содержал 0.05 мл ацетатного буфера, 0.05 мл раствора CuCl_2 ($1 \cdot 10^{-2}$ моль·л⁻¹), 0.05 мл раствора неocupроина ($7.5 \cdot 10^{-3}$ моль·л⁻¹) и 0.05 мл раствора исследуемых соединений в этаноле ($2 \cdot 10^{-3}$ моль·л⁻¹). Результаты представляли в тролокс-эквивалентах (TEAC). Значение TEAC определяли графически по величине оптической плотности с использованием калибровочного графика — концентрационной зависимости количества восстановленного комплекса меди(II) от содержания тролокса.

Ферментативное генерирование супероксид анион-радикала $\text{O}_2^{\cdot-}$ в системе ксантин—ксантиноксидаза. Оценку способности соединений нейтрализовывать супероксид анион-радикал $\text{O}_2^{\cdot-}$, генерируемый в ферментативной системе ксантин—ксантиноксидаза, проводили по скорости восстановления тетразолия синего до формазана²⁹. Реакционная смесь содержала 2.7 мл ($40 \cdot 10^{-3}$ моль·л⁻¹) карбонатного буфера (рН 10.0, $0.1 \cdot 10^{-3}$ моль·л⁻¹ ЭДТА), 0.06 мл ксантина ($10 \cdot 10^{-3}$ моль·л⁻¹), 0.03 мл 0.5%-ного

бычьего сывороточного альбумина, 0.03 мл тетразолия синего ($2.5 \cdot 10^{-3}$ моль \cdot л $^{-1}$) и 0.06 мл раствора исследуемого соединения в ДМСО. К смеси добавляли 0.12 мл ксантинооксидазы (0.04 ед.) при 25 °С и измеряли оптическую плотность при $\lambda_{\max} = 560$ нм в течение 300 с. Контрольный эксперимент проводили заменой раствора соединения таким же количеством ДМСО. Для вещества измерения проводили с использованием шести концентраций. Все эксперименты проводили в трех параллелях.

Оценка способности соединений реагировать с гидроксильным радикалом, генерированным в реакции Габера—Вейса. Активность исследуемого соединения в реакции с гидроксильным радикалом \cdot ОН изучали в процессе окислительной деструкции дезоксирибозы при действии гидроксильного радикала с образованием малонового диальдегида³⁰. Гидроксильный радикал генерировали в реакции Fe^{2+} с пероксидом водорода. Последующее определение концентрации малонового диальдегида проводили по методу ТБК-зависимых продуктов. Реакционная смесь объемом 0.5 мл содержала 0.345 мл раствора D-дезоксирибозы ($2.5 \cdot 10^{-3}$ моль \cdot л $^{-1}$) в фосфатном буфере (рН 7.4), 0.05 мл раствора FeCl_2 ($2 \cdot 10^{-3}$ моль \cdot л $^{-1}$), содержащего $2 \cdot 10^{-3}$ моль \cdot л $^{-1}$ ЭДТА, 0.05 мл раствора аскорбиновой кислоты ($1 \cdot 10^{-3}$ моль \cdot л $^{-1}$), 0.02 мл раствора H_2O_2 ($30 \cdot 10^{-3}$ моль \cdot л $^{-1}$) в фосфатном буфере (рН 7.4) и 0.05 мл раствора исследуемого вещества различной концентрации в этаноле. Раствор инкубировали в течение 30 мин при 37 °С. Далее к раствору добавляли 0.5 мл 30%-ной трихлоруксусной кислоты и 0.5 мл 1%-ной ТБК, смесь нагревали в течение 20 мин при 95 °С, проводили измерение оптической плотности при $\lambda_{\max} = 532$ нм на планшетном (96 лунок) спектрофотометре. В качестве базовой линии использовали значение оптической плотности раствора при $\lambda_{\max} = 620$ нм. Для исследуемого соединения измеряли поглощение при пяти концентрациях, все эксперименты проводили в пяти параллелях.

Определение антиоксидантной активности по способности соединений взаимодействовать с H_2O_2 . В эксперименте по оценке реакционной способности исследуемого соединения по отношению к пероксиду водорода реакционная смесь содержала 0.1 мл раствора H_2O_2 (30 ммоль \cdot л $^{-1}$) в фосфатном буфере (рН 7.4) и 0.1 мл раствора исследуемого вещества различной концентрации в этаноле. Реакцию проводили в течение 10 мин, содержание пероксида водорода определяли спектрофотометрически при $\lambda_{\max} = 230$ нм. Для исследуемого соединения измерения проводили при пяти концентрациях, все эксперименты проводили в пяти параллелях²⁸.

Оценка антиоксидантной активности соединений в процессе ингибирования неферментативного пероксидного окисления линолевой кислоты. Оценку влияния исследуемого соединения на процесс неферментативного пероксидного окисления линолевой кислоты проводили с использованием соли Fe^{2+} в качестве инициатора окисления³⁰. К 34 мкл линолевой кислоты в 1.97 мл этанола добавляли 2 мл фосфатного буфера (рН 7.4). Реакционная смесь содержала 0.33 мл раствора линолевой кислоты, 0.066 мл FeCl_2 ($4 \cdot 10^{-3}$ моль \cdot л $^{-1}$), 0.164 мл фосфатного буфера и 0.1 мл ($30 \cdot 10^{-3}$ моль \cdot л $^{-1}$) исследуемого соединения в этаноле. Полученный раствор инкубировали в течение 30 мин при 37 °С. Далее добавляли 0.84 мл раствора, содержащего 0.25 моль \cdot л $^{-1}$ HCl , 10% трихлоруксусной кислоты и 0.6% ТБК. Смесь нагревали в течение 15 мин при 95 °С, центрифугировали и проводили измерение оптической плотности при $\lambda_{\max} = 532$ нм на планшетном (96 лунок) спектрофотометре.

Определение антиоксидантной активности в эксперименте *in vitro* в процессе аскорбатзависимого пероксидного окис-

ления липидов гомогенатов печени крыс. При изучении аскорбат-зависимого пероксидного окисления липидов²¹ использовали 4%-ный гомогенат печени крыс. Реакцию инициировали аскорбиновой кислотой (50 ммоль \cdot л $^{-1}$). Уровень ПОЛ определяли по накоплению ТБК-зависимых продуктов, дающих окрашенный комплекс в реакции с ТБК. Оптическую плотность измеряли при длине волны 532 нм. Активность соединений **1—3** выражали в процентах и рассчитывали по формуле:

$$\% \text{ ингибирования} = 100 - (E_{\text{оп}}/E_{\text{контр}} \cdot 100),$$

где $E_{\text{оп}}$ — оптическая плотность раствора с соединением, $E_{\text{контр}}$ — оптическая плотность раствора, не содержащего соединений **1—3**. Статистическую оценку результатов проводили с использованием параметрического *t*-критерия Стьюдента в программе Statistica 6.0 (StatSoft, США).

Определение антиоксидантной активности в экспериментах *in vitro* в процессе окисления липидов митохондрий, изолированных из печени крыс. Митохондрии печени выделяли методом дифференциального центрифугирования с использованием различных буферов. Печень помещали в ледяной раствор (буфер А: маннитол 225 мМ, сахароза 75 мМ, HEPES 10 мМ, ЭГТА 0.5 мМ, ЭДТА \cdot 2К 0.5 мМ), затем измельчали ножницами и дважды промывали этим же буфером. Полученную фракцию пропускали через пресс, суспендировали в буфере А и гомогенизировали в гомогенизаторе Поттера при 900 об \cdot мин $^{-1}$. Полученный гомогенат наливали в центрифужные пробирки, уравнивали и центрифугировали при 1500 об \cdot мин $^{-1}$. Далее отбирали супернатант без жира в чистую пробирку и подвергали повторному центрифугированию при 10000 об \cdot мин $^{-1}$. Полученный после последнего промывания осадок ресуспендировали в небольшом объеме буфера отмывания (буфер Б: маннитол 225 мМ, сахароза 75 мМ, HEPES 10 мМ, ЭГТА 10 мМ, ЭДТА 20 мкМ). Выход митохондрий составил от 100 до 130 мг белка на печень. Митохондрии хранили при 4 °С в пластиковой закрытой посуде. Функциональная активность митохондрий сохранялась в течение 2.5—4 ч.

Пероксидное окисление липидов митохондрий печени оценивали по накоплению ТБК-зависимых продуктов окисления спектрофотометрически по известной методике^{22,31}.

После 30 (или 60) мин инкубации в кювете спектрофотометра 1 мл суспензии митохондрий смешивали с 2 мл раствора, содержащего 2.6 ммоль \cdot л $^{-1}$ 2-тиобарбитуровой кислоты, 15% (вес к объему) трихлоруксусной кислоты, 0.25 М HCl и 0.2% (вес к объему) бутилгидрокситолуол. Пробы помещали на 24 ч в темноту при 20 °С. Затем пробы центрифугировали для удаления осадка белка и в супернатанте определяли дифференциальное поглощение ($A_{532} - A_{630}$).

Определение антигликирующей активности. Реакцию гликозилирования воспроизводили по описанному ранее методу²³. Реакционная смесь содержала растворы бычьего сывороточного альбумина (1 мг \cdot мл $^{-1}$) и глюкозы (500 ммоль \cdot л $^{-1}$) в фосфатном буфере (рН 7.4). Конечный объем реакционной смеси составлял 1.5 мл. В экспериментальные образцы добавляли 50 мкл раствора соединений в различных концентрациях. В контрольные образцы добавляли фосфатный буфер в аналогичном объеме. Для предупреждения бактериального роста в буферный раствор вносили азид натрия в конечной концентрации 0.02%. Все экспериментальные образцы инкубировали в течение 24 ч при 60 °С. По истечении срока инкубации проводили определение специфической флуоресценции гликированного бычьего сывороточного альбумина при длине волны возбуждения 370 нм и испускания 440 нм. В качестве препара-

та сравнения использовали аминогуанидин. Для наиболее перспективных соединений были изучены концентрационные зависимости антигликирующей активности и рассчитаны показатели концентраций IC₅₀, вызывающих снижение флуоресценции гликированного бычьего сывороточного альбумина на 50%.

Исследование острой токсичности. Исследование токсичности соединения **3** и препарата сравнения — аминогуанидина — проводили согласно Руководству по проведению доклинических исследований лекарственных средств²⁴.

Острую токсичность определяли на белых нелинейных мышках-самках массой 21–24 г при внутривенном введении соединения **3** и аминогуанидина. Вводимые животным дозы **3** и аминогуанидина составляли от 300 до 1200 мг·кг⁻¹. Гибель животных регистрировали в течение двух недель. Величину токсикологического показателя (LD₅₀) рассчитывали по методу Миллера и Тейтнера³². Расчет показателей эффективной концентрации IC₅₀ и LD₅₀ проводили методом регрессионного анализа. Статистическую обработку результатов проводили с использованием непараметрического критерия Краскела—Уоллиса с посттестом Данна, табличного редактора Microsoft Excel 2007 и программы GraphPad Prism 5.0.

В работе использовано оборудование Центра коллективного пользования Института физиологически активных веществ РАН (соглашение №14.621.21.0008, идентификатор RFMEFI62114X0008).

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (проекты № 14-03-01101 (синтез и изучение антиоксидантной активности), № 13-03-01151 (изучение активности с использованием митохондрий)) и Российского научного фонда (грант № 14-25-00139 (изучение антигликирующей активности и эксперименты *in vivo*)).

Список литературы

1. F. J. Tessier, *Pathol. Biol.*, 2010, **58**, 214.
2. M. Busch, S. Franke, C. Rüster, G. Wolf, *Eur. J. Clin. Investigation*, 2010, **40**, 742.
3. A. Syngle, K. Vohra, N. Garg, L. Kaur, P. Chand, *Int. J. Rheumatic Diseases*, 2012, **15**, 45.
4. J. Li, D. Liu, L. Sun, Y. Lu, Z. Zhang, *J. Neurolog. Sci.*, 2012, **317**, 1.
5. Н. А. Ансари, З. Рашид, *Биомедицинская химия*, 2010, **56**, 168.
6. S.-Y. Goh, M. E. Cooper, *J. Clin. Endocrin. & Metabolism*, 2008, **93**, 1143.
7. R. Ramasamy, S. F. Yan, A. M. Schmidt, *Ann. NY Acad. Sci. J.*, 2011, **1243**, 88.
8. J. Hirsch, M. S. Feather, In *Food Science, Technology and Nutrition*, Woodhead Publishing Series, 2005, 325.
9. V. Prakash Reddy, A. Beyaz, *Drug Discovery Today*, 2006, **11**, 646.
10. D. H. Markowicz Bastos, A. Gugliucci, *Current Opinion in Food Science*, 2015, **1**, 13.
11. C. J. Mullarkey, D. Edelstein, L. Brownlee, *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, 1990, **173**, 932.
12. Y. Fujiwara, N. Kiyota, K. Tsurushima, M. Yoshitomi, K. Mera, N. Sakashita, M. Takeya, T. Ikeda, T. Araki, T. Nohara, R. Nagai, *Free Radical Biol. & Med.*, 2011, **50**, 883.
13. M. C. Thomas, J. W. Baynes, S. R. Thorpe, M. E. Cooper, *Curr. Drug Targets*, 2005, **6**, 453.
14. C. A. L. S. Colaco, C. R. Harrington, *CNS Drugs*, 1996, **6**, 167.
15. *Биометаллоорганическая химия*, под ред. Ж. Жауэна, БИНОМ, Москва, 2009, 494 с. [*Bioorganometallics: Biomolecules, Labeling, Medicine*, Ed. G. Jaouen, Wiley-VCH, Weinheim, 2006, 462 p.].
16. *Bioinorganic Medicinal Chemistry*, Ed. E. Alessio, Wiley-VCH, Weinheim, 2011, 422 p.
17. N. Metzler-Nolte, M. Salmann, *The Bioorganometallic Chemistry of Ferrocene*, in *Ferrocenes*, John Wiley & Sons, 2008.
18. E. R. Milaeva, *Current Topics in Medicinal Chemistry*, 2011, **12**, 2703.
19. E. R. Milaeva, S. I. Filimonova, L. G. Dubova, E. F. Shevtsova, S. O. Bachurin, N. S. Zefirov, *Bioinorg. Chem. & Appl.*, 2010, **2010**, ID 165482, 6 p.
20. C. A. Rice-Evans, N. J. Miller, *Methods Enzymol.*, 1994, **234**, 279.
21. В. З. Ланкин, *Труды московского общества испытателей природы*, 1975, **52**, 73.
22. R. Ramsay, R. Mehlhorn, T. Singer, *Biochim. Biophys. Res. Comm.*, 1989, **159**, 983.
23. A. Jedsadayanmata, *Naresuan University J.*, 2005, **13**, 35.
24. А. Н. Миронов, *Руководство по проведению доклинических исследований лекарственных средств*, Гриф и К, Москва, 2012, 944 с.
25. N. N. Meleshonkova, D. B. Shpakovsky, A. V. Fionov, A. V. Dolganov, T. V. Magdesieva, E. R. Milaeva, *J. Organomet. Chem.*, 2007, **692**, 5339.
26. R. Apak, K. Guclu, M. Ozyurek, S. E. Karademir, *J. Agricult. Food Chem.*, 2004, **52**, 7970.
27. M. C. Foti, C. Daquino, I. D. Mackie, G. A. DiLabio, K. U. Ingold, *J. Org. Chem.*, 2008, **73**, 9270.
28. I. Gulcin, M. E. Buyukokuroglu, O. I. Kufrevioglu, *J. Pineal Res.*, 2003, **34**, 278.
29. I. Kubo, N. Masuoka, T. J. Ha, K. Tsujimoto, *Food Chemistry*, 2006, **99**, 555.
30. S. Sakanaka, Y. Tachibana, N. Ishihara, L. R. Juneja, *Food Chem.*, 2004, **86**, 99.
31. W. L. Erdahl, R. J. Krebsbach, D. R. Pfeiffer, *Achiv. Biochem. Biophys.*, 1991, **285**, 252.
32. М. Л. Беленький, *Элементы количественной оценки фармакологического эффекта*, Медгиз, Ленинград, 1963, 146 с.

Поступила в редакцию 22 апреля 2015;
после доработки — 24 июня 2015