

УДК 547.1-32:546.812-814:615.9

СИНТЕЗ И АНТИОКСИДАНТНАЯ АКТИВНОСТЬ НОВЫХ ОЛОВООРГАНИЧЕСКИХ СОЕДИНЕНИЙ, СОДЕРЖАЩИХ ФРАГМЕНТ 2,6-ДИ-*трет*-БУТИЛФЕНОЛА

© 2013 г. Е. М. Мухатова, В. П. Осипова, М. Н. Коляда,
Н. О. Мовчан, Д. Б. Шпаковский, Ю. А. Грачева,
С. И. Орлова, Е. Р. Милаева

Представлено академиком Н.С. Зефириным 04.12.2012 г.

Поступило 04.12.2012 г.

DOI: 10.7868/S0869565213190134

Оловоорганические соединения обладают биологической активностью и характеризуются общей высокой токсичностью и неспецифичностью действия. Токсичность таких соединений обусловлена рядом факторов: связыванием атома Sn с SH-группами белков, повреждением биомембран, индуцированием окислительного стресса организма и др. [1]. В то же время способность оловоорганических соединений накапливаться в клетке, а также их токсичность позволяют рассматривать эти соединения в качестве перспективных фармакологических препаратов специфического действия, например, в качестве цитотоксических противоопухолевых агентов в химиотерапии рака [2–4].

Органическая группа соединений олова играет важную роль в проявлении физиологической активности. Введение σ -связанного с атомом Sn фрагмента пространственно-затрудненного 2,6-диалкилфенола – миметика витамина E, обладающего антиоксидантной активностью, может способствовать в целом снижению токсичности соединений металлов [5, 6]. Комбинированное использование цитотоксического потенциала соединений олова и антиоксидантной функциональной группы в структуре лиганда для создания перспективных противоопухолевых препаратов позволит избежать нежелательных побочных эффектов, характерных для применяемых в настоящее время производных платины.

Целью данной работы является исследование влияния новых соединений олова(IV) общей

формулы $Me_nSn(SR)_{4-n}$ ($n = 2, 3$) и олова(II) $Sn(SR)_2$, содержащих фрагмент 2,6-ди-*трет*-бутилфенола ($R - 3,5$ -ди-*трет*-бутил-4-гидрокси-фенил), на процессы неферментативного и ферментативного пероксидного окисления жирных ненасыщенных кислот, а также на связывание с SH-группами белка тубулина.

В работе получены новые соединения олова 1–3 взаимодействием соответствующих хлоридов олова и 2,6-ди-*трет*-бутил-4-меркаптофенола [7] (RSH) в метаноле в присутствии гидроксида калия (схема 1).

Таблица 1. Влияние соединений олова на накопление гидропероксидов олеиновой кислоты (1 мМ, 65°C, 5 ч)

Соединение	[LOOH], % от контроля
Me_3SnCl	174
Смесь $Me_3SnCl + RSH$	18
Me_3SnSR (1)	16
$SnCl_2 \cdot 2H_2O$	210
Смесь $SnCl_2 \cdot 2H_2O + RSH$	20
$Sn(SR)_2 \cdot 2H_2O$ (2)	23
Me_2SnCl_2	188
Смесь $Me_2SnCl_2 + RSH$	28
$Me_2Sn(SR)_2$ (3)	26
RSH	14

Астраханский государственный технический университет

Южный научный центр

Российской Академии наук, Ростов-на-Дону

Московский государственный университет

им. М.В. Ломоносова

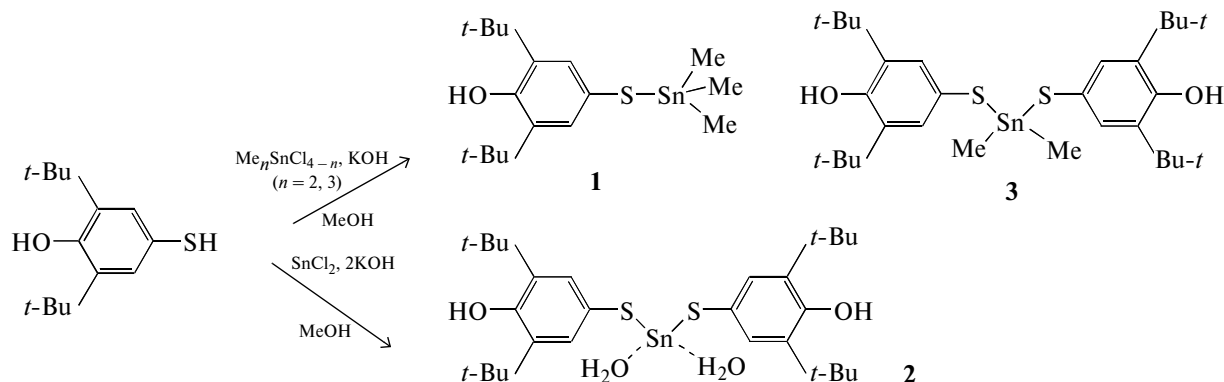


Схема 1

Строение соединений подтверждено данными ИК-спектроскопии, ЯМР и элементного анализа.

Исследование ингибирующей активности соединений **1–3** в неферментативной реакции окисления *цис*-9-октадеценовой (олеиновой) кислоты проводили в термостатируемой установке при 65°C в течение 5 ч. Влияние соединений оценивали по накоплению гидропероксидов LOOH – первичных продуктов окисления олеиновой кислоты (LH) – в сравнении с соответствующими хлоридами олова как отдельно, так и совместно с RSH.

Кинетические кривые накопления LOOH без добавок и в присутствии соединений олова имеют экспоненциальный характер, что соответствует начальному участку S-образной кривой, которая характерна для цепных радикальных реакций с вырожденным разветвлением. Добавка соединений олова, не содержащих фрагмент фенола, способствует прототипированию окислительного процесса (табл. 1), что согласуется с литературными данными [8]. При совместном добавлении хлоридов олова и RSH (в соотношении 1 : 1 для Me_3SnCl_2 и в соотношении 1 : 2 для Me_2SnCl) уровень накопления LOOH уменьшается относительно контроля в 5 раз, а по сравнению с уровнем накопления в присутствии соединений олова – в 6–11 раз.

Как известно, серосодержащие производные пространственно-затрудненных фенолов являются полифункциональными антиоксидантами, в которых возможно проявление внутреннего синергизма антиоксидантной активности [9]. При этом исследуемые соединения выступают ингибиторами смешанного типа, фенольный фрагмент участвует в обрыве кинетической цепи окисления в реакции с пероксильными радикалами, а сульфидный фрагмент молекулы разрушает гидропероксиды без образования радикалов.

Полученные данные свидетельствуют о том, что уровень накопления LOOH в присутствии тиолатов олова **1–3** сопоставим с аналогичной величиной в присутствии смеси хлоридов олова с RSH. Добавка меркаптофенола в отдельности оказалась более

эффективной, чем в смеси с оловоорганическим соединением. Таким образом, активность соединений **1–3** в неферментативной реакции пероксидного окисления олеиновой кислоты определяется наличием антиоксидантного фрагмента в составе молекулы.

Далее нами исследовано влияние соединений олова на начальную скорость накопления изомеров: (9-гидроперокси-*транс*-10,*цис*-12- и 13-гидроперокси-*цис*-9,*транс*-11-октадиеновых кислот (HPOD)) – продуктов ферментативного окисления *цис*-9,*цис*-12-октадекадиеновой (линолевой) кислоты при действии липоксигеназы-1 (LOX 1-B), которую используют как модельный фермент при исследовании гомологичного семейства липоксигеназ. Значение начальной скорости накопления HPOD в присутствии исследуемых соединений (v_0) рассчитывали по формуле

$$v_0 = \Delta c / \Delta t = \Delta A / (\Delta t \cdot \epsilon) = \text{tg} \alpha / (\Delta t \cdot \epsilon),$$

где c – концентрация гидропероксидов, t – время реакции, A – оптическая плотность, ϵ – молярный коэффициент поглощения, α – угол наклона кинетической кривой.

Установлено, что все исследованные соединения уменьшают скорость ферментативной реакции накопления HPOD (рис. 1). Наибольшее снижение (~50%) наблюдается в присутствии $\text{Sn}(\text{SR})_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (**2**).

Уменьшение скорости накопления HPOD в этой ферментативной реакции может быть связано с ингибированием фермента. Обнаруженный в работе ингибирующий эффект рассматриваемых оловоорганических тиолатов в реакции образования HPOD в присутствии LOX 1-B выражен меньше, чем эффект комплексов оловоорганических соединений с тиамидами [10].

Таким образом, в результате проведенных исследований установлена способность оловоорганических соединений со связью Sn–S, содержащих фрагмент 2,6-ди-*трет*-бутилфенола, ингибировать ферментативную реакцию образования

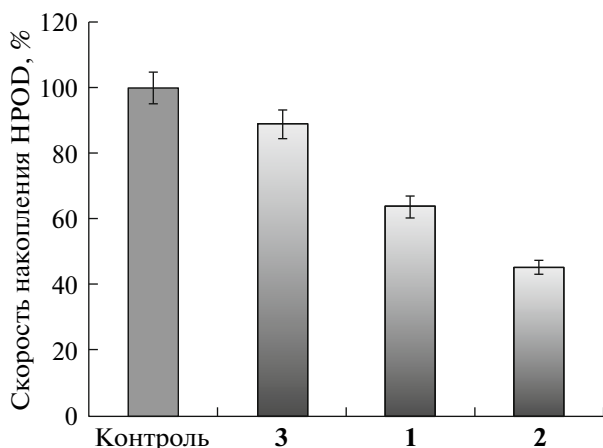


Рис. 1. Влияние оловоорганических соединений 1–3 на скорость накопления гидропероксида линолевой кислоты.

Концентрация кислоты 50 мкМ, боратный буфер pH 9.0.

гидропероксидов линолевой кислоты и выступать в качестве антиокислительных агентов.

В качестве биохимической мишени для ряда противораковых лекарственных средств выступает митотическое веретено (МТ) делящихся клеток [11]. В формировании МТ принимают участие микротрубочки, которые образуются при полимеризации белка тубулина. В связи с этим одним из механизмов противораковой активности может быть ингибирование процесса полимеризации тубулина. Соединения, взаимодействующие с SH-группами белка, способны повреждать митотическое веретено и вызывать дезорганизацию системы микротрубочек, что приводит к апоптозу [12]. Согласно литературным данным [13], хлориды ди- и тризамещенных метильных, фенильных и бутильных производных олова ингибируют полимеризацию тубулина [13]. Показано, что модифицирование тиольных групп F-актина приводит к деполимеризации этого белка под действием *n*-Bu₃SnCl [14].

Для изучения возможных механизмов цитотоксического действия новых оловоорганических тиолатов представляется важным исследование влияния данных соединений на содержание SH-групп в тубулине. В этой части работы определяли влияние оловоорганических тиолатов 1–3 на способность SH-групп тубулина к взаимодействию с реактивом Элмана – 5,5'-дителиобис(2-нитробензойной) кислотой (ДТНБ) [15]. Метод основан на связывании свободных тиольных групп тубулина с ДТНБ в реакции тиол-дисульфидного обмена и образовании аниона 5-тио-2-нитробензойной кислоты (ТНБ), хиноидная форма которого имеет максимум поглощения 412 нм.

Исследование влияния соединений олова на содержание SH-групп тубулина показало, что в

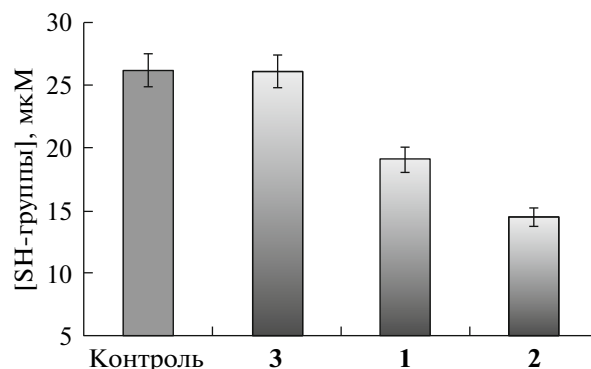


Рис. 2. Влияние соединений 1–3 на содержание SH-групп тубулина.

Концентрация соединений 1–3 50 мкМ, pH 7.10; концентрация тубулина 2 мкМ.

присутствии производного диметиллолова 3 концентрация SH-групп не меняется, производное же триметиллолова 1 снижает данный показатель на 27% (рис. 2). Наибольшее уменьшение содержания SH-групп (на 45%) наблюдается в присутствии соединения 2. Это соединение можно рассматривать в качестве потенциального антимиотического агента.

Таким образом, в работе синтезированы новые производные олова(IV) и олова(II), содержащие фрагмент 2,6-ди-*m*-*tert*-бутилфенола. Показано их антиоксидантное действие на ферментативное и неферментативное образование гидропероксидов жирных кислот. Способность Sn(SR)₂ · 2H₂O уменьшать содержание SH-групп в белке тубулине позволяет рассматривать это соединение в качестве потенциального антимиотического агента с антиоксидантной активностью.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

В работе использованы следующие вещества и растворители: KOH, Me₂SnCl₂, Me₃SnCl, SnCl₂ · 2H₂O (“Fluka”), гексан, MeOH (марки “х.ч.”), петролейный эфир 40/70, линолевая кислота (“Sigma”, 99%) без дополнительной очистки, олеиновая кислота (“Sigma”, 98%), липоксигеназа (“Sigma”, Lipoxidase from Glycine max (soybean), Type I-B), ДТНБ (“Aldrich”, 99%), тубулин (“Cytoskeleton”, 99%).

Спектры поглощения регистрировали на спектрофотометрах Evoluthion 300, Thermo и Zenyth 200rt, Anthos.

ИК-спектры поглощения записаны на спектрофотометре IR200 (Thermo Nicolet) с преобразованием Фурье в таблетках KBr. Спектры ЯМР регистрировали на спектрометре Bruker AMX-400

в CDCl_3 (^1H , 400 МГц; ^{13}C , 100 МГц). Элементный анализ выполнен на микроанализаторе Carlo Erba EA MODEL 1108.

3,5-Ди-*трет*-бутил-4-гидроксифенилтиолат триметилоловохлорида (1). К смеси 200 мг (0.85 ммоль) триметилоловохлорида и 202 мг (0.85 ммоль) RSH в 4 мл этанола добавляли 1.16 мл (1.16 ммоль) 1M KOH , реакционную смесь перемешивали в течение 30 мин. Выпавший осадок белого цвета отфильтровывали, промывали водой, затем петролейным эфиром. Осадок сушили на воздухе в течение 12 ч.

Выход 233 мг (68.3%). $T_{\text{пл}}$ 120–123°C.

Найдено, %: C 51.07, H 7.50.
 $\text{C}_{14}\text{H}_{30}\text{OSSn}$.
 Вычислено, %: C 50.90 H 7.54.

ЯМР ^1H (δ , м.д.): 0.38 (с, 9H, $\text{Sn}(\text{CH}_3)_3$, $^2J_{\text{H-Sn}}$ 28 Гц), 1.43 (с, 18 H, 4 $\text{C}(\text{CH}_3)_3$), 5.10 (с, 1 H, 1 OH), 7.21 (с, 2 H, Ar).

ЯМР ^{13}C (δ , м.д.): 4.86 (2 CH_3Sn), 30.28 (6 CH_3 , 2 Bu-*t*), 34.29 (2 $\text{C}(\text{CH}_3)_3$), 122.74, 131.15, 136.40, 152.54 ($\text{C}_{\text{аром}}$).

ИК-спектр (ν , cm^{-1}): 3627.4 (OH), 2998.8–2869.6 (C–H), 1421.3, 1292.1, 1234.2, 1134, 885.2, 777.2, 536.1.

Дигидрат бис(3,5-ди-*трет*-бутил-4-гидроксифенилтиолата) олова(II) (2). Синтезирован аналогично соединению 1. Осадок светло-желтого цвета.

Выход 65%. $T_{\text{пл}}$ 202–205°C.

Найдено, %: C 52.81, H 6.77.
 $\text{C}_{28}\text{H}_{42}\text{O}_2\text{S}_2\text{Sn}$.
 Вычислено, %: C 56.67, H 7.13.
 $\text{C}_{28}\text{H}_{42}\text{O}_2\text{S}_2\text{Sn} \cdot 2\text{H}_2\text{O}$.
 Вычислено, %: C 53.42, H 7.37.

ЯМР ^1H (δ , м.д.): 1.42 (с, 36 H, 4 $\text{C}(\text{CH}_3)_3$), 5.22 (с, 2 H, 2OH), 7.25 (с, 4H, 2 Ar).

ЯМР ^{13}C (δ , м.д.): 30.25 (12 CH_3 , 4 Bu-*t*), 34.41 (4 $\text{C}(\text{CH}_3)_3$), 118.51, 132.25, 136.65, 153.83 ($\text{C}_{\text{аром}}$).

ИК-спектр (ν , cm^{-1}): 3635.2 (OH), 2998.8–2871.5 (C–H), 1423.2, 1234.2, 1155.15, 877.5, 715.5.

Бис(3,5-ди-*трет*-бутил-4-гидроксифенилтиолат) диметилолова (3). Синтезирован аналогично соединению 1. Белый осадок.

Выход 56%. $T_{\text{пл}}$ 115–118°C.

Найдено, %: C 57.62, H 7.61.
 $\text{C}_{30}\text{H}_{48}\text{O}_2\text{S}_2\text{Sn}$.
 Вычислено, %: C 57.79, H 7.76.

ЯМР ^1H (δ , м.д.): 0.43 (с, 6 H, 2 CH_3), 1.42 (с, 36 H, 8 $\text{C}(\text{CH}_3)_3$), 5.13 (с, 2 H, 2 OH), 7.36 (с, 4 H, 2 Ar).

ЯМР ^{13}C (δ , м.д.; CDCl_3): 1.94 (2 CH_3Sn), 30.27 (12 CH_3 , 4 Bu-*t*), 34.34 ($\text{C}(\text{CH}_3)_3$), 120.88, 131.49, 136.58, 153.20 (2 $\text{C}_{\text{аром}}$).

ИК-спектр (ν , cm^{-1}): 3633.3 (OH), 2998.0–2871.5 (C–H), 1423.2, 1309.4, 1230.4, 1155.1, 875.5, 765.6, 715.5.

Работа выполнена при поддержке Минобрнауки (ФЦП, госконтракт 16.740.11.0771) и РФФИ (гранты 11–03–00389, 11–03–01134, 11–03–01165, 12–03–00776, 13–03–00487).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Jenkins R.O., Craig P.J., Francesconi K.A., et al. In: Comprehensive Organometallic Chemistry III. N.Y.: Elsevier, 2007. Ch. 12, 13. P. 603–661.
- Gielen M. // Appl. Organomet. Chem. 2002. V. 16. P. 481–494.
- Alama A., Tasso B., Novelli F., et al. // Drug Discovery. 2009. V. 6. P. 50–53.
- Xanthopoulou M.N., Hadjikakou S.K., Hadjiliadis N., et al. // Europ. J. Med. Chem. 2008. V. 43. P. 327–335.
- Milaeva E.R., Gerasimova O.A., Zhang Jingwei, et al. // J. Inorg. Biochem. 2008. V. 102. P. 1348–1358.
- Milaeva E. // Current Topics Med. Chem. 2011. V. 12. № 11. P. 2703–2713.
- Muller E., Stegman H.B., Scheffler K. // Liebigs Ann. Chem. 1961. V. 645. P. 79–91.
- Petrosyan V.S., Milaeva E.R., Gracheva Yu.A., et al. // Appl. Organomet. Chem. V. 16. № 11. P. 655–659.
- Эмануэль Н.М. Химическая физика молекулярного разрушения и стабилизации полимеров. М.: Наука, 1988. 368 с.
- Hadjikakou S.K., Ozturk I.I., Xanthopoulou M.N., et al. // J. Inorg. Biochem. 2008. V. 102. P. 1007–1015.
- Jordan M.A., Wilson L. // Nat. Rev. Cancer. 2004. V. 4. P. 253–265.
- Desai A., Mitchison T.J. // Annu. Rev. Cell. Develop. Biol. 1997. V. 13. P. 83–117.
- Jensen K.G., Onfelt A., Wallin M., et al. // Mutagenesis. 1991. V. 6. № 5. P. 409–416.
- Chow S.C., Orrenius S. // Toxicol. Appl. Pharmacol. 1994. V. 127. P. 19–26.
- Ellman G.L. // Arch. Biochem. and Biophys. 1959. V. 82. P. 70–77.