

0- 776953

На правах рукописи



Олейник Алёна Сергеевна

**СИНТЕЗ, АНТИОКСИДАНТНАЯ И БИОЛОГИЧЕСКАЯ
АКТИВНОСТЬ S-[Ω -(ГИДРОКСИАРИЛ)АЛКИЛ]ТИОСУЛЬФАТОВ
И Ω -(ГИДРОКСИАРИЛ)АЛКАНСУЛЬФОНАТОВ НАТРИЯ**

02.00.03 – органическая химия

**Автореферат
диссертации на соискание ученой степени
кандидата химических наук**

Новосибирск – 2009

Работа выполнена в ГОУ ВПО «Новосибирский государственный педагогический университет»

Научный руководитель: кандидат химических наук
доцент Кандалинцева Н.В.

Официальные оппоненты: доктор химических наук
профессор Горностаев Л.М.

кандидат химических наук
Щукин Г.И.

Ведущая организация: Институт химической биологии и
фундаментальной медицины СО РАН

Защита состоится «29» мая 2009 года в 14 ч 30 мин
на заседании диссертационного совета Д 003.049.01 при Новосибирском
институте органической химии им. Н.Н. Ворожцова СО РАН
по адресу: 630090, г. Новосибирск, проспект академика Лаврентьева, 9.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке Новосибирского института
органической химии им. Н.Н. Ворожцова СО РАН.

Автореферат разослан «29» апреля 2009 г.

НАУЧНАЯ БИБЛИОТЕКА КГУ



0000547481

Ученый секретарь диссертационного
совета, доктор химических наук

 — Петрова Т.Д.

Общая характеристика работы

Актуальность темы. К настоящему времени научно обоснована необходимость включения антиоксидантов в комплексную профилактику и терапию патологических состояний, сопровождающихся активизацией окислительных процессов в организме. Большинство фенольных антиоксидантов (ФАО), применяемых в современной медицинской практике, обладают липофильными свойствами, между тем более привлекательными для использования в фармацевтических целях считаются гидрофильные соединения, выгодно отличающиеся большей биологической доступностью и скоростью транспорта в организме, а так же возможностью направленного введения.

Описанные в литературе водорастворимые ФАО, как правило, представляют собой производные природных или синтетических фенолов, модифицированные путём введения гидрофильных групп. Противовоскислительные свойства таких соединений определяются их антирадикальной активностью. В то же время среди липофильных ФАО наиболее эффективными ингибиторами процессов свободнорадикального окисления являются антиоксиданты полифункционального действия, в частности, серо(азот)содержащие производные алкилированных фенолов, способные инактивировать как свободные радикалы, так и их предшественники – липопероксиды.

Ранее в НИИ химии антиоксидантов НГПУ на основе ω -(4-гидроксиарил)-галогеналканов был осуществлен синтез водорастворимых полифункциональных ФАО, содержащих в качестве гидрофильных группировок алкиламмонийные и изотиурониевые группы. Однако *in vivo* для данных соединений наряду с выраженной протекторной активностью фиксировали и проявление токсических свойств.

Вместе с тем, до последнего времени осуществлять направленный синтез новых гидрофильных ФАО, по свойствам заданным образом отличающихся от известных аналогов, не представлялось возможным в силу отсутствия достаточного количества сведений о влиянии структуры таких антиоксидантов на их биоантиокислительные свойства.

Это обуславливает актуальность создания новых классов гидрофильных ФАО и изучение характера изменения их противокислительных свойств и биологической активности в зависимости от строения.

В этой связи, **целью** настоящей работы явился синтез S-[ω -(гидроксиарил)-алкил]тиосульфатов и ω -(гидроксиарил)алкансульфонатов натрия и сравнительное исследование их антиоксидантной и биологической активности.

Для достижения данной цели предполагалось решить следующие **задачи**:

1. Оработать методики получения тиосульфатов и сульфонов на основе ω -(гидроксиарил)галогеналканов и осуществить синтез структурно-

взаимосвязанных рядов S-[ω -(гидроксиарил)алкил]тиосульфатов и ω -(гидроксиарил)алкансульфонатов натрия.

2. Провести сравнительное исследование антиоксидантной активности синтезированных соединений в различных модельных системах.
3. На примере влияния синтезированных соединений на светящиеся бактерии *Photobacterium phosphoreum* отследить закономерности изменения токсических свойств гидрофильных ФАО в зависимости от строения.

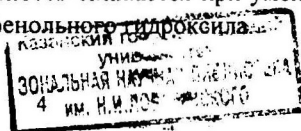
Научная новизна. На основе ω -(гидроксиарил)галогеналканов осуществлён синтез двух новых классов гидрофильных ФАО – S-[ω -(гидроксиарил)алкил]-тиосульфатов и ω -(гидроксиарил)алкансульфонатов натрия, образующих структурно-взаимосвязанные ряды, в пределах которых соединения различаются числом и строением *орто*-алкильных заместителей у фенольной ОН-группы, природой ионогенного фрагмента и степенью его удалённости от ароматического ядра, а также положением заместителя с гидрофильной группой относительно фенольного гидроксила и числом ОН-групп в ароматическом ядре.

Осуществлён синтез 3-(2-хлорэтилтио)-4,6-ди-*трет*-бутилпирокатехина и гидрофильных производных на его основе, выделен и охарактеризован побочный продукт взаимодействия названного хлорэтилтиопирокатехина с Na_2SO_3 в водно-спиртовом растворе – 5,7-ди-*трет*-бутил-8-гидрокси-4-тиохроман.

Для 39 гидрофильных и липофильных алкилфенолов определены константы скорости взаимодействия с пероксидными радикалами k_7 в модельной реакции инициированного окисления метилолеата в водно-мицеллярном растворе додецилсульфата натрия при 60 °С. Показано, что в данной модельной системе экспериментально определяемые значения k_7 зависят как от числа и строения *орто*-алкильных заместителей, так и от характера распределения антиоксиданта между мицеллярной и водной фазами.

Выявлено, что присутствие бивалентного атома серы в структуре S-[ω -(гидроксиарил)алкил]тиосульфатов усиливает их способность ингибировать Cu^{2+} -индуцированное окисление этилолеата в водно-эмульсионной среде и автоокисление сливочного масла. Таким образом показано, что названные тиосульфаты являются полифункциональными антиоксидантами, эффективность которых обусловлена совместным действием фенольной и тиосульфатной групп.

Впервые для гидрофильных ФАО проведено исследование зависимости степени выраженности токсических свойств от строения. Изучено влияние водорастворимых производных алкилфенолов на биoluminesценцию *Photobacterium phosphoreum*. Установлено, что в отличие от липофильных алкилфенолов, в рядах гидрофильных ФАО токсичность снижается при уменьшении степени пространственного экранирования фенольного гидроксила.



Научная и практическая значимость. Предложены эффективные методики синтеза S-[ω -(гидроксиарил)алкил]тиосульфатов и ω -(гидроксиарил)-алкансульфонатов натрия – эффективных гидрофильных антиоксидантов.

В рядах синтезированных соединений выявлены закономерности изменения антиоксидантной активности и токсических свойств в зависимости от строения, которые могут быть использованы при создании структур новых водорастворимых антиоксидантов.

По данным исследований, проведенных в НИИ терапии СО РАМН, НИИ клинической иммунологии СО РАМН, НИИ молекулярной биологии и биофизики СО РАМН, НЦ клинической и экспериментальной медицины СО РАМН, *in vivo* синтезированные соединения проявляют низкую токсичность в сочетании с выраженной биологической активностью и могут найти применение в качестве гепато-, кардиопротекторных, противовоспалительных и иммуностимулирующих средств.

Апробация работы. Материалы диссертации докладывались на II и III Всероссийских конференциях молодых ученых и школах им. академика Н.М. Эмануэля «Окисление, окислительный стресс, антиоксиданты» (г. Москва, 2006, 2008), VII Международной конференции «Биоантиоксидант» (г. Москва, 2006), VII Всероссийской научно-практической конференции студентов, аспирантов и молодых ученых «Молодежь и наука XXI века» (Красноярск, 2006), Всероссийской конференции «Современные проблемы органической химии» (г. Новосибирск, 2007), X Молодежной конференции по органической химии (г.Уфа, 2007), а так же на XV Международной конференции «Новые информационные технологии в медицине, биологии, фармакологии и экологии» (Украина, Ялта-Гурзуф, 2007 г), XLVII Международной научной студенческой конференции «Студент и научно-технический прогресс» (г. Новосибирск, 2009).

Публикации. Основное содержание диссертационной работы отражено в 13 публикациях: 3 статьи в рецензируемых журналах, 1 статья в сборнике и 9 тезисов докладов.

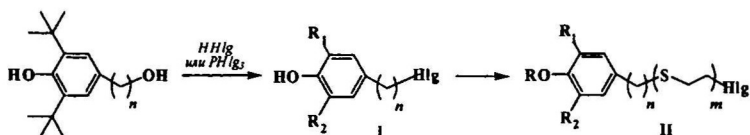
Структура и объем работы. Диссертация состоит из введения, пяти глав (литературный обзор, три главы обсуждения результатов собственных исследований и экспериментальная часть), выводов, списка цитируемой литературы (240 наименований, включая собственные публикации автора по теме диссертационной работы) и приложений. Объем диссертации – 144 страницы (без приложений), она иллюстрирована 21 таблицей и 16 рисунками.

Диссертационная работа выполнена в рамках комплексной университетской темы «Синтез и исследование полифункциональных фенольных антиоксидантов» (номер государственной регистрации 01.200.209186). Исследование биологической активности синтезированных соединений проведено при поддержке РФФИ (грант 05-04-48819).

Основное содержание работы

Исходные вещества и промежуточные продукты

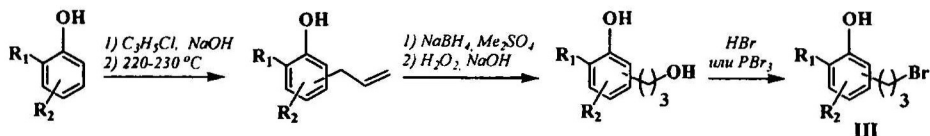
В качестве полупродуктов синтеза целевых соединений использовали галогениды **I-II**, полученные в НИИ химии антиоксидантов НГПУ на основе ω -(3,5-ди-*т*-бутил-4-гидроксифенил)алканолов разработанными ранее способами¹:



I: $R_1, R_2 = H, t\text{-Bu}$; $n = 2-4$; $Hlg = Cl, Br$;

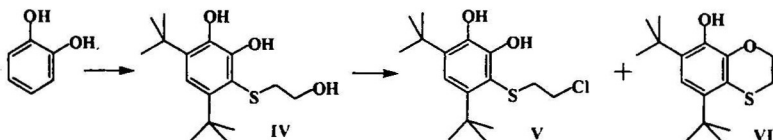
II: $R = H, Me$; $R_1, R_2 = H, t\text{-Bu}, cyclo-C_6H_{11}$; $n = 3$; $m = 0, 1$; $Hlg = Cl, Br, I$

а также бромиды **III**, синтезированные из 2-метил-6-алкил- и 2,4-ди-*т*-бутилфенолов через аллильные производные:



$R_1, R_2 = Me, t\text{-Bu}, cyclo-C_6H_{11}$

Алканол **IV** получали из незамещённого пирокатехина по последовательности превращений, предложенной ранее Л.А. Масловской с соавт.² Его превращение в хлорид **V** осуществляли под действием $SOCl_2$ в присутствии каталитических добавок ДМФА, выход целевого хлорида достигал 88 %, в качестве побочного продукта фиксировали образование тиохромана **VI** (~5% по ВЭЖХ):



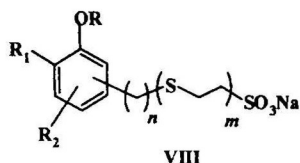
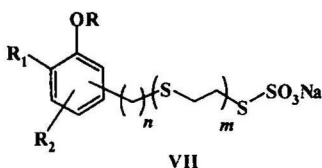
Тиохроман **VI** получали и встречным синтезом – по реакции хлорида **V** с $NaOH$.

¹ Просенко А.Е., Марков А.Ф., Пинко П.И. и др. // Пат. 1376511 РФ (1993); Просенко А.Е., Скоробогатов А.А., Дюбченко О.И. и др. // Изв. АН. Сер. химич., 2007, № 6, с. 1078; Марков А.Ф., Просенко А.Е., Кандалинцева Н.В. // Химия в интересах устойчивого развития, 2007, Т.15, с. 557.

² Масловская Л.А., Петрикевич Д.К., Тимошук В.А., Шадыро О.И. // Журн. общ. химии, 1996, №11 (66), с. 1893; они же, там же, с. 1899.

Синтез S-[ω-(гидроксиарил)алкил]тиосульфатов и -алкансульфонатов натрия

Предложены эффективные методики получения тиосульфатов VII и сульфонов VIII по реакциям соответствующих бромалкилфенолов I-III с $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ и Na_2SO_3 , соответственно, в водно-спиртовых растворах ($\text{EtOH}/\text{H}_2\text{O}$, $i\text{-PrOH}/\text{H}_2\text{O}$). Отработаны способы выделения и очистки целевых соединений, что позволило получать последние с выходами до 96 % (для VII) и 85 % (для VIII).

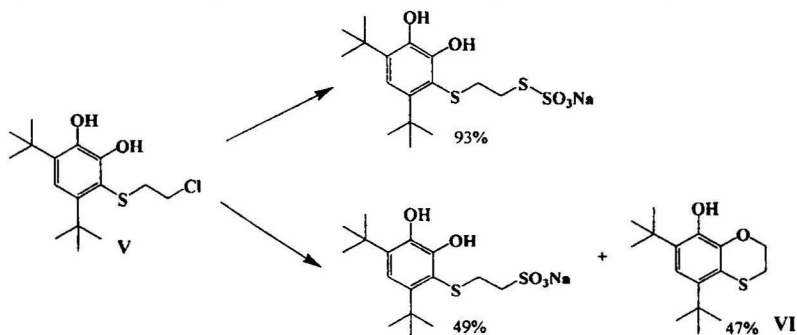


$R = \text{H}, \text{Me}; R_1, R_2 = \text{H}, \text{Me}, t\text{-Bu}, \text{cyclo-C}_6\text{H}_{11}; n = 2-4; m = 0, 1$

При взаимодействии исходных бромидов с Na_2SO_3 в реакционной массе обнаруживали побочные продукты – соответствующие алканола и их эфиры $\text{R}'\text{OC}(\text{Me})_2\text{H}$, образование которых, очевидно, обусловлено гидролизом SO_3^{2-} .

Показано, что с хорошими выходами соединения VII, VIII могут быть получены и из иод- и хлорзамещенных производных. Однако в последнем случае для проведения реакций требуются более жесткие условия. Так, S-[3-(3,5-дитрет-бутил-4-гидроксифенил)пропил]тиосульфат натрия (VIIa) получали из соответствующего бромида с выходом 88 % после 6 ч нагревания реагентов при $\sim 80^\circ\text{C}$, из хлорида – с выходом 90 % после 6 ч при $105-110^\circ\text{C}$.

Вместе с тем, в случае хлорэтилтиопирокатехина V замещение атома хлора на тиосульфатную и сульфонатную группы эффективно протекало уже при 80°C . Это свидетельствует о большей реакционной способности связи C-Cl в данном соединении, что по всей видимости связано с анхимерным содействием атома серы. При использовании в качестве нуклеофильного реагента Na_2SO_3 наряду с целевым сульфонатом наблюдалось образование тиохромана VI:



Превращение хлорпроизводного V в тиохроман VI, очевидно, связано с невысокой нуклеофильностью SO_3^{2-} , позволяющей протекать конкурентной внутримолекулярной атаке, а также гидролизом SO_3^{2-} , приводящим к подщелачиванию реакционной массы и тем самым способствующим отрыву HCl.

Изучены некоторые свойства синтезированных соединений. Установлено, что растворимость тиосульфатов VII в воде при 20 °C составляет от 7.7 до 50 г на 100 г, сульфонатов VIII от 16.7 до 50 г / 100 г.

На примере тиосульфата VIIa показано, что синтезированные тиосульфаты вступают в реакции с H_2O_2 в мягких условиях: нагревание VIIa с H_2O_2 (мольное отношение 1:2) при 40 °C и pH = 7 в течение 1 ч приводило к бис-(3,5-ди-*трет*-бутил-4-гидроксифенил)пропил]дисульфиду с выходом 80%.

Исследование антирадикальной активности синтезированных соединений

С учётом возможной области практического применения синтезированных соединений (ингибирование перекисного окисления липидов в биологических объектах) в качестве модельной системы исследования их антирадикальной активности (АРА) использовали окисление метилолеата (МО) в водном растворе додецилсульфата натрия (ДСН), как частный случай реакций окисления эфиров ненасыщенных жирных кислот в водных растворах поверхностно-активных веществ (ПАВ), которые удовлетворительно моделируют окисление липидов в биомембранах³.

Об АРА синтезированных соединений судили по величинам констант скоростей их взаимодействия с пероксидными радикалами k_7 , которые определяли с привлечением манометрического метода, основанного на изучении кинетики поглощения кислорода в процессе ингибированного окисления.

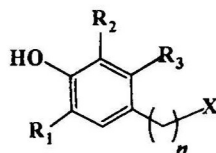
При определении величин k_7 концентрации компонентов в пробе составляли: МО – 0.133 М, инициатора (2,2'-азо-бис-(2-метилпропионамидина) дигидрохлорид, АРН) – 6.15 мМ, ДСН – 0.25 М, ФАО – 0.05-0.23 мМ. Скорость иницирования $\dot{W}$, составляла $7 \cdot 10^{-8} \text{ Мс}^{-1}$ (60 °C), длина цепей окисления – не менее 27 звеньев. Все измерения проводили в 3-8-кратной повторяемости, средняя квадратичная ошибка во всех случаях не превышала 25 %.

В рядах структурных аналогов с различным числом и строением *орто*-заместителей величины k_7 изменялись в достаточно широком диапазоне от 200 до $15200 \text{ М}^{-1}\text{с}^{-1}$ (табл. 1). При этом наименьшими значениями k_7 ($2.0\text{--}4.0 \cdot 10^2 \text{ М}^{-1}\text{с}^{-1}$) характеризовались *орто*-незамещенные соединения, наибольшими ($1.26\text{--}1.52 \cdot 10^4 \text{ М}^{-1}\text{с}^{-1}$) – производные 2-метил-6-циклогексил- и 2,6-дициклогексилфенолов.

³ Рогинский В.А. // Биол. мембраны, 1990, № 7, С. 297.

Таблица 1

Значения констант скорости k_7 для гидрофильных и липофильных фенолов при окислении метилолеата в водной среде в присутствии ДСН, 60 °С



R_1	R_2	R_3	n	X	шифр	$k_7 \cdot 10^{-3}, \text{M}^{-1} \text{s}^{-1}$
H	H	H	3	$\text{S}_2\text{O}_3\text{Na}$		0.2
H	H	H	3	SO_3Na		0.4
H	H	H	3	SC_4H_9		0.4
H	<i>t</i> -Bu	H	3	$\text{S}_2\text{O}_3\text{Na}$		1.7
H	<i>t</i> -Bu	H	3	SO_3Na		1.8
H	<i>t</i> -Bu	H	3	$\text{SC}(\text{NH}_2)_2\text{Cl}$		1.5
H	<i>t</i> -Bu	H	3	SC_4H_9		1.6
H	<i>t</i> -Bu	H	2	$\text{S}_2\text{O}_3\text{Na}$		1.3
H	<i>t</i> -Bu	H	4	$\text{S}_2\text{O}_3\text{Na}$		2.4
<i>t</i> -Bu	<i>t</i> -Bu	H	3	$\text{S}_2\text{O}_3\text{Na}$	VIIa	5.6
<i>t</i> -Bu	<i>t</i> -Bu	H	3	SO_3Na		3.5
<i>t</i> -Bu	<i>t</i> -Bu	H	3	$\text{SC}(\text{NH}_2)_2\text{Cl}$		4.2
<i>t</i> -Bu	<i>t</i> -Bu	H	3	SC_4H_9	IX	2.9
<i>t</i> -Bu	<i>t</i> -Bu	H	2	COOK		5.8
<i>t</i> -Bu	<i>t</i> -Bu	H	0	Me	ионол	27
<i>t</i> -Bu	<i>t</i> -Bu	H	3	$\text{S}(\text{CH}_2)_2\text{S}_2\text{O}_3\text{Na}$		10.2
<i>t</i> -Bu	<i>t</i> -Bu	H	3	$\text{S}(\text{CH}_2)_2\text{SO}_3\text{Na}$		10.0
Me	Me	H	3	$\text{S}_2\text{O}_3\text{Na}$		0.9
Me	Me	H	3	SO_3Na		3.1
Me	Me	H	3	SC_4H_9		3.3
H	<i>cyclo</i> - C_6H_{11}	H	3	$\text{S}_2\text{O}_3\text{Na}$		2.0
H	<i>cyclo</i> - C_6H_{11}	H	3	SO_3Na		1.8
H	<i>cyclo</i> - C_6H_{11}	H	3	SC_4H_9		2.6
<i>t</i> -Bu	$(\text{CH}_2)_3\text{S}_2\text{O}_3\text{Na}$	H	0	<i>t</i> -Bu		7.2
Me	<i>t</i> -Bu	H	3	$\text{S}_2\text{O}_3\text{Na}$		10.2
Me	<i>t</i> -Bu	H	3	SO_3Na		9.1
<i>cyclo</i> - C_6H_{11}	<i>cyclo</i> - C_6H_{11}	H	3	$\text{S}_2\text{O}_3\text{Na}$		12.6
<i>cyclo</i> - C_6H_{11}	<i>cyclo</i> - C_6H_{11}	H	3	SO_3Na		13.1
Me	<i>cyclo</i> - C_6H_{11}	H	3	$\text{S}_2\text{O}_3\text{Na}$		15.2
<i>t</i> -Bu	OH	$\text{S}(\text{CH}_2)_2\text{S}_2\text{O}_3\text{Na}$	0	<i>t</i> -Bu		9.4
<i>t</i> -Bu	OH	$\text{S}(\text{CH}_2)_2\text{SO}_3\text{Na}$	0	<i>t</i> -Bu		3.4
<i>t</i> -Bu	OH	$\text{S}(\text{CH}_2)_2\text{SC}(\text{NH}_2)_2\text{Cl}$	0	<i>t</i> -Bu		3.1

Гидрофильные производные 3,5-ди-*трет*-бутилпирокатехина в рассматриваемой модельной системе характеризовались величинами k_7 близкими к таковым для соответствующих производных 2,6-ди-*трет*-бутилфенола.

Удлинение *пара*-алкильной цепи, разделяющей арильный и тиосульфатный фрагменты, в молекулах моно- и ди-*орто-трет*-бутилзамещенных тиосульфатов приводило к увеличению константы скорости k_7 . Соединения с одинаковым строением гидроксиралкильного фрагмента и различными гидрофильными группами, а также их липофильные аналоги – бутил-3-(4-гидроксиарил)-пропилсульфиды, – характеризовались близкими величинами k_7 .

Вместе с тем, ионол по значению k_7 существенно превосходил другие производные 2,6-ди-*трет*-бутилфенола, в частности тиосульфат VIIa и сульфид IX, в то же время при окислении метилолета в хлорбензоле (гомогенный раствор) названные соединения характеризовались практически одинаковыми значениями k_7 ⁴. С привлечением УФ-спектроскопии нами было показано, что в бифазной системе “МО – вода” тиосульфат VIIa находится преимущественно в воде, тогда как ионол нацело, а сульфид IX в значительной степени переходят в МО. Это позволяет считать, что в рассматриваемой модельной системе экспериментально измеряемые величины k_7 зависят как от особенностей строения молекул ФАО, так и от их распределения между мицеллами и водной фазой.

Исследование общей ингибирующей активности

Молекулярный дизайн S-[ω-(гидроксиарил)алкил]тиосульфатов VII предполагает наличие у этих соединений двух типов противooksидательной активности: антирадикальной у фенольной ОН-группы и противопероксидной у бивалентного атома серы тиосульфатного фрагмента. В этой связи наряду АРА данных соединений не тождественна их общей ингибирующей активности (Total Antioxidant Activity, TAA).

Сравнение ТАА тиосульфатов VII и сульфонов VIII проводили в двух модельных системах – при Cu^{2+} -индуцированном окислении этилолеата в водной эмульсии (60 °С) и автоокислении сливочного масла (27 °С).

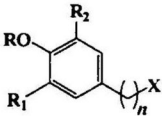
Окисление этилолеата в водно-эмульсионной среде проводили по известной методике, предложенной ранее в качестве способа тестирования средств антиоксидантотерапии⁵. Рабочие концентрации компонентов пробы составляли: этилолеата – 0.67 М, CuCl_2 – 3 мМ, ФАО – 2 мМ, ПАВ (цетилтриметиламмония бромид) – 0.03 М. Давление кислорода – 1 атм. Об эффективности ФАО судили по длительности периода индукции ингибированного окисления (τ).

⁴ Кандалинцева Н.В., Дюбченко О.И., Терах Е.И. и др. // Хим.-фарм. журн., 2002, № 4 (36), с. 13; Просенко А.Е., Марков А.Ф., Хомченко А.С. и др. // Нефтехимия, 2006, № 6 (46), с. 471.

⁵ Ушкалова В.Н., Перевозкина М.Г., Барышников Э.В. // Свободно-радикальное окисление липидов в эксперименте и клинике: Сб. науч. трудов, Ч. 1., Тюмень: Изд-во Тюмен. гос. ун-та, 1997, с. 77.

Таблица 2

Периоды индукции Cu^{2+} -индуцированного окисления этилолеата, ингибированного синтезированными соединениями

Общая формула	Соединение					τ^* , мин
	R	R ₁	R ₂	n	X	
	Me	H	H	3	S ₂ O ₃ Na	13
	Me	H	H	3	SO ₃ Na	10
	H	H	H	3	S ₂ O ₃ Na	53
	H	H	H	3	SO ₃ Na	38
	H	H	<i>t</i> -Bu	3	S ₂ O ₃ Na	64
	H	H	<i>t</i> -Bu	3	SO ₃ Na	59
	H	<i>t</i> -Bu	<i>t</i> -Bu	3	S ₂ O ₃ Na	258
	H	<i>t</i> -Bu	<i>t</i> -Bu	3	SO ₃ Na	200
	H	<i>t</i> -Bu	<i>t</i> -Bu	2	COOK	93

* Для неингибированного окисления $\tau = 10$ мин

Согласно полученным данным (табл. 2) все исследованные соединения, за исключением анизольных производных, обладали выраженной способностью ингибировать Cu^{2+} -индуцированное окисление этилолеата. При этом, как и в случае АРН-инициированного окисления МО в мицеллах ДСН, в рядах тиосульфатов и сульфонатов с увеличением числа *трет*-бутильных *орто*-заместителей наблюдалось усиление противоокислительных свойств.

Вместе с тем, независимо от числа заместителей в ароматическом ядре тиосульфаты превосходили по ингибирующему действию соответствующие сульфонаты. Это свидетельствует о проявлении тиосульфатной группой противоокислительной активности и позволяет считать S-[ω -(гидроксиарил)алкил]-тиосульфаты VII полифункциональными антиоксидантами.

Окисление сливочного масла с добавками ФАО (1 мкмоль/г) проводили на воздухе в тонком (2-3 мм) слое при 27 °С. О степени окисленности масла судили по накоплению перекисных продуктов, концентрацию которых определяли колориметрически железороданидным методом.

Наиболее эффективно окисление сливочного масла ингибировали тиосульфаты на основе 2,6-ди-*трет*-бутилфенола и 3,5-ди-*трет*-бутилпирокатехина, которые по противоокислительному действию превосходили реперный антиоксидант фенозан калия (3-(3,5-ди-*трет*-бутил-4-гидроксифенил)пропионат калия) (рис. 1). Замена тиосульфатной группы на сульфонатную, а также снижение пространственной экранированности фенольного гидроксила приводили к снижению антиокислительной активности соединений.

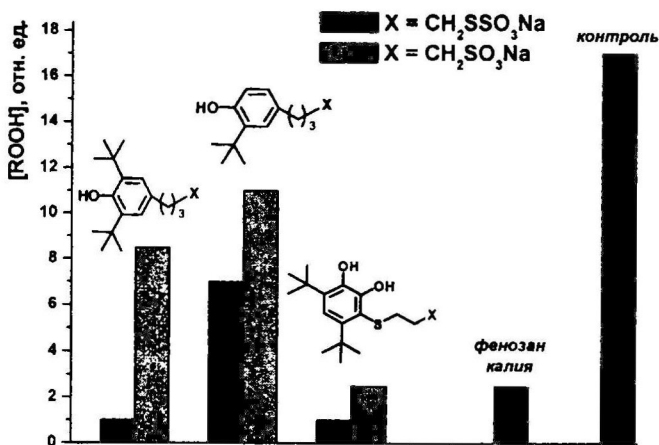


Рис. 1. Относительное содержание гидропероксидов в сливочном масле после 3 мес. окисления при 27 °С.

Исследование влияния синтезированных соединений на биолюминесценцию *Photobacterium phosphoreum*

Первичную оценку степени токсического влияния синтезированных соединений на живые организмы проводили с использованием биохемилюминесцентного метода и культур светящихся бактерий *Photobacterium phosphoreum* из коллекции Института биофизики СО РАН. О токсичности соединений судили по величине ID_{50} , численно равной концентрации ФАО, в присутствии которой интенсивность бактериальной люминесценции снижалась на 50 %.

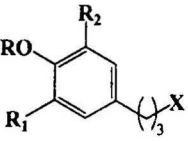
Полученные данные (табл. 3) свидетельствуют, что степень токсического влияния гидрофильных ФАО на *Ph. phosphoreum* зависит как от природы ионогенного фрагмента, так и от числа и строения *орто*-заместителей в ароматическом ядре. Величины ID_{50} для синтезированных тиосульфатов и сульфонатов принимали значения от 0.21 до 5.90 мМ, а для соответствующих хлоридов S-[ω-(4-гидроксиарил)алкил]изотиуриония⁶ варьировали в более широком диапазоне – от 0.02 до 670 мМ.

Независимо от природы ионогенного фрагмента в ряду *орто*-дизамещенных соединений величины ID_{50} возрастали при переходе от ди-*трет*-бутилированных соединений к менее экранированным аналогам. Метилирование фенольной ОН-группы также приводило к снижению токсического действия соединений.

⁶ Кандалинцева Н.В., Просенко А.Е., Дюбченко О.И., Стоянов Е.С. // Журн. орг. химии, 2001, № 9 (37), с. 1317.

Таблица 3

Значения ID_{50} для исследованных гидрофильных алкилфенолов

формула	R	R ₁	R ₂	ID_{50} , мМ		
				X		
				SO ₃ Na	SSO ₃ Na	SC(NH ₂) ₂ Cl
	Me	H	H	2.38	5.87	670
	H	H	H	0.21	3.14	235
	H	H	<i>t</i> -Bu	0.51	1.84	46
	H	<i>t</i> -Bu	<i>t</i> -Bu	1.34	0.65	0.02
	H	<i>cyclo</i> -C ₆ H ₁₁	<i>cyclo</i> -C ₆ H ₁₁	1.96	0.37	...
	H	Me	Me	5.41	4.68	208
	H	<i>t</i> -Bu	Me	5.90	1.38	...
	H	H	<i>cyclo</i> -C ₆ H ₁₁	1.00	0.96	...

В ряду ди-*трет*-бутилзамещённых соединений при переходе от сульфоната к тиосульфату и далее к хлориду изотиурония значения ID_{50} снижались с 1.34 до 0.02 мМ, в тоже время в аналогичных рядах ди- и моно-*орто*-незамещённых соединений наблюдалось увеличение значений ID_{50} . В рядах изотиурониевых и тиосульфатных производных при последовательном удалении *трет*-бутильных групп способность соединений подавлять бактериальную биолюминесценцию уменьшалась, в ряду аналогичных сульфонатов, напротив, увеличивалась.

В рамках настоящего исследования принципиально важным являлся вопрос о возможности использования величин ID_{50} , полученных на бактериальных культурах, для прогноза токсических свойств исследуемых соединений в отношении лабораторных животных.

Острую токсичность исследуемых соединений в отношении лабораторных животных изучали в НИИ клинической иммунологии СО РАМН. Средние летальные дозы LD_{50} определяли на мышах при внутрибрюшинном введении препаратов. В результате было установлено, что синтезированные нами тиосульфаты и сульфонаты характеризуются величинами LD_{50} в диапазоне от 150 до 1000 и от 120 до 3000 мг/кг соответственно, в то время как предложенные ранее гидрофильные производные 3-(4-гидроксиарил)пропильного ряда, содержащие в качестве полярных фрагментов изотиурониевые и алкиламмонийные группы, более токсичны – величины LD_{50} составляют от 30 до 175 и от 50 до 125 мг/кг соответственно⁷.

⁷ Фенольные биоантиоксиданты / Зенков Н.К., Кандалинцева Н.В., Ланкин В.З., Меньщикова Е.Б., Просенко А.Е. – Новосибирск: СО РАМН, 2003. – 328 с.; Дюбченко О.И., Никулина В.В., Марков А.Ф. и др. // Хим.-фарм. журн., 2006, № 4 (40), с. 117.

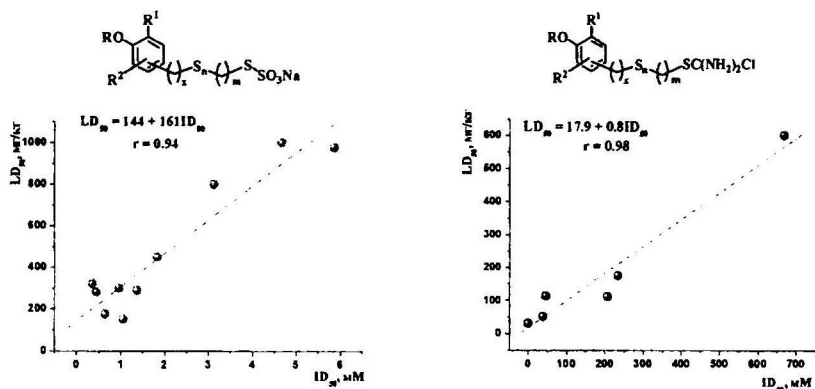


Рис. 2. Зависимость между величинами LD_{50} и ID_{50} для S-[ω-(гидроксиарил)алкил]-тиосульфатов и хлоридов S-[ω-(гидроксиарил)алкил]изотиурония

Показано (рис. 2), что величины, количественно характеризующие токсическое влияние гидрофильных ФАО на бактериальные культуры *Ph. Phosphoreum* и лабораторных животных в отдельных реакционных сериях коррелируют друг с другом. Это может быть использовано в практических целях для оценки острой токсичности вновь синтезированных соединений по значениям ID_{50} .

Биоантиоксидантные свойства синтезированных соединений *in vitro* и *in vivo*

Биоантиоксидантные свойства синтезированных тиосульфатов и сульфонов изучались в НИИ клинической иммунологии СО РАМН, НИИ терапии СО РАМН, НИИ молекулярной биологии и биофизики СО РАМН и НЦ клинической и экспериментальной медицины СО РАМН.

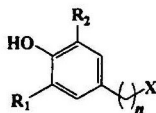
Показано, что *in vitro* все исследованные S-[ω-(гидроксиарил)алкил]-тиосульфаты и -сульфонаты, проявляют выраженную антиокислительную активность, в том числе при окислении липопroteинов низкой плотности (ЛНП) в присутствии ионов металлов переменной валентности и при образовании пероксонитрита при разложении морфолиносиднонимина (табл. 4). Изменение противоокислительного действия соединений в зависимости от степени пространственной экранированности фенольной ОН-группы носило неоднозначный характер, но во всех случаях соединения с тиосульфатной группой превосходили по эффективности свои сульфонатные аналоги. Это свидетельствует о том, что в биологических системах синтезированные тиосульфаты VII также проявляют себя как полифункциональные антиоксиданты.

Для отдельных представителей синтезированных соединений *in vivo* показано наличие гепатопротекторной (модель CCl_4 -индуцированного токсического гепатита мышей), кардиопротекторной (модель ишемии/реперфузии изолированных сердец крыс), иммуностимулирующей (модель иммунодефицита у мышей, подвергшихся облучению или введению циклофосфана) и противовоспалительной (модель каррагинан-индуцированного отёка лапы у крыс) активностей, а также способности активизировать редоксчувствительные факторы транскрипции (культуры клеток гепатомы человека HepG2).

Высказано предположение, что противовоспалительный эффект синтезированных соединений реализуется через их способность индуцировать экспрессию контролируемых антиоксидант-респонсивным элементом (ARE) генов, кодирующих белки, участвующие в воспалительном процессе.

Таблица 4

Биоантиоксидантная активность гидрофильных фенольных соединений



Соединение				Cu^{2+} - зависимое окисление ЛНП, ID ₅₀ , мкМ	ONOO ⁻ ID ₅₀ , мкМ	Снижение активности АЛАТ ^a , %	Прирост объёма лапы ^b , %	Экспрессия GSTP1 ^c , %
R ₁	R ₂	n	X					
H	H	3	S ₂ O ₃ Na	400	2.9	22	42*	124.5*
H	H	3	SO ₃ Na	2770	5.9		39*	106.6*
H	<i>t</i> -Bu	3	S ₂ O ₃ Na	30	9.7		15*	186.2*
H	<i>t</i> -Bu	3	SO ₃ Na	43	10.1		26*	128.9*
<i>t</i> -Bu	<i>t</i> -Bu	3	S ₂ O ₃ Na	10	10.7	58*	37*	33.7*
<i>t</i> -Bu	<i>t</i> -Bu	3	SO ₃ Na	15	24.7	48*	37*	151.1*
<i>t</i> -Bu	<i>t</i> -Bu	2	COOK	13	21.3	40*	30*	

a – снижение активности аланинаминотрансферазы (гепатоцеллюлярный фермент, появляющийся в кровяном русле при повреждении мембран гепатоцитов) в сыворотке крови мышей на фоне введения ФАО (20 мг/кг, внутривенно);

b – прирост объёма лапы при введении каррагинана без антиоксидантной защиты – 60 %, вводимая доза ФАО – 100 мг/кг, перорально;

c – экспрессия GSTP1 (ARE-зависимый ген, кодирующий глутатион-S-трансферазу P1) при обработке клеток HepG2 известным индуктором ARE *трет*-бутилгидрохиноном – 100 %, [ФАО]=20мкМ;

* – достоверно значимое отличие от контроля

Выводы

1. Осуществлен синтез S-[ω -(гидроксиарил)алкил]тиосульфатов и ω -(гидроксиарил)алкансульфонатов натрия, образующих структурно-взаимосвязанные ряды, в которых соединения различаются числом и строением *орто*-алкильных заместителей; длиной цепи, разделяющей арильный и ионогенный фрагменты; положением заместителя с гидрофильным фрагментом относительно ароматического гидроксила; числом OH-групп в ароматическом ядре.
2. Показано, что 3-(2-хлорэтилтио)-4,6-ди-*трет*-бутилпирокатехин в реакциях нуклеофильного замещения с $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ и Na_2SO_3 превосходит по реакционной способности 3-(4-гидроксиарил)-1-хлорпропан. Выделен и охарактеризован побочный продукт взаимодействия названного хлорэтилтиопирокатехина с Na_2SO_3 в водно-спиртовом растворе – 5,7-ди-*трет*-бутил-8-гидрокси-4-тиохроман.
3. Для 39 соединений впервые измерены константы скорости взаимодействия с пероксидными радикалами k_7 при окислении метилолеата в водно-мицеллярном растворе додецилсульфата натрия. Показано, что в рядах синтезированных соединений с увеличением пространственной экранированности фенольной OH-группы величины k_7 изменяются немонотонно: наименьшими величинами k_7 ($2.0\text{--}4.0 \cdot 10^2 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$) характеризуются *орто*-незамещенные соединения, наибольшими ($1.26\text{--}1.52 \cdot 10^4 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$) – производные 2-метил-6-циклогексил- и 2,6-дициклогексилфенолов. В рядах *трет*-бутилзамещенных S-[ω -(4-гидроксиарил)алкил]тиосульфатов удлинение цепи, разделяющей ароматическое ядро и тиосульфатную группу также способствовало увеличению значений k_7 .
4. Характер изменения величины k_7 в рядах гидро- и липофильных производных ω -(4-гидроксиарил)алкильного типа свидетельствует, что экспериментально определяемые при окислении метилолеата в водном растворе додецилсульфата натрия значения k_7 зависят как от строения молекулы антиоксиданта, так и его распределения в водно-мицеллярной системе.
5. По способности ингибировать Cu^{2+} -индуцированное окисление этилолеата, автоокисление сливочного масла и наработку различных видов активированных кислородных метаболитов ω -(гидроксиарил)алкансульфонаты уступают соответствующим тиосульфатам, что позволяет рассматривать последние как полифункциональные антиоксиданты.
6. Установлено, что степень токсического влияния водорастворимых ФАО на светящиеся бактерии и лабораторных животных зависит как от степени пространственного экранирования фенольной OH-группы, так и от природы гидрофильного фрагмента. В рядах соединений с одинаковым строением ω -(4-гидроксиарил)алкильного фрагмента токсичность снижалась при замене

изотиурониевой группы на тиосульфатную и далее на сульфонатную. Независимо от природы ионогенного фрагмента токсические свойства уменьшались при переходе от *орто*-ди-*трет*-бутилзамещенных гидрофильных алкилфенолов к менее экранированным аналогам.

7. Показано, что синтезированные S-[ω -(гидроксиарил)алкил]тиосульфаты и ω -(гидроксиарил)алкансульфонаты натрия характеризуются низкой токсичностью (IV (малотоксично) – V (практически нетоксично) классы токсичности), *in vitro* и *in vivo* проявляют выраженную биологическую активность и могут найти применение в качестве биоантиоксидантов, противовоспалительных, гепато-, кардиопротекторных средств, а также активаторов антиоксидант-респонсивного элемента.

Основное содержание диссертации изложено в следующих публикациях:

1. Зенков Н.К., Меньшикова Е.Б., Кандалинцева Н.В., Олейник А.С., Просенко А.Е., Гусаченко О.Н., Шкляева О.А., Вавилин В.А., Ляхович В.В. Антиоксидантные и противовоспалительные свойства новых водорастворимых серо-содержащих фенольных соединений // Биохимия. – 2007. – том 72, вып.6. – С. 790-798.
2. Олейник А.С., Куприна Т.С., Певнева Н.Ю., Марков А.Ф., Кандалинцева Н.В., Просенко А.Е., Григорьев И.А. Синтез и антиоксидантные свойства S-[3-(гидроксиарил)пропил]тиосульфатов и [3-(гидроксиарил)пропан]-1-сульфонатов натрия // Изв. АН. Сер. Хим. – 2007. – №6. – С. 1094-1101.
3. Олейник А.С., Певнева Н.Ю., Кандалинцева Н.В., Просенко А.Е., Хощенко О.М., Душкин М.И. Синтез и биологическая активность гидрофильных алкилфенолов// Химия в интересах устойчивого развития. – 2008. – №16. – С. 559 – 564.
4. Иванова А.С., Халикова Н.Р., Кандалинцева Н.В. Исследование токсических свойств галогенидов S-(3-(4-гидроксиарил)пропил)изотиурония биolumинесцентным методом // Сборник науч. работ студентов и молодых ученых. – Новосибирск: НГПУ, 2006. Вып. 8. – Ч.1. – С. 205-211.

Тезисы всероссийских и международных конференций

5. Иванова А.С., Кандалинцева Н.В., Просенко А.Е. Применение биolumинесцентного метода для изучения токсичности водорастворимых фенольных антиоксидантов // Мат. II Всерос. конф. молодых ученых и школы им. академика Н.М. Эмануэля «Окисление, окислительный стресс, антиоксиданты» – М.: Изд-во РУДН, 2006. – С. 107-109.
6. Иванова А.С., Кандалинцева Н.В. Сравнительное изучение токсичности солей S-[3-(4-гидроксиарил)пропил]изотиурония биolumинесцентным методом // Мат. VII Всерос. научно-практ. конф. студентов, аспирантов и молодых ученых «Молодежь и наука XXI века»: в 2 т. – Т.2. – Красноярск, 2006. – С. 216-217.

7. Певнева Н.Ю., Куприна Т.С., Ягунов С.Е., Иванова А.С., Кандалинцева Н.В., Просенко А.Е. Синтез серосодержащих гидрофильных антиоксидантов на основе пирокатехина // Мат. VII Междунар. конф. «Биоантиоксидант» – М.: Изд-во РУДН, 2006. – С. 215-216.
8. Кандалинцева Н.В., Олейник А.С., Куприна Т.С., Певнева Н.Ю., Дюбченко О.И., Просенко А.Е. Гидрофильные гибридные антиоксиданты фенольного типа: синтез и биологическая активность // Мат. Всерос. науч. конф. «Современные проблемы органической химии». – Новосибирск, 2007. – С. 141.
9. Олейник А.С., Куприна Т.С., Ягунов С.Е., Кандалинцева Н.В., Просенко А.Е. Синтез и антирадикальные свойства сульфонатных и тиосульфонатных производных на основе алкилзамещенных моно- и двухатомных фенолов // Мат. Всерос. науч. конф. «Современные проблемы органической химии». – Новосибирск, 2007. – С. 149.
10. Кандалинцева Н.В., Олейник А.С., Дюбченко О.И., Просенко А.Е., Меньщикова Е.Б., Зенков Н.К. Гидрофильные гибридные антиоксиданты фенольного типа: активность *in vitro* и *in vivo* // Мат. XV междунар. конф. и дискуссионного научного клуба «Новые информационные технологии в медицине, биологии, фармакологии и экологии» – Украина, Крым, Ялта-Гурзуф, 2007г. – С. 405-406.
11. Олейник А.С., Кандалинцева Н.В. Соли Бунте на основе гидроксирарилгалогеналканов как перспективные антиоксиданты // Мат. X Молодежной конф. по органической химии. – Уфа: изд-во «Реактив» – 2007. –С. 229.
12. Олейник А.С., Трубникова Ю.Н., Кандалинцева Н.В., Просенко А.Е. S-[ω -(гидроксирарил)алкил]тиосульфаты натрия – полифункциональные гидрофильные антиоксиданты // Мат. III Всерос. конф. молодых ученых и школы им. академика Н.М. Эмануэля «Окисление, окислительный стресс, антиоксиданты» – М.: Изд-во РУДН, 2008. – С. 215-217.
13. Гаас Н.А., Олейник А.С., Кандалинцева Н.В. Изучение антирадикальной активности гидрофильных и липофильных тиаалкилфенолов при окислении метилолеата в водно-мицеллярном растворе // Мат. XLVII Межд. науч. студен. конф. «Студент и научно-технический прогресс»: Химия. – Новосибирск, 2009.– С. 105.

Лицензия Л.Р. № 020059 от 24.03.97
Гигиенический сертификат 54.НК.05.953.П.000149.12.02 от 27.12.02

Подписано в печать 27.04.09. Формат бумаги 60х84/16.
Печать RISO. Уч.-изд.л. 1,5. Усл. п.л. 1,2. Тираж 100 экз.
Заказ № 9 .

Педуниверситет, 630126, Новосибирск, 126, Вилюйская, 28.

