

## АНТИОКСИДАНТНЫЕ И АНТИГЛИКИРУЮЩИЕ СВОЙСТВА N-АЦЕТИЛЦИСТЕИНАТА 6-ГИДРОКСИ-2-АМИНОБЕНЗОТИАЗОЛА

© 2019 г. А. Е. Донцов<sup>1</sup>, Н. Л. Сакина<sup>1\*</sup>, Ю. В. Кузнецов<sup>1</sup>, М. А. Островский<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup>Институт биохимической физики им. Н.М. Эмануэля Российской академии наук, Москва, Россия

<sup>2</sup>Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова, Москва, Россия

\*E-mail: nsakina@mail.ru

Поступила в редакцию 05.06.2019;

после доработки 05.06.2019;

принята в печать 20.06.2019

Исследована антиоксидантная и антигликирующая активность водорастворимого гетероциклического антиоксиданта N-ацетилцистеината 6-гидрокси-2-аминобензотиазола (АЦЦ ГАБТИ). Хемилюминесцентным методом установлена высокая антирадикальная активность этого вещества. Показано, что АЦЦ ГАБТИ проявляет высокую антиоксидантную активность в отношении процесса пероксидации фоторецепторных клеток, индуцированного ультрафиолетовым облучением, ионами двухвалентного железа, а также видимым светом в присутствии “пигмента старости” липофусцина или его флуорофора А2Е. Установлено, что АЦЦ ГАБТИ эффективно тормозит процессы фруктозилирования сывороточного альбумина и белков фоторецепторных клеток. Ингибирующая способность АЦЦ ГАБТИ в отношении процесса модификации альбумина фруктозой сопоставима с активностью известных антигликирующих препаратов аминогуанидина и пиридоксамина и значительно превышает таковую для мексидола. Делается предположение о перспективности использования этого соединения в фармакологической практике для предотвращения и лечения метаболического синдрома.

**Ключевые слова:** гетероароматические антиоксиданты, пероксидация липидов, антигликирующая активность, фотопротекция.

**DOI:** 10.1134/S0207401X19120069

### ВВЕДЕНИЕ

Работа по синтезу и изучению физико-химических свойств гетероциклических фенолов как перспективных антиоксидантов была предложена и осуществлена Л.Д. Смирновым, К.М. Дюмаевым и их коллегами [1, 2]. При поиске эффективных ингибиторов свободнорадикальных процессов биогенного типа ими были выбраны производные 3-оксипиридина, ингибирующие свойства которых могли быть связаны с наличием гидроксильной группы при сопряженной циклической системе связей. Структура этих веществ близка к структуре соединений группы витамина В6 (пиридоксол, пиридоксамин и пиридоксаль), играющих важную роль в жизнедеятельности организма. Кроме того, присутствие в цикле наряду с оксигруппой атома азота позволяло получать водорастворимые соединения за счет образования солей, что сделало возможным создание инъекционных лекарственных форм. Основой для медико-биологического применения указанных соединений исходно послужила развитая акад. Н.М. Эмануэлем концепция о возможности подавления не-

токсичными ингибиторами нежелательных свободнорадикальных реакций, возникающих в организме при патологических состояниях [3, 4]. На сегодняшний день в медицинской практике широко применяются такие синтетические препараты, относящиеся к антиоксидантам гетероциклического ряда [5–7], как мексидол (3-окси-6-метил-2-этилпиридина сукцинат), эмоксипин (3-окси-6-метил-2-этилпиридина хлорид) и мексикор (гидрохлорид и сукцинат 2-этил-6-метил-3-оксипиридина).

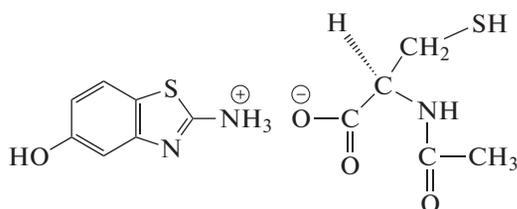
Ранее нами были исследованы антирадикальные свойства различных производных аминобензотиазола [8–10], в том числе ацетилцистеината 6-гидрокси-2-аминобензотиазола (АЦЦ ГАБТИ) [11]. Цель настоящей работы – исследование ингибирующего действия АЦЦ ГАБТИ в отношении процесса модификации белков при гликировании, а также сравнение антиоксидантной, антирадикальной и фотопротекторной активности АЦЦ ГАБТИ и мексидола, который является эффективным антиоксидантом и обладает уникальным многофакторным механизмом действия [12, 13].

## ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

### *Синтез ацетилцистеината 6-гидрокси-2-аминобензотиазола*

Синтез АЦЦ ГАБТИ (Схема 1) основан на взаимодействии эквимольных количеств 6-гидрокси-2-аминобензо-тиазола и N-ацетил-L-цистеина в растворе низшего спирта при кипячении с последующими частичной отгонкой растворителя, охлаждением реакционной массы, отделением выпавших кристаллов и перекристаллизацией полученного продукта из этилового спирта с добавкой активированного угля [11].

Схема 1. Структурная формула АЦЦ ГАБТИ



### *Выделение наружных сегментов фоторецепторов из сетчатки глаза быка*

Наружные сегменты фоторецепторов (НСФ) были выделены из сетчатки глаза быка по модифицированной методике [14].

### *Выделение липофусциновых гранул из РПЭ глаз человека*

Липофусциновые гранулы были изолированы из клеток ретинального пигментного эпителия с помощью модифицированной методики, предложенной Boulton и Marshall [15].

### *Измерение антирадикальной активности АЦЦ ГАБТИ и мексидола*

Антирадикальную активность изучаемых веществ оценивали с помощью хемилюминесцентной модельной системы окисления, состоящей из гемоглобина, пероксида водорода и люминола [16]. В качестве измеряемого параметра была взята максимальная интенсивность свечения (амплитуда хемилюминесценции).

### *Измерение кинетики пероксидации липидов наружных сегментов фоторецепторов*

Кинетику пероксидации липидов наружных сегментов фоторецепторов определяли по накоплению продуктов реакции с тиобарбитуровой кислотой (ТБК-активные продукты), содержание которых измеряли по поглощению при длине волны 532 нм [17].

### *Облучение образцов видимым и УФ-светом*

Для облучения образцов полным белым светом в видимом диапазоне (390–700 нм) использовали галогенную лампу накаливания КГМ24–150 мощностью 150 Вт (энергия облучения – 100 мВт/см<sup>2</sup>) с оптической системой фокусирования и тепловым фильтром при непрерывном перемешивании. Для облучения образцов УФ-светом использовали сфокусированный полный белый свет дуговой ртутно-кварцевой лампы ДРК-120 (мощность – 120 Вт, световой поток – 3900 Лм) на расстоянии 15 см от объекта при постоянном перемешивании. Свет этого источника включает как УФ-полосы, начиная со 190 нм, так и видимую область спектра.

### *Устойчивость к действию видимого и УФ-облучения*

Принципиально важной характеристикой антиоксидантов, особенно применяемых в офтальмологии, является их устойчивость к действию света. На рис. 1 представлены дифференциальные спектры поглощения этих соединений через 10 мин (мексидол – кривая 2) и через 30 мин облучения (АЦЦ ГАБТИ – кривая 1). Видно, что мексидол уже через 10 мин претерпевает фотодеструкцию, распадаясь на неактивные компоненты, в то время как АЦЦ ГАБТИ в тех же условиях облучения и через 30 мин остается стабильным и не претерпевает каких-либо существенных спектральных изменений. Даже экспозиция АЦЦ ГАБТИ в течение 1 ч не приводила к значительным изме-

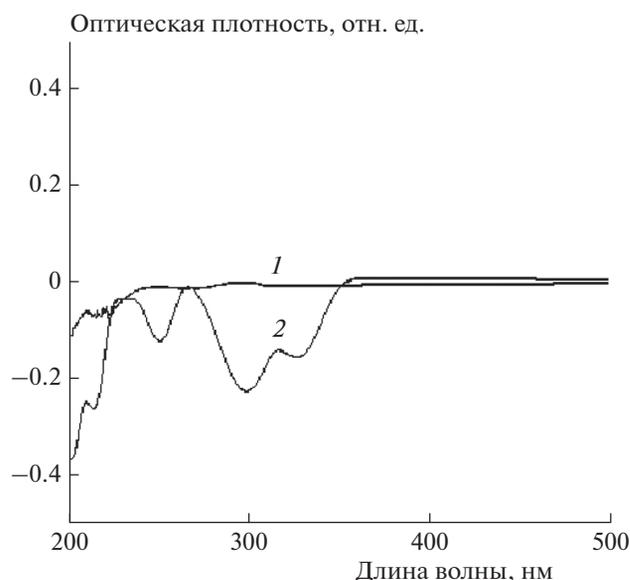


Рис. 1. Дифференциальные спектры поглощения АЦЦ ГАБТИ (кривая 1) и мексидола (кривая 2) после УФ-облучения.

нениям его состава (на рис. 1 не показано), что свидетельствует о его высокой устойчивости к действию УФ- и видимого облучения.

### Сравнение антирадикальной активности АЦЦ ГАБТИ и мексидола

Антирадикальная активность АЦЦ ГАБТИ, измеренная в наших опытах в хемилюминесцентной модельной системе окисления люминола, оказалась в несколько раз выше, чем у мексидола. Из значений констант тушения для АЦЦ ГАБТИ —  $(2.4 \pm 0.4) \cdot 10^5 \text{ M}^{-1}$  и мексидола —  $(3.6 \pm 0.5) \cdot 10^4 \text{ M}^{-1}$  следует, что антирадикальная активность АЦЦ ГАБТИ более чем в 6 раз превышает таковую для мексидола.

### Ингибирующее действие АЦЦ ГАБТИ на процесс перекисидации липидов в сравнении с мексидолом

Как продемонстрировано в экспериментах с суспензией наружных сегментов фоторецепторных клеток (НСФ) в темновых условиях в присутствии окислительной системы “ $\text{Fe}^{2+}$  + аскорбиновая кислота”, степень ингибирования процессов перекисидации липидов у АЦЦ ГАБТИ существенно выше, чем у мексидола (рис. 2). Так, уже в концентрации 0.3 мМ (кривая 1) АЦЦ ГАБТИ практически на 100% подавляет процесс перекисидации липидов, в то время как мексидол даже в концентрации 1.0 мМ (кривая 2) ингибирует этот процесс примерно на 50%. Полученные результаты свидетельствуют о более высокой антиоксидантной активности АЦЦ ГАБТИ в отношении темновых свободнорадикальных процессов по сравнению с мексидолом.

### Сравнение фотопротекторных свойств АЦЦ ГАБТИ и мексидола

Влияние антиоксидантов на процесс перекисидации липидов в суспензии НСФ изучали при облучении их УФ- и видимым светом. На рис. 3 представлена скорость накопления ТБК-активных продуктов в образцах НСФ при облучении светом. Видно, что АЦЦ ГАБТИ (столбик 3) намного эффективнее действует как фотопротектор в этой модельной системе, чем мексидол (столбик 2). Так, ингибирующее действие мексидола при его концентрации 1.5 мМ примерно в 5 раз меньше, чем в случае АЦЦ ГАБТИ, концентрация которого составляет всего лишь 0.3 мМ. Таким образом, полученные результаты свидетельствуют об эффективных фотопротекторных свойствах АЦЦ ГАБТИ.

Та же тенденция сохраняется и в отношении фотосенсибилизированной видимым светом в присутствии липофусцина или его флуорофора А2Е перекисидации липидов суспензии НСФ (на

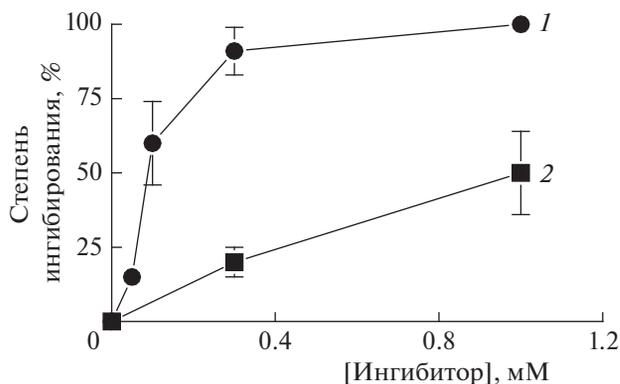


Рис. 2. Ингибирующее действие АЦЦ ГАБТИ (1) и мексидола (2) на индуцированную системой  $\text{Fe}^{2+}$  + аскорбат перекисидацию фоторецепторных клеток в зависимости от концентрации. Реакционная среда содержала 0.1 М калий-фосфатный буфер (рН 7.4), 250 мкг · мл<sup>-1</sup> белка суспензии НСФ, 10 мкМ  $\text{FeSO}_4(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ , 0.5 мМ аскорбат и АЦЦ ГАБТИ или мексидол в различных концентрациях. Приведены средние значения по пяти опытам.

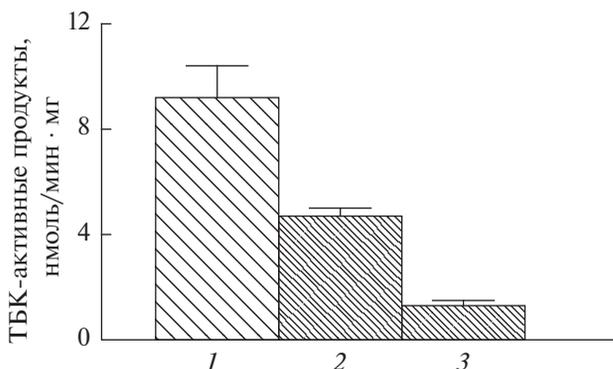
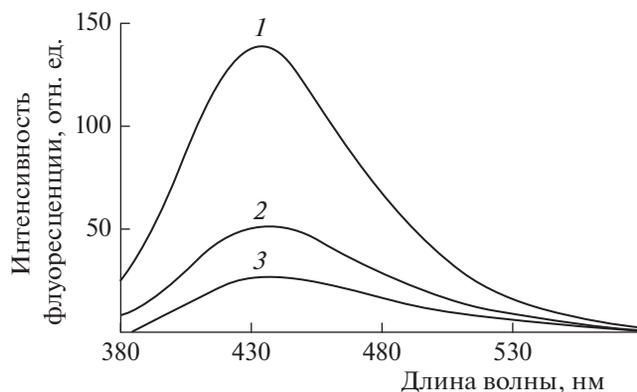


Рис. 3. Ингибирующее действие мексидола (2) и АЦЦ ГАБТИ (3) на индуцированную ультрафиолетом перекисидацию НСФ: 1 – контроль (без ингибиторов), 2 – в присутствии 1.5 ммоль · л<sup>-1</sup> мексидола, 3 – в присутствии 0.3 ммоль · л<sup>-1</sup> АЦЦ ГАБТИ. Реакционная среда содержала 0.1 М калий фосфатный буфер (рН 7.4), 300 мкг · мл<sup>-1</sup> белка суспензии наружных сегментов фоторецепторных клеток и АЦЦ ГАБТИ или мексидол. По оси ординат – средняя скорость накопления ТБК-активных продуктов в нмоль/мг белка за 1 мин облучения.

рис. 3 не показано). Ингибирующая активность мексидола в этой системе даже при больших его концентрациях существенно ниже, чем у АЦЦ ГАБТИ. Эти результаты свидетельствуют о высоком защитном эффекте АЦЦ ГАБТИ в отношении фототоксического действия “старческого пигмента” липофусцина.



**Рис. 4.** Влияние АЦЦ ГАБТИ (3) и амингуанидина (2) на образование флуоресцирующих продуктов в альбумине при его взаимодействии с фруктозой; 1 – без добавления ингибиторов. Среда инкубации содержала 0.1 М калий-фосфатный буфер, рН 7.4, концентрация альбумина – 4 мг/мл, концентрация фруктозы – 50 мМ, концентрация ингибиторов – 5 мМ. Смесь инкубировали в течении 4 сут при температуре 37°C и постоянном перемешивании. Для устранения микробного заражения использовали 3 мМ азид натрия. После окончания реакции смесь диализировали против фосфатного буфера в течение 1 сут.

#### **Исследование влияния АЦЦ ГАБТИ на образование поздних продуктов гликирования**

Известно, что поздние продукты гликирования (ППГ), как и поздние продукты перекисидации липидов, представляющие собой в основном поперечно сшитые белковые молекулы, чрезвычайно токсичны для клеток. Формирование и накопление ППГ в различных клетках и тканях ведет к повреждению внеклеточных и внутриклеточных структур и нарушению их функций. Известно, что накопление ППГ – одна из основных причин развития диабетических осложнений. На начальных стадиях процесса гликирования белков происходит формирование флуоресцирующих оснований Шиффа. Ингибирующее действие АЦЦ ГАБТИ в отношении процесса фруктозилирования сывороточного альбумина и белков наружных сегментов фоторецепторных клеток было исследовано в сравнении с мексидолом и известными ингибиторами этого процесса – амингуанидином и пиридоксамином. Как видно из рис. 4, АЦЦ ГАБТИ в той же концентрации, что и амингуанидин, приводит к более выраженному замедлению процесса накопления флуоресцирующих продуктов в альбумине. В этих же условиях мексидол практически не оказывал никакого ингибирующего действия на процесс модификации альбумина при фруктозилировании. Одинаковую эффективность с амингуанидином АЦЦ ГАБТИ показал также и при ингибировании накопления продуктов модификации белков в процессе фруктозилирования наружных сегментов фоторецепторных клеток (на рис. 4 не показано).

Обнаруженное свойство антиоксиданта АЦЦ ГАБТИ, заключающееся в его способности тормозить накопление ППГ в белках крови и фото-

рецепторных клетках, может быть использовано в фармакологической практике при лечении заболеваний, связанных со старением и диабетом, таких как артриты, атеросклероз, хроническая почечная недостаточность, нефропатия, нейропатия, болезнь Альцгеймера, катаракта, возрастная макулярная дегенерация, диабетическая ретинопатия. Три последних заболевания являются самыми распространенными глазными заболеваниями, которыми страдают миллионы людей в мире.

#### **ЗАКЛЮЧЕНИЕ**

Таким образом, изученные нами свойства водорастворимого антиоксиданта АЦЦ ГАБТИ из класса азотистых гетероциклов свидетельствуют о нем как о соединении с выраженной антирадикальной и антиоксидантной активностью в темновых и индуцированных УФ- и видимым светом (в том числе и в присутствии фотосенсибилизатора – липофусцина) процессах, со способностью эффективно тормозить накопление ППГ и с высокой устойчивостью к действию УФ- и видимого света. Эти характеристики АЦЦ ГАБТИ (оксибиола) позволяют рассматривать его как перспективное соединение с целью разработки нового препарата для профилактики и лечения дегенеративных заболеваний сетчатки, сахарного диабета 2-го типа и ряда других возрастных заболеваний.

#### **СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ**

1. Дюмаев К.М., Смирнов Л.Д. // Успехи химии. 1975. Т. 44. С. 1788.
2. Смирнов Л.Д. Химическая и биологическая кинетика. Новые горизонты. Т. 2. М.: Химия, 2005. С. 102.

3. *Эммануэль Н.М.* Пути синтеза и изыскания противоопухолевых препаратов. М.: Медгиз, 1962.
4. *Бурлакова Е.Б., Заиков Г.Е.* // Хим. физика. 2005. Т. 24. С. 67.
5. *Воронина Т.А.* // Журн. неврологии и психиатрии им. С.С. Корсакова. 2012. Т. 112. № 12. С. 86.
6. *Дюмаев К.М., Воронина Т.А., Смирнов Л.Д.* Антиоксиданты в профилактике и терапии патологий ЦНС. М.: Изд-во НИИ биомедицинской химии, 1995.
7. *Жигачева И.В., Русина И.Ф., Генерозова И.П. и др.* // Хим. физика. 2018. Т. 37. № 11. С. 68.
8. *Сакина Н.Л., Голубков А.М., Смирнов Л.Д. и др.* // БЭБиМ. 2009. Т. 147. С. 152.
9. *Сакина Н.Л., Голубков А.М., Смирнов Л.Д. и др.* // Молекуляр. медицина. 2009. № 6. С. 33.
10. *Смирнов Л.Д., Кузнецов Ю.В., Проскураков С.Я. и др.* // Биофизика. 2011. Т. 56. С. 316.
11. *Донцов А.Е., Сакина Н.Л., Кузнецов Ю.В. и др.* // Патент РФ № 2458714 // Б.И. 2012. № 22.
12. *Воронина Т.А.* // Фарматека. 2009. № 6. С. 35.
13. *Шулькин А.В.* // Там же. 2016. № S4. С. 65.
14. *McDowell J.H.* // Methods in Neurosciences V. 15. N.Y.: Academ. Press., 1993. P. 123.
15. *Boulton M., Marshall J.* // Exp. Eye Res. 1985. V. 1. P. 209.
16. *Теселкин Ю.О., Бабенкова И.В., Любицкий О.Б. и др.* // Вопросы мед. химии. 1997. Т. 43. С. 87.
17. *Buege J.A., Aust S.D.* // Methods Enzymol. 1978. V. 52. P. 302.