

УДК 547.565.2:544.546

СИНТЕЗ ПРОИЗВОДНЫХ 3,5-ДИ-*трет*-БУТИЛ-1,2-ДИГИДРОКСИБЕНЗОЛА И ИХ ВЛИЯНИЕ НА СВОБОДНОРАДИКАЛЬНОЕ ОКИСЛЕНИЕ ГЕКСАНА И КИСЛОРОДАКТИВИРУЮЩЮЮ СПОСОБНОСТЬ НЕЙТРОФИЛОВ

© 2019 г. Г. А. Ксендзова^{а, *}, Н. И. Островская^а, Г. Н. Семенкова^б, В. Л. Сорокин^б,
П. А. Шишканова^б, О. И. Шадыро^{а, б}

^а Научно-исследовательский институт физико-химических проблем Белорусского государственного университета,
ул. Ленинградская 14, Минск, 220050 Беларусь
*e-mail: ksja-bn@tut.by

^б Белорусский государственный университет, Минск, Беларусь

Поступило в Редакцию 27 сентября 2018 г.
После доработки 27 сентября 2018 г.
Принято к печати 2 октября 2018 г.

Синтезированы C⁶-замещенные производные 3,5-ди-*трет*-бутил-1,2-дигидроксибензола, изучено их влияние на радиационно-индуцированное свободнорадикальное окисление *n*-гексана и продукцию активных форм кислорода и хлора в нейтрофилах. Показано, что введение фенилгидразоновой и фенилазотетиновой групп существенно увеличивает антиоксидантную активность производных пирокатехина. Для шести соединений установлена способность предотвращать развитие оксидативного стресса, обусловленного гиперпродукцией в нейтрофилах активных кислородных интермедиатов и НОС/ОСГ.

Ключевые слова: активные формы кислорода и хлора, антиоксидантная активность, миелопероксидаза, нейтрофилы, пространственно-экранированный пирокатехин, хемилюминесценция

DOI: 10.1134/S0044460X19030041

Известно, что гиперпродукция активных форм кислорода и хлора с последующей за этим интенсификацией свободнорадикальных реакций повреждения биомолекул в организме может быть причиной сердечно-сосудистых и онкологических заболеваний, иммунодефицита, ревматоидного артрита и иных патологий [1]. Кроме того, продуцирование активных форм кислорода и хлора и активация перекисного окисления липидов сопровождают течение различных вирусных инфекций [1]. Клинические и экспериментальные исследования показали эффективность использования антиоксидантов в арсенале средств химиотерапии заболеваний, обусловленных активацией свободнорадикальных процессов в организме [1]. Поэтому разработка рационального метода направленного поиска эффективных регуляторов свободнорадикальных реакций и потенциальных

лекарственных средств для лечения патологий, обусловленных протеканием оксидативного стресса в организме, представляется актуальной.

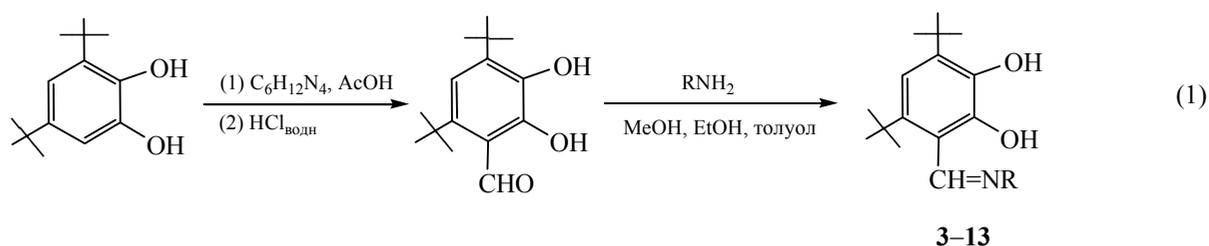
В настоящей работе осуществлен синтез ряда производных 4,6-ди-*трет*-бутил-2,3-дигидроксибензальдегида [2], который проявляет высокую ингибиторную активность в отношении процессов, протекающих с участием пероксидных и α -гидроксиалкильных радикалов [3]. Наличие в структуре этого соединения активной формильной группировки позволяет провести конденсации с различными первичными алифатическими и ароматическими аминами и сформировать гибридные структуры с потенциально более высокими антирадикальными и антиоксидантными свойствами.

В работе исследована антиоксидантная активность модельных соединений (4,6-ди-*трет*-бутил-

3-фенилиминометил-1,2-дигидроксибензол **1**, 2,4-ди-*трет*-бутил-6-фенилиминометилфенол **2**) и синтезированных образцов **3–13** в химической (радиационно-индуцированное окисление гексана) и биологических (генерация активных форм кислорода и хлора в нейтрофилах крови человека, галогенирующая активность миелопероксидазы) модельных системах, определена их цитотоксичность в отношении нейтрофилов. Выявлены закономерности влияния структуры C⁶-заместителя синтезированных производных 3,5-ди-*трет*-бутил-

1,2-дигидроксибензола на антиоксидантную активность и на процессы образования активных форм кислорода и хлора в нейтрофилах.

Синтез объектов исследования **3–13** осуществляли конденсацией 4,6-ди-*трет*-бутил-2,3-дигидроксибензальдегида с первичными алифатическими и ароматическими аминами, а также с фенилгидразином в эквимолярных соотношениях при нагревании в спиртовой среде или толуоле (1).



Антиоксидантные свойства синтезированных соединений изучали на модели инициированного γ -излучением окисления *n*-гексана в присутствии кислорода воздуха. При этом возникают пероксидные (ROO[•]) радикалы, из которых, в свою

очередь, в результате дальнейших превращений образуются соответствующие спирты и кетоны. В качестве основных продуктов при радиолитическом окислении *n*-гексана в присутствии O₂ образуются гексанолы и гексаноны (2) [4].

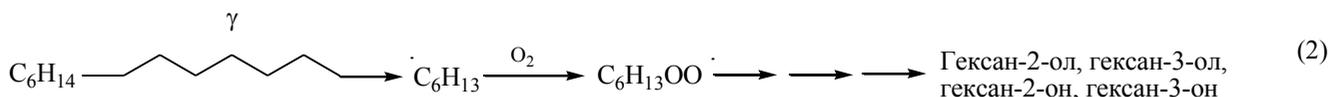
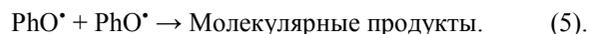


Таблица 1. Влияние производных 3,5-ди-*трет*-бутил-1,2-дигидроксибензола **1–13** на суммарный радиационно-химический выход продуктов окислительного радиолитического окисления *n*-гексана

№	Выход, $\times 10^{-7}$ Дж/моль	№	Выход, $\times 10^{-7}$ Дж/моль
–	2.42±0.14	8	0.92±0.06
1	1.02±0.05	9	0.78±0.05
2	2.33±0.18	10	0.64±0.04
3	0.77±0.05	11	0.97±0.07
4	0.40±0.03	12	0.77±0.05
5	1.03±0.06	13	2.37±0.14
6	0.39±0.03	14	1.73±0.13
7	0.85±0.05	15	1.07±0.06

Сумма выходов гексанолов и гексанонов в присутствии различных добавок является показателем их антиоксидантной активности и, следовательно, эффективности их взаимодействия с радикалами ROO[•]. В табл. 1 приведены суммарные выходы гексанолов и гексанонов, образующихся при радиолитическом окислении *n*-гексана, в присутствии и в отсутствие производных 3,5-ди-*трет*-бутил-1,2-дигидроксибензола.

Как известно, ключевой реакцией в ингибировании фенолами процесса окисления органических веществ является взаимодействие их с пероксидными радикалами с образованием резонансно-стабилизированных феноксильных радикалов (PhO[•]), которые затем расходуются в реакциях рекомбинации друг с другом и с радикалами ROO[•] [5].

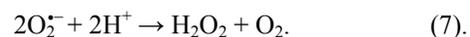


Введение фенилгидразоновой и фенилазометиновой групп в 3,5-ди-*трет*-бутил-1,2-дигидроксибензол оказало существенное влияние на повышение антиоксидантной активности. Высокую реакционную способность в отношении пероксидных радикалов проявляют соединения **1**, **3–12**: они снижают радиационно-химические выходы основных продуктов окисления *n*-гексана в 2.4–6.2 раз. Эти соединения не уступают хорошо известному и применяемому в промышленности антиоксиданту ионолу **15**, исследованному ранее в аналогичной модельной системе, и превосходят 3,5-ди-*трет*-бутил-1,2-дигидроксибензол **14** [6, 7]. Стоит также отметить, что введение фенилазометиновой группы в монофенол (соединение **2**) не оказало влияния на антиоксидантную активность, т. е. для проявления антиоксидантной активности необходимо наличие пирокатехинового (соединения **1** и **2**) и фенилазометинового (соединения **1** и **14**) фрагментов. Возможно, ОН-группа соединения **2** вовлечена во внутримолекулярную водородную связь типа О–Н···N, поэтому данное вещество не проявляет активности в радикальных реакциях.

Наиболее активными антиоксидантами оказались вещества **4** и **6**. При сравнении соединений **4** и **6** с соединением **1** (в нем отсутствует гидроксильная группа в бензольном кольце фенилазометинового фрагмента) и **1**, **5**, **7** (в них гидроксильная группа в бензольном кольце фенилазометинового фрагмента отсутствует или метилирована) видно, что наличие ОН-группы в *пара*- или *орто*-положении фенилазометинового фрагмента играет существенную роль в антиоксидантной активности производных 3,5-ди-*трет*-бутил-1,2-дигидроксибензола. Такую высокую реакционную способность соединений **4** и **6** в отношении пероксидных радикалов можно объяснить вероятным образованием феноксильных радикалов не только по ОН-группе пирокатехинового, но и по дополнительной ОН-группе фенилазометинового фрагмента. Присутствие дополнительной сульфгидрильной (соединения **9** и **10**), фенилгидразоновой (**3**) и нитрогрупп (**12**) также способствует повышению активности соединений в отношении пероксидных радикалов. Соединение **13** с адамантилазометиновой группой оказалось неактивным в радикальных реакциях, вероятно, в связи с экранированием гидроксильных групп объемным адамантильным заместителем.

Для соединений, проявивших наиболее высокую антиоксидантную активность в химической модельной системе, было проведено исследование их влияния на генерацию активных форм кислорода и хлора нейтрофилами крови человека, галогенирующую активность миелопероксидазы и способность утилизировать НОСI/ОСI⁻. Кроме того, была изучена жизнеспособность этих клеток в присутствии анализируемых веществ.

Нейтрофилы являются основным источником активных форм кислорода и хлора в организме человека и животных. Эти клетки распознают и уничтожают различные патогены, защищая организм от инфекции [8]. Их присутствие преобладает в очаге воспаления на ранних стадиях этого процесса. Фагоцитоз бактерий нейтрофилами сопряжен с активацией НАДФН-оксидазы, в результате чего генерируются супероксидные анион-радикалы (6), при дисмутации которых под действием фермента супероксиддисмутазы образуется H₂O₂ (7) [9].



Пероксид водорода и хлорид-ионы являются субстратами миелопероксидазы, функционирование которой сопровождается продукцией хлорноватистой кислоты (8), существующей при физиологических значениях рН среды в виде НОСI/ОСI⁻ [10].



Именно НОСI/ОСI⁻ главным образом уничтожает чужеродный материал в организме. Еще одно важное значение этого окислителя состоит в том, что в микромолярных концентрациях НОСI/ОСI⁻ выполняет регуляторную роль, усиливая функциональную активность клеток [11]. Однако при высоких концентрациях хлорноватистая кислота и гипохлорит-ионы являются источником свободных радикалов, которые модифицируют или разрушают жизненно важные биомолекулы, что может приводить к развитию ряда тяжелых патологических состояний [1, 12].

Результаты исследования влияния производных 3,5-ди-*трет*-бутил-1,2-дигидроксибензола на процессы генерации активных форм кислорода и хлора нейтрофилами представлены в табл. 2. Видно, что соединения **3**, **4**, **6**, **9**, **10** и **12** значительно снижают люминолзависимую хемилюминесценцию стимулированных к фагоцитозу нейтрофилов. Исключение составляет вещество **1**.

Таблица 2. Влияние производных 3,5-ди-*трет*-бутил-1,2-дигидроксibenзола на свободнорадикальные процессы в клеточных и модельных системах и на жизнеспособность нейтрофилов^a

№	R_{lum} , %	R_{luc} , %	R_{hal} , %	$R_{lum-NaOCl}$, %	V , %
1	-4.80±2.17	45.45±4.90	75.28±3.27	70.93±2.80	83.50±1.41
3	34.10±5.47	47.12±4.65	96.33±0.58	10.58±3.38	94.36±6.22
4	52.29±4.52	48.68±3.90	96.84±0.31	71.13±1.58	82.34±10.42
6	40.00±4.01	45.28±2.96	85.44±1.02	43.30±4.58	91.95±1.36
9	74.92±3.18	-7.13±5.74	87.30±1.23	-17.30±2.92	88.19±4.23
10	62.76±1.02	44.21±3.58	44.11±7.72	1.44±1.34	96.95±5.12
12	38.78±3.74	39.22±3.58	74.83±2.34	65.43±1.01	99.91±13.29
14	96.96±2.47	97.52±2.47	71.99±3.48	63.17±0.25	94.26±2.94

^a R_{lum} – степень ингибирования люминолзависимой хемилюминесценции, R_{luc} – степень ингибирования люцигенинзависимой хемилюминесценции, R_{hal} – степень ингибирования галогенирующей способности миелопероксидазы, $R_{lum-NaOCl}$ – степень ингибирования хемилюминесценции в системе люминол–NaOCl, V – жизнеспособность нейтрофилов.

Поскольку люминол является индикатором преимущественно хлорноватистой кислоты [13], ингибирование люминолзависимой хемилюминесценции нейтрофилов связано с уменьшением продукции HOCl/OCl⁻ этими клетками. Это может быть обусловлено несколькими причинами, основными из которых являются: снижение активности миелопероксидазы, уменьшение концентрации специфического субстрата миелопероксидазы – пероксида водорода, утилизация HOCl – продукта функционирования этого фермента.

В табл. 2 приведены результаты влияния анализируемых веществ на люцигенинзависимую хемилюминесценцию нейтрофилов. Из полученных данных видно, что вещество **9** не влияет на этот процесс. Остальные соединения снижают уровень люцигенинзависимой хемилюминесценции на 39.2–48.7%. Изменение интенсивности люцигенинзависимой хемилюминесценции коррелирует с продукцией H₂O₂ клетками, так как люцигенин используется в качестве индикатора супероксидных анион-радикалов [14], которые образуются при активации НАДФН-оксидазы. Выход H₂O₂ может снижаться в результате уменьшения активности НАДФН-оксидазы либо из-за взаимодействия с H₂O₂. Однако нами получены данные об отсутствии влияния анализируемых соединений на выход хемилюминесценции в системе люминол–H₂O₂, что исключает наличие их взаимодействия с пероксидом водорода.

Изучение влияния анализируемых веществ на галогенирующую способность миелопероксидазы,

как главного источника HOCl/OCl⁻ в организме, проводили, измеряя суммарную интенсивность хемилюминесценции в системе миелопероксидаза–люминол–H₂O₂–Cl⁻. Из данных табл. 2 видно, что все соединения эффективно ингибируют люминолзависимую хемилюминесценцию в системе, содержащей миелопероксидазу. Ингибирующий эффект анализируемых веществ уменьшается от 96.8 до 44.1% в следующей последовательности: **3, 4 > 6, 9 > 1, 12 > 10**.

Уменьшение выхода люминолзависимой хемилюминесценции в системе, содержащей миелопероксидазу, может быть связано как с ингибированием галогенирующей активности фермента, так и со способностью анализируемых соединений утилизировать безрадикальным путем хлорноватистую кислоту, которая является основным продуктом реакции, катализируемой миелопероксидазой. Из табл. 2 видно, что соединения **4, 1, 12** на 70.9–65.4%, а вещество **6** на 43.3% ингибирует интенсивность хемилюминесценции в системе люминол–NaOCl, что указывает на их способность утилизировать хлорноватистую кислоту безрадикальным путем. В то же время соединения **3** и **10** практически не влияют, а **9** незначительно усиливает выход хемилюминесценции, вероятно, образуя новые радикальные продукты в изучаемой реакции. Сопоставление результатов, полученных для систем люминол–NaOCl и миелопероксидаза–люминол–H₂O₂–Cl⁻, позволяет заключить, что соединения **3, 4, 6, 9** и **10** способны эффективно ингибировать галогенирующую способность миелопероксидазы. Анализ

влияния изучаемых веществ на жизнеспособность клеток (табл. 2) свидетельствует о том, что наблюдаемые эффекты не связаны с цитотоксическим действием этих веществ.

Следует отметить, что мы не получили количественной корреляции между антиоксидантной активностью анализируемых соединений в радиационно-химическом и биохимических исследованиях (табл. 1, 2), хотя качественная корреляция между этими эффектами нами обнаружена. Это может быть связано с рядом причин. Во-первых, клетки – это сложная многокомпонентная система, в которой все процессы взаимосвязаны и регулируются множеством внутриклеточных и внешних факторов. Изучаемые производные 3,5-ди-*трет*-бутил-1,2-дигидроксибензола отличаются между собой по гидрофобности, что может обуславливать их различную проникающую способность через плазматическую мембрану, локализацию в определенных компартментах клетки и, как следствие, взаимодействие с теми или иными биомолекулами. Важнейшую роль в регуляции клеточных функций играют белки. Так, многие белки плазматических мембран являются рецепторами и запускают процессы внутриклеточной сигнализации, которые контролируют ряд важнейших биохимических реакций в клетке, в том числе и процессы генерации активных форм кислорода и хлора в нейтрофилах. Белки-ферменты выполняют функцию катализаторов. Изменение структуры белковых молекул является ключевым фактором модификации их функций. В этой работе мы определяли интегральный отклик клеток на воздействие производных 3,5-ди-*трет*-бутил-1,2-дигидроксибензола (табл. 2). Отсутствие количественной корреляции между антиоксидантным действием анализируемых веществ в химической и биологических системах вероятно обусловлено большим разнообразием молекулярных мишеней для этих соединений в нейтрофилах.

Важнейшим регулятором функций белков посредством модификации их структуры являются соединения, содержащие сульфгидрильные группы. В нашей работе это соединения **9** и **10**. Из табл. 2 видно, что эти соединения значительно снижают галогенирующую активность миелопероксидазы и при этом не взаимодействуют с гипохлоритом. Можно предположить, что соединения **9** и **10** способны модифицировать этот фермент, снижая таким образом продукцию НОСл/ОСл^- . Способ-

ность эффективно подавлять активность миелопероксидазы, практически не утилизируя при этом гипохлорит, характерна и для соединения **3**.

Таким образом, в нашей работе показано, что синтезированные производные 3,5-ди-*трет*-бутил-1,2-дигидроксибензола **3–12** (в особенности соединения **4** и **6**) проявляют высокую активность в отношении пероксидных радикалов. Соединения **3, 4, 6, 9, 10** и **12**, не оказывая цитотоксического действия, снижают образование активных форм кислорода и хлора в нейтрофилах. Соединения **3, 9** и **10** эффективно подавляют галогенирующую активность миелопероксидазы, не утилизируя при этом НОСл/ОСл^- . Для соединений **1, 4, 6** и **12** выявлена способность взаимодействовать с гипохлоритом, не образуя при этом новых радикальных продуктов. Из полученных данных следует, что синтезированные производные 3,5-ди-*трет*-бутил-1,2-дигидроксибензола **3, 4, 6, 9, 10** и **12** можно рассматривать в качестве потенциальных ингибиторов оксидативного стресса в организме человека. Это предполагает возможность их дальнейшего использования в разработке лекарственных соединений для лечения патологий, связанных с развитием воспаления.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

В работе использовали 2,6-ди-*трет*-бутил-4-метилфенол (ионол, **15**), *n*-гексан (97%), 2-гексанол, 2-гексанон, 3-гексанол, 3-гексанон фирмы «Sigma-Aldrich».

Спектры ЯМР ^1H растворов в CDCl_3 или $\text{DMCO-}d_6$ сняты на спектрометре Bruker ARX-400 с рабочей частотой 400 МГц. Масс-спектры получены на спектрометре Shimadzu QP-5000 с использованием методики прямого ввода образцов в ионный источник при температуре источника 200°C и энергии ионизации 70 эВ. Температуры плавления определены на нагревательном столике *Voëtius*. Контроль за ходом реакций и чистотой полученных соединений осуществляли методом тонкослойной хроматографии на пластинках Silufol UV-254 в системе гексан–хлороформ–этилацетат (5:2:1), пластинки проявляли в парах иода.

Соединения **1–3, 14** синтезированы по методикам, описанным в работах [2, 7, 15].

4,6-Ди-трет-бутил-3-(2-гидроксифенилиминометил)-1,2-дигидроксибензол (4). Смесь 0.25 г (1 ммоль) 4,6-ди-*трет*-бутил-2,3-дигидроксибен-

зальдегида и 0.11 г (1 ммоль) *орто*-аминофенола в 20 мл абсолютного этанола кипятили 3 ч при перемешивании. Оставляли реакционную смесь на ночь. Осадок отфильтровывали, промывали абсолютным холодным этанолом. Выход 0.29 г (85%), красный порошок, т. пл. 195–198°C. Спектр ЯМР ^1H (CDCl_3), δ , м. д.: 1.46 с (9H, CH_3), 1.55 с (9H, CH_3), 6.89 с (1H, CH_{Ar}), 6.95–7.25 м (5H, $4\text{CH}_{\text{Ar}} + \text{OH}$), 9.44 с (1H, $\text{CH}=\text{N}$). Масс-спектр, m/z ($I_{\text{отн}}$, %): 341 (87) [M] $^+$. $\text{C}_{21}\text{H}_{27}\text{NO}_3$.

4,6-Ди-*трет*-бутил-3-(2-метоксифенилимино-метил)-1,2-дигидроксибензол (5). К раствору 0.5 г (2 ммоль) 4,6-ди-*трет*-бутил-2,3-дигидроксибензальдегида в 10 мл абсолютного метанола добавляли 0.26 г (2 ммоль) *орто*-анизидина. Полученную смесь кипятили 1 ч, затем охлаждали. Осадок отфильтровывали и промывали холодным гексаном. Выход 0.27 г (74%), красный порошок, т. пл. 140–142°C. Спектр ЯМР ^1H (CDCl_3), δ , м. д.: 1.47 с (9H, CH_3), 1.53 с (9H, CH_3), 4.02 с (3H, CH_3O), 6.74 с (1H, CH_{Ar}), 7.04–7.32 м (4H, CH_{Ar} , OH), 9.43 с (1H, $\text{CH}=\text{N}$). Масс-спектр, m/z ($I_{\text{отн}}$, %): 355 (48) [M] $^+$. $\text{C}_{22}\text{H}_{29}\text{NO}_3$.

4,6-Ди-*трет*-бутил-3-(4-гидроксифенилимино-метил)-1,2-дигидроксибензол (6). Смесь 0.25 г (1 ммоль) 4,6-ди-*трет*-бутил-2,3-дигидроксибензальдегида и 0.11 г (1 ммоль) *пара*-аминофенола в 25 мл абсолютного метанола кипятили при перемешивании 5 ч. После удаления растворителя осадок перекристаллизовывали из гептана. Выход 0.26 г (76%), светло-красный порошок, т. пл. 148–150°C. Спектр ЯМР ^1H (ДМСО- d_6), δ , м. д.: 1.38 с (9H, CH_3), 1.48 с (9H, CH_3), 6.74 с (1H, CH_{Ar}), 6.94 д (2H, CH_{Ar} , $^3J_{\text{HH}} = 7.0$ Гц), 7.15 д (2H, CH_{Ar} , $^3J_{\text{HH}} = 7.0$ Гц), 8.17 с (1H, OH), 9.38 с (1H, CH_{Ar}), 9.80 с (1H, OH). Масс-спектр, m/z ($I_{\text{отн}}$, %): 341 (79) [M] $^+$. $\text{C}_{21}\text{H}_{27}\text{NO}_3$.

4,6-Ди-*трет*-бутил-3-(4-метоксифенилимино-метил)-1,2-дигидроксибензол (7). К раствору 0.5 г (2 ммоль) 4,6-ди-*трет*-бутил-2,3-дигидроксибензальдегида в 10 мл абсолютного метанола добавляли 0.25 г (2 ммоль) *пара*-анизидина. Через 30 мин смесь охлаждали, осадок отфильтровывали и промывали на фильтре холодным гексаном. Выход 2.84 г (80%), ярко-красные кристаллы, т. пл. 163–165°C. Спектр ЯМР ^1H (CDCl_3), δ , м. д.: 1.48 с (9H, CH_3), 1.54 с (9H, CH_3), 3.89 с (3H, OCH_3), 6.48 уш. с (1H, OH), 6.84 с (1H, CH_{Ar}), 7.05 д (2H, CH_{Ar} , $^3J_{\text{HH}} = 7.0$ Гц), 7.32 д (2H, CH_{Ar} , $^3J_{\text{HH}} = 7.0$ Гц), 9.38 с (1H, $\text{CH}=\text{N}$). Масс-спектр, m/z ($I_{\text{отн}}$, %): 355 (24) [M] $^+$. $\text{C}_{22}\text{H}_{29}\text{NO}_3$.

4,6-Ди-*трет*-бутил-3-(4-метилфенилимино-метил)-1,2-дигидроксибензол (8). Смесь 2.5 г (10 ммоль) 3,5-ди-*трет*-бутил-2-гидроксибензальдегида и 1.07 г (10 ммоль) *пара*-толуидина в 30 мл абсолютного метанола кипятили в течение 30 мин и оставляли на ночь. Кристаллы отфильтровывали, промывали петролейным эфиром и перекристаллизовывали из этанола. Выход 3.30 г (96%), светло-красный порошок, т. пл. 186–187°C. Спектр ЯМР ^1H (CDCl_3), δ , м. д.: 1.48 с (9H, CH_3), 1.55 с (9H, CH_3), 2.23 с (3H, CH_3), 6.84 с (1H, CH_{Ar}), 7.22–7.32 м (4H, CH_{Ar}), 9.39 с (1H, $\text{CH}=\text{N}$). Масс-спектр, m/z ($I_{\text{отн}}$, %): 339 (72) [M] $^+$. $\text{C}_{22}\text{H}_{29}\text{NO}_2$.

4,6-Ди-*трет*-бутил-3-(2-сульфанилфенилимино-метил)-1,2-дигидроксибензол (9). Смесь 0.25 г (1 ммоль) 4,6-ди-*трет*-бутил-2,3-дигидроксибензальдегида и 0.125 г (1 ммоль) аминотиофенола в 15 мл абсолютного этанола кипятили 5 ч. После удаления растворителя остаток перекристаллизовывали из смеси гептан–этанол. Выход 0.28 г (78%), светло-желтый порошок, т. пл. 112–114°C. Спектр ЯМР ^1H (CDCl_3), δ , м. д.: 1.43 с (9H, CH_3), 1.53 с (9H, CH_3), 3.67 уш. с (1H, SH), 6.13 с (1H, OH), 6.85–7.48 м (5H, CH_{Ar}), 9.43 с (1H, $\text{CH}=\text{N}$). Масс-спектр, m/z ($I_{\text{отн}}$, %): 357 (77) [M] $^+$. $\text{C}_{21}\text{H}_{27}\text{NO}_2\text{S}$.

4,6-Ди-*трет*-бутил-3-(2-сульфанилэтилимино-метил)-1,2-дигидроксибензол (10). Раствор, содержащий 0.195 г (2 ммоль) цистеамина гидрохлорида, 0.50 г (2 ммоль) 4,6-ди-*трет*-бутил-2,3-дигидроксибензальдегида и 0.20 г (2 ммоль) триэтиламина в 10 мл абсолютного метанола перемешивали при комнатной температуре 6 ч. Осадок отфильтровывали, метанол удаляли в вакууме, остаток промывали холодным этанолом и перекристаллизовывали из гексана. Выход 0.44 г (72%), светло-оранжевый порошок, т. пл. 111–112°C. Спектр ЯМР ^1H (CDCl_3), δ , м. д.: 1.45 с (9H, CH_3), 1.49 с (9H, CH_3), 2.92 уш. с (2H, CH_2), 3.83 уш. с (2H, CH_2), 6.71 уш. с (1H, OH), 7.30 с (1H, CH_{Ar}), 9.04 с (1H, $\text{CH}=\text{N}$). Масс-спектр, m/z ($I_{\text{отн}}$, %): 309 (100) [M] $^+$. $\text{C}_{17}\text{H}_{27}\text{NO}_2\text{S}$.

4,6-Ди-*трет*-бутил-3-(4-бромфенилимино-метил)-1,2-дигидроксибензол (11). К раствору 0.25 г (1 ммоль) 4,6-ди-*трет*-бутил-2,3-дигидроксибензальдегида в 10 мл абсолютного метанола добавляли 0.17 г (1 ммоль) *пара*-броманилина. Через 0.5 ч раствор охлаждали, осадок отфильтровывали и промывали его на фильтре холодным гексаном. Выход 0.25 г (62%), ярко-красные

игольчатые кристаллы, т. пл. 195–196°C. Спектр ЯМР ^1H (CDCl_3), δ , м. д.: 1.45 с (9H, CH_3), 1.52 с (9H, CH_3), 6.87 с (1H, CH_{Ar}), 7.18 д (2H, CH_{Ar} , $^3J_{\text{HH}} = 7.0$ Гц), 7.60 д (2H, CH_{Ar} , $^3J_{\text{HH}} = 7.0$ Гц), 9.39 с (1H, $\text{CH}=\text{N}$). Масс-спектр, m/z ($I_{\text{отн}}$, %): 403 (34) [$M - \text{H}$] $^+$, 405 (34) [$M + \text{H}$] $^+$. $\text{C}_{21}\text{H}_{26}\text{BrNO}_2$.

4,6-Ди-*трет*-бутил-3-(3-нитрофенилимино-метил)-1,2-дигидроксибензол (12). Смесь 0.25 г (1 ммоль) 4,6-ди-*трет*-бутил-2,3-дигидроксибензальдегида и 0.14 г *мета*-нитроанилина в 20 мл абсолютного этанола кипятили 3 ч, затем охлаждали. Осадок отфильтровывали, промывали на фильтре водой, сушили и перекристаллизовывали из смеси гептан-*i*-PrOH (10:1). Выход 0.25 г (68%), светло-красные игольчатые кристаллы, т. пл. 138–140°C. Спектр ЯМР ^1H (CDCl_3), δ , м. д.: 1.45 с (9H, CH_3), 1.55 с (9H, CH_3), 6.24 уш. с (1H, OH), 6.92 с (1H, CH_{Ar}), 7.58–7.66 м (2H, CH_{Ar}), 8.10–8.19 м (2H, CH_{Ar}), 9.48 с (1H, $\text{CH}=\text{N}$). Масс-спектр, m/z ($I_{\text{отн}}$, %): 370 (100) [M] $^+$. $\text{C}_{21}\text{H}_{26}\text{N}_2\text{O}_4$.

4,6-Ди-*трет*-бутил-3-(адамант-1-ил)илимино-метил-1,2-дигидроксибензол (13). Смесь 0.125 г (0.5 ммоль) 4,6-ди-*трет*-бутил-2,3-дигидроксибензальдегида, 0.075 г (0.5 ммоль) 1-адамантиламина, 15 мл толуола и каталитического количества TsOH кипятили в течение 15 ч. После удаления толуола остаток растворяли в 30 мл Et_2O . Полученный раствор промывали разбавленной H_2SO_4 , затем раствором NaHCO_3 и водой. Растворитель удаляли в вакууме, остаток перекристаллизовывали из толуола. Выход 0.12 г (62%), мелкокристаллический порошок оранжевого цвета, т. пл. 263°C (разл.). Спектр ЯМР ^1H (CDCl_3), δ , м. д.: 1.34 с (9H, CH_3), 1.42 с (9H, CH_3), 1.65–2.34 м (15H, $6\text{CH}_2 + 3\text{CH}$), 6.65 с (1H, OH), 7.29 с (1H, CH_{Ar}), 8.92 с (1H, $\text{CH}=\text{N}$). Масс-спектр, m/z ($I_{\text{отн}}$, %): 383 (39) [M] $^+$. $\text{C}_{25}\text{H}_{37}\text{NO}_2$.

Для радиационно-химических испытаний использовали 10^{-3} М. растворы исследуемых соединений в *n*-гексане. Растворы облучали в герметичных стеклянных ампулах на установке МРХ- γ -25М с источником ^{60}Co . Мощность поглощенной дозы составляла 0.40 ± 0.02 Гр/с. Интервал используемых поглощенных доз 0.24–1.2 кГр.

Анализ продуктов свободнорадикального окисления *n*-гексана (гексан-2-ол, гексан-3-ол, гексан-2-он, гексан-3-он) осуществляли газохроматографическим методом на кварцевой капиллярной колонке StabilWax-DA ($l = 30$ м, 0.32 мм ID, 0.5 мкм df) на хроматографе GC-17AAF/APC Shimadzu с

пламенно-ионизационным детектором. Условия анализа: начальная температура – 60°C, скорость подъема до температуры 180°C – 8 град/мин, температура испарителя – 250°C, температура детектора – 220°C, скорость газа-носителя (азота) – 30 см/с.

Радиационно-химические выходы (G , 10^{-7} Дж/моль) образования продуктов радиолиза *n*-гексана рассчитывали на линейных участках зависимостей их концентрации от поглощенной дозы методом наименьших квадратов. Ошибка определения выхода не превышала 10%.

Для биохимических исследований применяли гепарин (Белмедпрепараты), декстран-500, гистопак-1077, среду RPMI-1640, люминол, люцигенин, хемотаксический пептид fMLP (*N*-Formyl-Met-Leu-Phe), пропиций иодид, тритон X-100, NaOCl, пероксид водорода (Sigma), спирт этиловый, среду Эрла собственного приготовления, которая включала: 0.12 моль/л NaCl, 5.4×10^{-3} моль/л KCl, 0.9×10^{-3} моль/л $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 0.8×10^{-3} моль/л $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 1×10^{-3} моль/л CaCl_2 , 5.6×10^{-3} моль/л глюкозы, 26.2×10^{-3} моль/л NaHCO_3 (Анализ-Х). Анализируемые соединения растворяли в этаноле. Контрольные образцы клеточных суспензий и модельных систем содержали этанол в таких же количествах, как и опытные пробы.

Нейтрофилы выделяли из свежей крови здоровых людей по стандартной методике в градиенте плотности гистопак-1077 [16]. Клетки ресуспензировали в среде RPMI-1640 (pH = 7.4). Полученная суспензия содержала не менее, чем 96% нейтрофилов. Концентрация клеток в анализируемой пробе составляла 1×10^6 в 1 мл. Для выделения миелопероксидазы суспензию нейтрофилов подвергали трем циклам замораживания (при –20°C) и оттаивания (при 37°C), затем клетки центрифугировали при 3000 об/мин в течение 10 мин. Полученный супернатант, содержащий миелопероксидазу, отделяли от осадка и использовали для анализа.

Генерацию активных форм кислорода и хлора нейтрофилами и миелопероксидазой изучали хемилюминесцентным методом на биохемилюминометре БХЛ-1 (Беларусь), включающем систему регистрации и обработки сигналов Unichrom (Беларусь). Для определения всех типов активных форм кислорода и хлора использовали люминол в качестве эмиттера свечения. Для регистрации супероксидных анион-радикалов

применяли люцигенин. При работе с суспензией нейтрофилов измерения проводили в среде RPMI-1640, в случае миелопероксидазы – в среде Эрла при 37°C. Объем анализируемой пробы в обоих случаях составлял 1 мл.

Перед проведением анализа суспензию нейтрофилов вместе с исследуемым веществом (концентрация соединений **1, 3, 4, 6, 9, 10, 12** в опытных пробах составляла 10^{-6} М.) инкубировали при 37°C в течение 20 мин, затем регистрировали интенсивность хемилюминесценции, обусловленную действием на клетки fMLP. Раствор fMLP в 0.15 моль/л NaCl в концентрации 1×10^{-7} моль/л вносили в суспензию клеток через 5 мин после начала адгезии.

Галогенирующую способность миелопероксидазы определяли измерением суммарной интенсивности хемилюминесценции в системе, содержащей люминол (5×10^{-5} моль/л), H_2O_2 (2×10^{-5} моль/л), миелопероксидазу при pH = 5.2 в среде Эрла в течение 10 мин. Объем добавляемого супернатанта, содержащего миелопероксидазу, составлял 100 мкл, что соответствовало содержанию миелопероксидазы в 1×10^5 нейтрофилов в 1 мл. Перед измерением галогенирующей способности миелопероксидазы супернатант, содержащий фермент, инкубировали с анализируемым веществом в течение 10 мин при 37°C.

Для определения способности производных пирокатехина влиять на свободнорадикальные процессы в реакции окисления люминола гипохлоритом или H_2O_2 изучали хемилюминесценцию в системах 5×10^{-6} М. NaOCl– 5×10^{-5} М. люминол и 1×10^{-4} М. H_2O_2 – 5×10^{-5} М. люминол. Интегральную интенсивность хемилюминесценции оценивали как площадь под кинетической кривой. Степень ингибирования хемилюминесценции (R) определяли по формуле (9).

$$R = \left(1 - \frac{I_i}{I_0}\right) \times 100\%. \quad (9)$$

Здесь R – степень ингибирования хемилюминесценции, I_i и I_0 – суммарные интенсивности хемилюминесценции с учетом фонового свечения в опытном и контрольном образцах соответственно.

Жизнеспособность клеток оценивали флуоресцентным методом на спектрофлуориметре CM 2203 Солар (Беларусь) с использованием пропидий иодида [17]. Суспензию фагоцитов инкубировали с производными пирокатехина в течение 1 ч при 37°C.

Далее в кювету вносили пропидий иодид в концентрации 4×10^{-6} моль/л и через 5 мин измеряли интенсивность флуоресценции F_{d1} ($\lambda_{возб} = 530$ нм, $\lambda_{рег} = 640$ нм) в течение 2 мин, затем клетки разрушали с помощью 0.2% Тритона X-100 (Тг X-100) и регистрировали флуоресценцию F_{t1} в течение последующих 3 мин. Жизнеспособность клеток (V) в каждом образце определяли, как отношение числа живых клеток к числу всех клеток в пробе по формуле (10).

$$V = \frac{(F_{t1} - F_{t2}) - (F_{d1} - F_{d2})}{(F_{t1} - F_{t2})} \times 100\%. \quad (10)$$

Здесь V – жизнеспособность клеток в присутствии анализируемого вещества, F_{d1} и F_{t1} – параметры интенсивности флуоресценции пропидий иодида в отсутствие и в присутствии Тг X-100 соответственно для опытного образца, F_{d2} и F_{t2} – параметры интенсивности флуоресценции пропидий иодида в отсутствие и в присутствии Тг X-100 соответственно в растворе RPMI-1640. Для удобства сравнения жизнеспособность для каждого образца V нормировали на жизнеспособность в контрольном образце V_0 по формуле (11).

$$\frac{V}{V_0} = \frac{(F_{t1} - F_{t2}) - (F_{d1} - F_{d2})}{(F_{t10} - F_{t2}) - (F_{d10} - F_{d2})} \times 100\%. \quad (11)$$

Здесь V – жизнеспособность клеток в присутствии анализируемого вещества, V_0 – жизнеспособность клеток в контрольном образце, F_{d1} и F_{t1} – параметры интенсивности флуоресценции пропидий иодида в отсутствие и в присутствии Тг X-100 соответственно для опытного образца, F_{d10} и F_{t10} – интенсивность флуоресценции F_{d1} и F_{t1} для контрольных образцов, F_{d2} и F_{t2} – параметры интенсивности флуоресценции пропидий иодида в отсутствие и в присутствии Тг X-100 соответственно в растворе RPMI-1640.

При математической обработке результатов определяли среднюю величину для группы независимых измерений (более трех). Полученные данные представлены в работе как среднее значение \pm произведение стандартного отклонения и коэффициента Стьюдента для соответствующего количества измерений (доверительная вероятность $p = 0.95$).

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Halliwell B., Gutteridge J.M.C. Free Radicals in Biology and Medicine. Oxford: University Press, 2015. 944 p.
2. Шадыро О.И., Сорокин В.Л., Ксендзова Г.А., Савинова О.В., Самович С.Н., Павлова Н.И., Полозов Г.И., Бореко Е.И. // Хим.-фарм. ж. 2016. Т. 50. № 3. С. 20; Shadyro O.I., Sorokin V.L., Ksendzova G.A., Savinova O.V., Samovich S.N., Pavlova N.I., Polozov G.I., Boreko E.I. // Pharm. Chem. J. 2016. Vol. 50. N 3. P. 156. doi 10.1007/s11094-016-1414-1
3. Ksendzova G.A., Samovich S.N., Sorokin V.L., Shadyro O.I. // Rad. Phys. Chem. 2018. Vol. 146. P. 115. doi 10.1016/j.radphyschem. 2018.01.012
4. Пикаев А.К. Современная радиационная химия. М.: Наука, 1986. Т. 2. С. 325.
5. Рогинский В.А. Фенольные антиоксиданты. Реакционная способность и эффективность. М.: Наука, 1988. С. 19.
6. Едимичева И.П., Островская Н.И., Полозов Г.И., Шадыро О.И. // ЖОХ. 2005. Т. 75. Вып. 4. С. 632; Edimecheva I.P., Ostrovskaya N.I., Polozov G.I., Shadyro O.I. // Russ. J. Gen. Chem. 2005. Vol. 75. N 4. P. 593. doi 10.1007/s11176-005-0278-y
7. Масловская Л.А., Петрикевич Д.К., Тимошук В.А., Шадыро О.И. // ЖОХ. 1996. Т. 66. Вып. 11. С. 1893; Maslovskaya L.A., Petrikevich D.K., Timoshchuk V.A., Shadyro O.I. // Russ. J. Gen. Chem. 1996. Vol. 66. N 11. P. 1842.
8. Тоголян А.А., Фрейдлин И.С. Клетки иммунной системы. СПб: Наука, 2000. Т. 1. С. 52.
9. Babior B.M., Lambeth J.D., Nauseef W. // Arch. Biochem. Biophys. 2002. Vol. 397. N 2. P. 342. doi 10.1006/abbi.2001.2642
10. Kettle A.J., Winterbourn C.C. // Redox Rep. 1997. Vol. 3. N 2. P. 3. doi 10.1080/13510002.1997.11747085
11. Kuznetsova T., Kulahava T., Zholnerevich I., Amaegberi N., Semenkova G., Shadyro O., Arnhold J. // Mol. Immunol. 2017. Vol. 87. P. 317. doi 10.1016/j.molimm.2017.05.007
12. Davies M.J., Hawkins C.L., Pattison D.I., Rees M.D. // Antiox. Redox. Signal. 2008. Vol. 10. N 7. P. 1199. doi 10.1089/ars.2007.1927
13. Роцупкин Д.И., Белакина Н.С., Мурина М.А. // Биофизика. 2006. Т. 51. № 1. С. 99; Roshchupkin D.I., Belakina N.S., Murina M.A. // Biophysics. 2006. Vol. 51. N 1. P. 79. doi 10.1134/S000635090601012X
14. Li Y., Zhu H., Kuppusamy P., Roubaud V., Zweier J.L., Trush M.A. // J. Biol. Chem. 1998. Vol. 273. N 4. P. 2015.
15. Арсеньев М.В. Автореф. дис. ... канд. хим. наук. Нижний Новгород, 2014. 26 с.
16. Бейум А. Выделение лимфоцитов, гранулоцитов и макрофагов. Лимфоциты: выделение, фракционирование и характеристика. М.: Медицина, 1980. С. 9.
17. Kato F., Tanaka M., Nakamura K. // Toxicol. In Vitro. 1999. Vol. 13. N 6. P. 923. doi 10.1016/S0887-2333(99)00078-8

Synthesis of 3,5-Di-*tert*-butyl-1,2-dihydroxybenzene Derivatives and Their Effect on Free Radical Oxidation of Hexane and Oxygen Activation Ability of Neutrophils

G. A. Ksendzova^a, N. I. Ostrovskaya^a, G. N. Semenkova^{b*}, V. L. Sorokin^b, P. A. Shishkanova^b, and O. I. Shadyro^{a,b}

^a Scientific Research Institute of Physical and Chemical Problems of Belarusian State University, ul. Leningradskaya 14, Minsk, 220050 Belarus

*e-mail: ksja-bn@tut.by

^b Belarusian State University, Minsk, Belarus

Received September 27, 2018; revised September 27; accepted October 2, 2018

C⁶-Substituted derivatives of 3,5-di-*tert*-butyl-1,2-dihydroxybenzene were synthesized, and their effect on radiation-induced free radical oxidation of *n*-hexane and production of reactive oxygen and chlorine forms in neutrophils were studied. The introduction of the phenylhydrazone and phenylazomethine groups was shown to significantly increase the antioxidant activity of pyrocatechol derivatives. For six compounds, the ability to prevent the development of oxidative stress due to overproduction of active oxygen intermediates and HOCl/OCl⁻ in neutrophils was revealed.

Keywords: reactive oxygen and chlorine forms, antioxidant activity, myeloperoxidase, neutrophils, sterically hindered pyrocatechol, chemiluminescence