

А. А. Мандругин¹, Т. П. Трофимова¹, В. М. Федосеев¹, С. Я. Проскуряков²,
Л. И. Штейн², А. Н. Прошин³, А. Н. Пушин³

NO-ИНГИБИРУЮЩАЯ АКТИВНОСТЬ ПРОИЗВОДНЫХ 2-АМИНО-2-ТИАЗОЛИНА

¹ Московский государственный университет им. М. В. Ломоносова, Химический факультет, Москва;

² Медицинский радиологический научный центр РАМН, Обнинск;

³ Институт физиологически активных веществ РАН, Московская область, Черноголовка

Сделана оценка *in vivo* NOS-ингибирующей активности полученных соединений. Размеры заместителей 2-N-моно- и 2-N,N-дизамещенных производных 2-амино-2-тиазолинов на биологическую активность принципиального действия не оказывают.

Поиск соединений с NO-модулирующей активностью является в настоящее время одним из интенсивно развивающихся направлений химических исследований [1 – 10], что связано с перспективностью их использования в качестве средств для лечения нейродегенеративных и инфекционных заболеваний, ограничений последствий инсульта, инфаркта, травматического, септического и других видов шока. В настоящее время в мире синтезировано и испытано в качестве ингибиторов NO-синтазы более 1000 соединений различных классов: производные тиомочевины, гуанидина, L-аргинина, имидазолов, пиразолов, нитроиндазолов, бензоксазолонов, 1,2-дигидрохиназолин-аминов и др. [3]. Однако перспективный класс гетероциклических производных изотиомочевины исследован мало, хотя некоторые его представители показали высокую NO-ингибирующую активность в системе *in vitro* [9, 10]. Поэтому исследования, направленные на создание новых ингибиторов NO-синтазы на основе циклических изотиомочевин, представляют собой актуальное направление работ. Важно подчеркнуть, что предлагаемые для изучения соединения по предварительным данным обладают пролонгированным физиологическим действием благодаря их устойчивости к метаболизму *in vivo*. Это было специально показано в наших исследованиях [11].

В настоящей работе изучена NO-ингибирующая активность 2-амино-2-тиазолина (I) и его производных следующего строения (табл. 1), полученных стандартными методами синтеза [12 – 14].

Методы исследования

Оценивали влияние соединений I – XIII на синтез оксида азота (NO) в печени мышей следующим образом. Синтез NO индуцировали в тканях животных (белые беспородные мыши, самки, массой 25 – 30 г) путем введения липополисахарида *E. coli* (LPS, 1,5 мг/кг, “Sigma” — 0111:B4) в дозе 1,5 мг/кг (интраперитонеально, 0,5 мл/животное в 0,9 % NaCl) за 4 ч до извлечения образцов ткани. Соединения, изучаемые в качестве модуляторов синтеза NO, вводили животным либо интраперитонеально в физиологическом растворе или интрагастрально в виде взвеси в 3 % растворе крахмала в физиологическом растворе [15].

Приготовление образцов для ЭПР-спектроскопии оксида азота проводили по методу А. Ф. Ванина и соавторов [16]. В качестве спиновой ловушки (СЛ) NO использовали Fe²⁺-диэтилдитиокарбаматный комплекс (Fe²⁺-ДЭТК), компоненты которого были приобретены у фирмы Сигма-Алдрич-Рус (Москва). Так как комплекс Fe²⁺-ДЭТК мало растворим в воде (растворимость < 10⁻⁵), его образование в организме инициировалось введением соединений, составляющих компоненты комплекса, в разные места тела подопытного животного в виде растворов в 0,9 % NaCl. ДЭТК (C₅H₁₀NS₂Na · 3H₂O, 2,92 ммоль/кг, 0,5 мл, интраперитонеально) и Fe-цитратный комплекс (смесь 0,18 ммоль/кг FeSO₄ · 7H₂O + 0,7 ммоль/кг C₆H₅O₇Na₃ · 2H₂O, внутримышечно по 0,1 мл в задние лапы) инъецировали за 30 мин до эвтаназии животных [17]. Немедленно после эвтаназии животных извлекали печень, помещали ее на чашку Петри и ткань набивали в металлические цилиндры высотой 12 мм и диаметром 3 мм, которые затем погружали в жидкий азот. После замораживания образцы ткани извлекали из металлических цилиндров и хранили в жидком азоте до анализа на ЭПР-спектрометре.

Спектры ЭПР образцов печени регистрировали при 77 К на радиоспектрометре фирмы “Bruker” — ESP-300E (Германия) в X-диапазоне при СВЧ-мощности 5 мВт и амплитуде модуляции магнитного поля 0,32 мТ.

Соединения, используемые для создания спиновой ловушки, образуют в организме животных комплексы с NO. Эти парамагнитные моонитрозильные комплексы железа с ДЭТК (МНКЖ-ДЭТК), характеризуются сигналом ЭПР с $g = 2,041$ и $g = 2,025$ со сверхтонкой структурой (СТС) в виде триплета. В диапазоне значений g -фактора 2,2 – 1,91 в тканях интактных и подвергнутых воздействию животных присутствуют сигналы различных парамагнитных соединений: свободные радикалы ($g = 2,0$); комплексы молибдена ($g = 1,97$); восстановленные железосерные белки ($g = 1,94$); комплексы марганца, характеризующиеся 6 линиями СТС, 3 низкочастотных компонента которой локализованы перед сигналом свободных радикалов. Однако существенный вклад в искажение спектра МНКЖ-ДЭТК дает только сигнал образующегося в

результате введения ДЭТК комплекса Cu^{2+} -ДЭТК [18]. Поэтому для уменьшения искажений спектр ЭПР специально синтезированного чистого комплекса Cu^{2+} -ДЭТК вычитался из спектров образцов. Оценку относительного содержания NO-радикалов в тканях животных проводили путем измерения амплитуды 1-го (низкопольного) компонента СТС сигнала ЭПР МНКЖ-ДЭТК [19, 20], величина которой и отражала относительное содержание NO в исследуемой ткани. Величину амплитуды нормализовали к весу образца и амплитуде второй линии в низком поле ЭПР-спектра $\text{MgO}:\text{Mn}^{2+}$, использованного в качестве парамагнитного стандарта (Институт физико-технических и радиотехнических измерений, Менделеево, Россия).

Результаты измерений содержания NO в печени животных, обработанных различными веществами, выражались как отношение амплитуды ЭПР сигнала комплекса $\text{NO}-\text{Fe}^{2+}-(\text{DET})_2$ в образцах из печени мышей, подвергшихся воздействию липополисахарид (ЛПС) + вещество, к амплитуде сигнала в образцах печени мышей, обработанных только ЛПС.

Результаты и их обсуждение

Для изучения синтеза и обмена NO нами была выбрана наиболее адекватная модель для опытов *in vivo* — печень животных, так как особенности ее метаболизма практически полностью исключают влияние других высокоактивных соединений кислорода и радикалов на содержание NO в ней и поэтому не влияют в существенной степени на интерпретацию получаемых результатов [16].

Следует отметить, что используемая методика определения содержания NO *in vivo* методом ЭПР имеет некоторое ограничение. Спиновая ловушка захватывает не весь синтезируемый NO, а только тот, который не успевает прореагировать с другими высокоактивными химическими частицами (гемоглобин, цитохром С, оксидаза, $\text{O}^{\bullet-}$, HOCl и др.). Однако в ткани печени этот эффект не имеет, как отмечалось выше, существенно значения [15].

Было изучено влияние 2-амино-2-тиазолина (I) и его 5-*I* (ОН)метильных, а также 2-*N*-моно- и 2-*N,N*-дизамещенных производных на продукцию NO в печени мышей. Оценку токсичности проводили путем инъекции животным всех необходимых веществ, как исследуемых, так и входящих в состав спиновой ловушки. Для экспериментов по измерению содержания NO выбраны дозы веществ, которые были нетоксичны. В целом 5-йодметильные производные тиазолинов (V, VI, VIII, IX, X, XIII) не более токсичны, по сравнению с гидроксиалкильными производными тиазолинов (III, IV, VII). Результаты проведенных исследований представлены в табл. 2.

С точки зрения стерического подобия ингибитора NO-синтазы ее субстрату ($-\text{HNC}(=\text{NH})\text{NH}_2$) все изученные соединения можно разбить на 2 группы. В первую группу вошли соединения, которые содержат *N*-монозамещенный тиамидиниевый фрагмент

(I – VI). Как видно из представленных в табл. 2 данных, изученные соединения проявили незначительную NO-ингибирующую активность. В присутствии этих веществ продукция NO в печени мышей составляла 70 – 85 % от продукции NO у мышей, обработанных только ЛПС. Во второй группе веществ, содержащих *N,N*-дизамещенный тиамидиниевый фрагмент, наиболее активными были 5-йодметил-2-амино-2-тиазолины (VIII, IX, XIII). Среди них соединение IX подавляло продукцию NO до 21 %. Соединения III и VII не влияли на синтез NO.

Полученные данные позволяют сделать ряд выводов о связи химической структуры и биологических свойств изученных соединений.

1. Нет существенных различий в NO-ингибирующей активности среди производных I, содержащих 5-йодметильный или 5-гидроксиметильный заместители.

2. Существенного влияния 2-*N*-моно- и 2-*N,N*-дизамещенных производных I на продукцию NO в печени экспериментальных животных выявить не удалось.

3. Размеры заместителей 2-*N*-моно- и 2-*N,N*-дизамещенных производных I на биологическую активность принципиального действия не оказывают.

В целом, в отличие от данных литературы о высокой активности соединений, содержащих объемные заместители [21, 22], изученный нами ряд производных I не содержал таких веществ. И даже наиболее сильный ингибитор этого ряда (IX) не был более активен, чем базовое соединение — гидробромид 2-амино-2-тиазолина (I, ингибирующая активность при дозе

Таблица 1
Строение исследованных 2-амино-2-тиазолина и его производных

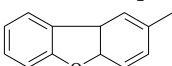
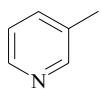
Соединение	R ¹	R ²	R ³	НHal
I	H	H	H	HBr
II	CH ₃	H	H	HBr
III	HOCH ₂	<i>n</i> -MePhCH ₂	H	-
IV	HOCH ₂		H	-
V	ICH ₂	CH ₃	H	HI
VI	ICH ₂	HO(CH ₂) ₂	H	HI
VII	HOCH ₂	PhCH ₂	PhCH ₂	-
VIII	ICH ₂	PhCH ₂	PhCH ₂	HI
IX	ICH ₂	PhCH ₂	Ph(CH ₂) ₂	HI
X	ICH ₂	<i>n</i> -CH ₃ OPhCH ₂	<i>n</i> -CH ₃ OPhCH ₂	HI
XI	BrCH ₂	CH ₃	PhCH ₂	HBr
XII	ICH ₂	$-(\text{CH}_2)_4-$		HI
XIII	ICH ₂	<i>o</i> -ClPhCH ₂		HI

Таблица 2
Влияние на содержание NO 2-амино-2-тиазолина и его производных в печени мышей, обработанных липосахаридом (ЛПС)

Соединение	Доза, ммоль/кг	Активность, % к ЛПС*
I	0,02	23
	0,05	9
II	0,1	73
III	0,1	100
IV	0,1	75
V	0,5	85
VI	0,1	85
VII	0,1	100
VIII	0,02	63
	0,05	52
IX	0,1	21
X	0,1	92
XI	0,5	73
XII	0,5	73
XIII	0,1	69

* Отношение содержания NO в печени экспериментальных мышей к содержанию NO в печени мышей, обработанных только ЛПС ($p > 0,05$).

0,05 ммоль/кг составила 9 %). Этот факт также свидетельствует о метаболической стабильности N-замещенных I.

Авторы благодарят И. М. Федосова за помощь в проведении ЭПР-спектроскопических измерений, а также Н. Г. Кучеренко и А. Н. Тришкину за помощь при проведении экспериментов на животных.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (проекты № 05 – 04 – 48794 и 05 – 03 – 08140 офи-а) и правительства Калужской области (проект № 04 – 04 – 97238).

ЛИТЕРАТУРА

1. D. R. Janero, *Free Radic. Med.*, **28**, 1495 – 1506 (2000).
2. L. Salerno, V. Sorrenti, C. Di Giacomo, et al., *Curr. Pharm. Des.*, **8**, 177 – 200 (2002).
3. С. Я. Проскуряков, А. Г. Конопляников, А. И. Иванников и др., *Успехи соврем. биол.*, **119**, 380 – 395 (1999).
4. M. N. Muscara and J. L. Wallace, *Am. J. Physiol., Gastrointestinal Liver Physiol.*, **39**, 1313 – 1316 (1999).
5. A. J. Hobbs, A. Higgs, and S. Moncada, *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.*, **39**, 191 – 220 (1999).
6. С. Я. Проскуряков, Н. Г. Кучеренко, А. И. Тришкина и др., *Бюл. эксперим. биол. мед.*, **134**, 393 – 396 (2002).
7. С. Я. Проскуряков, Н. Г. Кучеренко, А. А. Мандругин и др., *Радиац. биол. радиоэкол.*, **43**, 57 – 61 (2003).
8. T. W. Sawyer, *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, **155**, 169 – 176 (1999).
9. С. Я. Проскуряков, А. Г. Конопляников, В. Г. Скворцов и др., *Биохимия*, **70**(1), 14 – 32 (2005).
10. С. Я. Проскуряков, А. Г. Конопляников, В. Г. Скворцов и др., *Успехи химии*, **74**(9), 939 – 952 (2005).
11. М. М. Константинова, А. А. Мандругин, А. Г. Тарасенко и др., *Радиобиология*, **17**, 101 – 107 (1977).
12. Л. Г. Толди, *Химия гетероцикл. соед.*, **7**, 878 – 888 (1978).
13. А. Н. Прошин, *Автореф. дис. канд. хим. наук*, Москва (2004).
14. Т. П. Трофимова, А. Н. Пушин, А. Н. Прошин и др., *Химия гетероцикл. соед.*, **3**, 456 – 463 (2007).
15. A. F. Vanin, A. Huisman, E. S. G. Stroes, et al., *Free Rad. Biol. Med.*, **30**(8), 813 – 824 (2001).
16. A. F. Vanin, P. I. Mordvintsev, and A. L. Kleschev, *Studia Biophys.*, **102**(2), 135 – 143 (1984).
17. L. N. Kubrina, W. S. Caldwell, P. I. Mordvintsev, et al., *Biochim. Biophys. Acta*, **1099**, 233 – 237 (1992).
18. Л. Н. Кубрина, П. И. Мордвинцев, А. Ф. Ванин и др., *Бюл. эксперим. биол. мед.*, **1**, 31 – 33 (1989).
19. P. Mordvintsev, A. Mülsch, A. Vanin, et al., *Anal. Biochem.*, **199**, 142 – 146 (1991).
20. A. G. Konoplyannikov, S. Ya. Proskuryakov, L. V. Steyn, et al., *Bull. Exp. Biol. Med.*, **127**(6), 648 – 650 (1999).
21. N. Sennequier, D. Wolan, D. J. Stuehr, et al., *J. Biol. Chem.*, **274**(2), 930 – 938 (1999).
22. K. McMillan, M. Adler, D. S. Auld, et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **97**(4), 1506 – 1511 (2000).

Поступила 11.07.06

NITRIC OXIDE INHIBITOR ACTIVITY OF 2-AMINO-2-THIAZOLINE DERIVATIVES

A. A. Mandrugina¹, T. P. Trofimova¹, V. M. Fedoseev¹, S. Ya. Proskuryakov², L. I. Shtein², A. N. Proschin³, and A. N. Pushin³

¹ Moscow State University, Department of Chemistry, Moscow, Russia;

² State Medical Radiology Research Center, Russian Academy of Medical Sciences, Obninsk, Kaluga oblast, Russia;

³ Institute of Physiologically Active Compounds, Russian Academy of Sciences, Chernogolovka, Moscow Oblast, Russia

A series of 2-amino-2-thiazoline derivatives have been synthesized and characterized with respect to NOS-inhibitor activity *in vivo*. It is established that the dimensions of substituents in 2-N-mono- and 2-N,N-disubstituted 2-amino-2-thiazolines are not significant for the biological activity of products.