

Біологічна активність деяких S-гетерилзаміщених L-цистеїну та їх аналогів

Ю.Ю. Петруша*, Л.О. Омелянчик, О.А. Бражко, М.П. Завгородній

Запорізький національний університет
вул. Жуковського, 66, Запоріжжя, Україна, 69600

Резюме. Досліджено біологічну активність (антибактеріальну, цитотоксичну, психотропну) нових синтезованих S-гетерилзаміщених L-цистеїну та їх структурних аналогів.

Ключові слова: S-гетерилзаміщені L-цистеїну, цитотоксичність, антибактеріальна активність, «відкрите поле», тест Порсолта.

Вступ. Пошук ефективних і малотоксичних біологічно активних речовин для їх застосування в лікарській практиці, ветеринарній медицині та сільському господарстві завжди є актуальним. Похідні гетероциклічних систем піридину й акридину привертають до себе увагу дослідників, що пов'язано з широким спектром біологічної активності цих гетероциклів.

Як відомо, піридин входить до складу багатьох біологічно активних сполук, наприклад, окислювально-відновних ферментів і вітамінів. Також існують дані про те, що піридинвмісні речовини здатні проявляти протимікробну, діуретичну та радіозахисну активність [1]. Заміщені акридини мають виражені фармакологічні ефекти — антидепресивні, антистатичні, антималярійні, протипаразитарні, антихолінестеразні, протизапальні, седативні, протипухлинні та ін. Деякі похідні акридину здатні інгібувати агрегацію тромбоцитів [1, 2]. Результати досліджень показують, що широкий спектр біологічної активності цих азотистих гетероциклів обумовлений впливом головним чином на процеси вільнорадикального окислення в тканинах.

Не менш цікава і структура L-цистеїну, який є одним із найсильніших антиоксидантів та входить до складу білків і, отже, ферментів та деяких гормонів, бере участь в обміні сірки в організмі, процесах детоксикації і в утворенні коензиму А та глутатіону [3]. Цистеїн і деякі його похідні мають радіопротекторну дію [4].

Інтерес викликає дослідження нових сполук, що поєднують у собі ці біологічно активні структури. Таке поєднання може зумовити посилення біологічної активності комбінованих сполук або появу нових властивостей. Цікавим є і вивчення похідних такого азаетероциклу, як 1,2,3,4-тетрагідроакридин (5,6,7,8-тетрагідроакридин), який поєднує у своїй структурі ароматичні й карбоциклічне кільця.

Прогнозування біологічної активності S-гетерилзаміщених L-цистеїну та їх аналогів за допомогою комп'ютерної програми PASS (Prediction Activity Spectra for Substances) показало перспективність отримання речовин з антибактеріальною, антиоксидантною, ноотропною, антидепресивною та іншими видами дії.

Метою нашої роботи було дослідження біологічної активності (антибактеріальної, цитотоксичної, психотропної) нових синтезованих S-гетерилзаміщених L-цистеїну та їх аналогів.

Матеріали і методи дослідження. Структуру синтезованих сполук підтверджено даними ПМР-, ІЧ-, хромато-мас-спектроскопії та еле-

* Corresponding author.

Tel.: +38061-2224166

E-mail address: Yulia.ZNU@mail.ru

ментного аналізу, чистоту — методом тонкошарової хроматографії.

Спектри ПМР знято на приладі «Bruker AC-300» (300 МГц) у ДМСО₆+CCl₄ (1:1), внутрішній стандарт — ТМС, величини хімічних змищень (δ) вимірювали з точністю до 0,01 м.ч. Елементний аналіз сполук проведено за допомогою елементного аналізатора «ELEMENTAR vario EL cube». ІЧ-спектри записані на спектрометрі «Bruker ALPHA FT-IR» на приставці АТР. Хромато-мас-спектри знято на приладі «AGILENT 1100».

Тонкошарову хроматографію проведено на пластинках «Silufol UV-254» словацького виробництва в різних системах розчинників. Проявлення хроматограм здійснено за допомогою УФ-променів.

Дослідження антибактеріальної активності сполук проводили *in vitro* за методикою серійних двократних розведень у рідкому поживному середовищі (бульйон Хоттингера) [5]. Експерименти виконували на 4-х штаммах бактерій, з яких дві культури були грампозитивними (*Bacillus subtilis*, *Staphylococcus aureus*), а інші дві — грамнегативними (*Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*). Оцінку результатів здійснювали в залежності від інтенсивності пригнічення росту тієї чи іншої культури бактерій речовиною з максимальною концентрацією 500 мкг/мл.

Вплив синтезованих сполук на поділ і ріст клітин (цитотоксичність) досліджували в кореновому тесті на паростках *p. Cuscutis sp.* (під час досліду використовували огірки сорту «Конкурент») [6].

Цитотоксичність сполук оцінювали за зменшенням зазначених параметрів в експерименті порівняно з контролем. Цитотоксичність речовин досліджували тільки на гідрохлоридах і солях, що пов'язано з їх кращою розчинністю. Найбільш цікаві результати представлено на графіках, які відображають залежність впливу речовин від концентрації на ріст паростків *Cuscutis sp.* по відношенню до контролю. Показники контролю (вода) прийнято за нуль.

Вплив S-гетерилзаміщених L-цистеїну та їх аналогів на емоційно-поведінкові реакції при гострому стресі вивчали на інтактних білих дорослих мишах вагою 16-20 г в умовах стрес-моделі «відкрите поле» за стандартною

методикою [7, 8]. Водні розчини досліджуваних сполук вводили тваринам внутрішньочеревно за 30 хв до початку тестування в дозі 1/10 LD₅₀. Тварини контрольної групи отримували еквівалентні об'єми фізіологічного розчину.

Досліджували антидепресивну дію сполук на інтактних білих дорослих мишах вагою 16-20 г у тесті Порсолта («тест відчаю») [9, 10], який відтворюється шляхом вимушеного плавання піддослідних тварин. Досліджувані речовини вводили тваринам у дозі 1/10 LD₅₀ за 30 хв до початку тестування. До контрольної групи входили тварини, яким вводили в такому ж об'ємі фізіологічний розчин і яких піддавали такому ж впливу, як і дослідних тварин.

Результати й обговорення. З метою пошуку біологічно активних сполук серед S-гетерилзаміщених L-цистеїну та їх структурних аналогів взаємодією 4-хлорпіридину, 9-хлоракридину та 7-метокси-9-хлор-1,2,3,4-тетрагідроакридину з L-цистеїном, а також N-ацетил-L-цистеїном, 3-меркаптопропіоною, 2-меркаптобурштиною, тіомолочною і тіоглеколевою кислотами в середовищі діоксану синтезовано відповідні гідрохлориди S-гетерил-L-цистеїну та їх аналоги. Реакції проводили, починаючи від декількох хвилин до 4 год (залежно від природи гетероциклу). Отримано більше 25 нових сполук, схеми синтезу яких аналогічні наведеним у наших попередніх дослідженнях [11]. Загальні формули синтезованих сполук наведено в табл. 1.

У результаті цих реакцій отримали S-гетерилзаміщені L-цистеїну та їх структурні аналоги — за деяким виключенням білі, жовті або помаранчеві речовини, більшість з яких розчиняється у воді, метанолі та має теоретичну ліпофільність у межах від -1 до +5, тобто оптимальну для біодоступності.

Під час вивчення протимікробної дії встановлено, що більшість сполук не проявляє антибактеріальної активності за досліджуваних концентрацій. Виняток становлять S-похідні акридину, зокрема S-(акридин-9-іл)-N-ацетил-L-цистеїн (сполука 24), його гідрохлорид (сполука 25), а також гідрохлориди 3-(акридин-9-ілтіо)пропіонової (сполука 26), 2-(акридин-9-ілтіо)бурштинової (сполука 27), S-(акридин-9-ілтіо)оцтової (сполука 30) і 2-(акри-

Хімічна структура і деякі фізико-хімічні властивості
S-гетерилзаміщених L-цистеїну та їх аналогів (* – R₂=HCl)

№ сполуки	R	R ₁	R ₃	T _{пл} , C°	Система розчинника: метанол:хлороформ (1:1) Rf100
1	NH ₂	OH	H	153-155	64
2	NH ₂ ·HCl	OCH ₃	H	121-125	6
3	NHCO(CH ₂) ₂ COOH	OH	H	140-145	58
4*	NH ₂ ·HCl	OH	H	148-150	61
5*	H	OH	COOH	183-185	7
6*	H	OH	H	154-156	83
7	NH ₂	ONa	H	218-221	89
8	H	ONa	COONa	238-240	73
9 (б)*	-	OH	H	205-206	86
10*	NH ₂ ·HCl	OH	H	169-170	70
11	NH ₂ ·HCl	OCH ₃	H	103-105	78
12	NH ₂	OCH ₃	H	107-109	98
13	NHCO(CH ₂) ₂ COOH	OH	H	157-158	53
14	NHCOCH ₃	OH	H	144-145	82
15*	H	OH	H	108-110	73
16*	NHCOCH ₃	OH	H	210-212	95,5
17	H	OH	H	62-64	86
18*	H	OH	COOH	225-228	81
19*	OH	OH	H	192-195	69,5
20	NH ₂	ONa	H	203-205	93,5
21	H	ONa	COONa	278-280	68
22 (б)*	-	OH	H	202-204	87
23 (б)*	-	OH	CH ₃	228-231	76
24	NHCOCH ₃	OH	H	132-135	72
25*	NHCOCH ₃	OH	H	218-225	75
26*	H	OH	H	234-240	97
27*	H	OH	COOH	193-195	77
28	H	OH	COOH	275-277	70
29	NH ₂	ONa	COONa	255-257	72
30 (б)*	-	OH	H	142-145	69
31 (б)*	-	OH	CH ₃	190-191	79

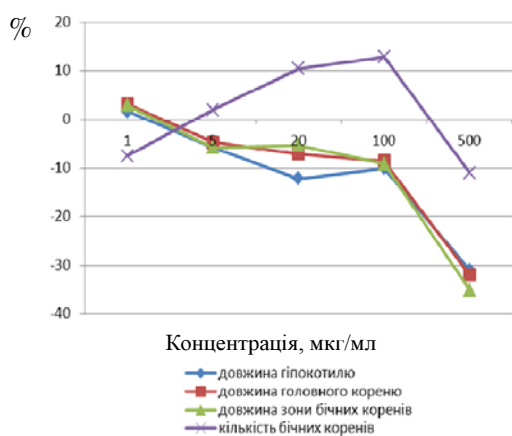


Рис. 1. Вплив гідрохлориду S-(акридин-9-іл)-N-ацетил-L-цистеїну на поділ і ріст клітин паростків р. *C. subtilis* sp.

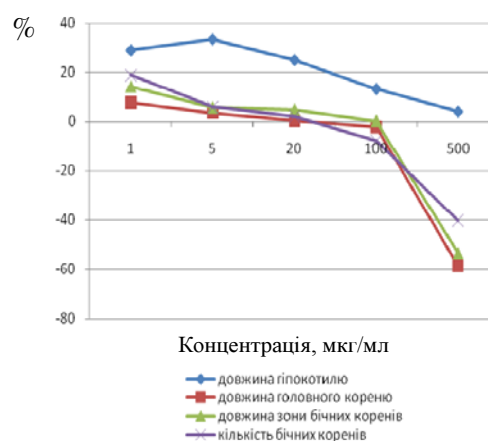


Рис. 2. Вплив гідрохлориду метилового естеру S-(піридин-4-іл)-L-цистеїну на поділ і ріст клітин паростків р. *C. subtilis* sp.

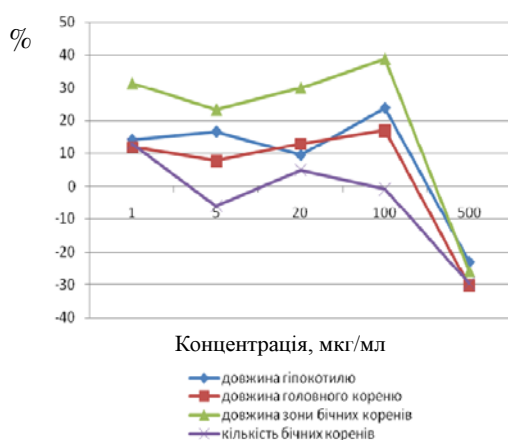


Рис. 3. Вплив гідрохлориду 2-(3-(1,2,3,4-тетрагідро-7-метоксиакридин-9-ілтіо) бурштинової кислоти) на поділ і ріст клітин паростків р. *C. subtilis* sp.

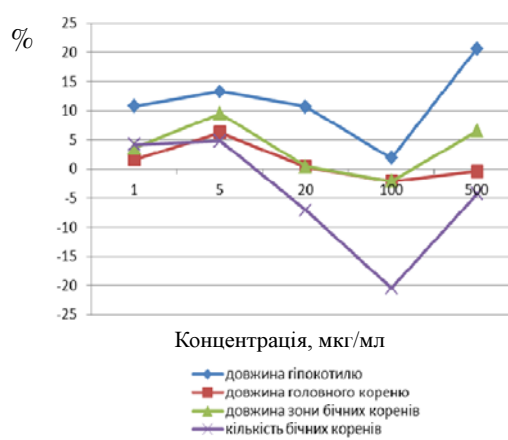


Рис. 4. Вплив дигідрохлориду S-(7-метокси-1,2,3,4-тетрагідроакридин-9-іл)-L-цистеїну на поділ і ріст клітин паростків р. *C. subtilis* sp.

дин-9-ілтіо)пропіонової (сполука 31) кислот, які при концентрації 500 мкг/мл виявляють бактеріостатичну дію по відношенню до *B. subtilis*, а гідрохлорид 3-(акридин-9-ілтіо)пропіонової кислоти (сполука 26) — і до золотавого стафілокока.

Таким чином, можна зробити висновок, що зміна гетероциклу у відповідних сполуках піридину та тетрагідроакридину на акридин веде до появи антибактеріальної активності. Блокування карбоксильних груп бурштинової кислоти (сполука 27) і утворення динатрієвої солі призводить до зменшення бактеріостатичної дії (сполука 29). Утворення N-ацильних похідних та збільшення вуглецевого ланцюга також сприяє зменшенню антибактеріальної активності.

Дослідження цитотоксичності сполук показало, що найбільш цитотоксичними серед перевірених водорозчинних речовин виявилися гідрохлориди S-(піридин-4-іл)оцтової і S-(3-(1,2,3,4-тетрагідро-7-метоксиакридин-9-іл)оцтової кислот. Схожість насіння за концентрації діючої сполуки 500 мкг/мл становила відповідно 51,5 і 17,5 %.

На рис. 1-3 видно, що пригнічення росту паростків підсилюється зі збільшенням концентрації від 1 до 5 мкг/мл, потім майже не змінюється між 5 і 100 мкг/мл (плато на графіках), а потім знову посилюється між 100 і 500 мкг/мл.

Можна припустити, що досліджувані сполуки пригнічують процеси, які визначають швидкість росту паростків не в даний час, а через деякий час після початку впливу. Ці

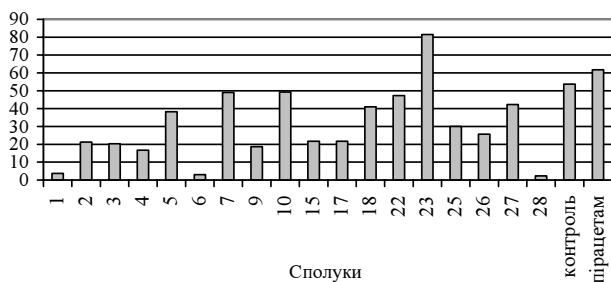


Рис. 5. Горизонтальна рухова активність тварин під дією S-гетерилзаміщених L-триптеїну та їх аналогів.

процеси відрізняються за чутливістю до досліджуваних речовин. Ріст клітин, що розтягуються та від яких залежить приріст у перший час після перенесення в розчин, мало чутливий. А процеси, що проходять у меристемі (поділ клітин і підготування їх до розтягування), навпаки, дуже чутливі, але їх пригнічення позначається на рості паростків через деякий час.

Різниця між чутливістю цих процесів дає змогу припустити, що вони інгібуються за рахунок різних механізмів дії досліджуваних речовин. Перший насичується вже при 5 мкг/мл, і при подальшому збільшенні концентрації до 100 мкг/мл його дія суттєво не посилюється, поки не починає проявлятися другий механізм. У результаті й утворюється плато на графіках [6]. Така закономірність дії властива більшості досліджуваних сполук.

Цікаві результати продемонстрував дигідрохлорид S-(7-метокси-1,2,3,4-тетрагідроакридин-9-іл)-L-триптеїну (рис. 4), найменші (1 і 5 мкг/мл) і найвища (500 мкг/мл) концентрації якого мали стимулюючий ефект зростання показників порівняно з контролем.

Узагальнюючи все сказане вище, можна зазначити, що серед досліджених сполук найменш цитотоксичними виявилися S-заміщені 1,2,3,4-тетрагідроакридину (за винятком сполуки 22). Етерифікація кислот спиртами призводить до збільшення цитотоксичності порівняно з вихідними кислотами, а модифікація карбоксильних груп і утворення динатрієвих солей значно її зменшує.

У ході вивчення емоційно-поведінкових реакцій тварин після стресорного впливу в тесті «відкрите поле» під впливом деяких досліджених S-гетерилзаміщених L-триптеїну спостерігалось зниження горизонтальної рухової ак-

тивності у 1,4-17 разів (рис. 5) та пригнічення вертикальної рухової активності у 1,5-16 разів, що свідчить про седативний вплив цих сполук. Виняток становить сполука 23, яка за впливом на рухову активність перевищує препарат порівняння — пірацетам.

Аналізуючи залежність дії від хімічної структури досліджених сполук, зазначимо, що найбільш сильно на рухову активність тварин впливають S-похідні піридину. У цьому класі сполук етерифікація кислот спиртами, утворення N-ацильних похідних і модифікація карбоксильної групи натрієм призводить до зменшення впливу речовини порівняно з вихідними кислотами. Заміна гетероциклічної системи піридину в S-(піридин-4-іл)-пропіонової кислоті на акридин або тетрагідроакридин також веде до зменшення впливу сполуки на горизонтальну і вертикальну рухову активність мишей порівняно з контролем.

За класичними поняттями, зниження показника рухової активності вказує на зменшення стресованості тварин і, вірогідно, зменшення загального неспокійного стану — страху [12, 13]. Однак, на думку деяких учених [14, 15], пригнічення рухової активності є проявом захисного гальмування, що виникає у тварин у відповідь на стрес. Але відомо, що поведінковий тест «відкрите поле» належить до тестів з найменшою оверсивністю (ступенем прояву стресу у тварин), тому можна вважати S-гетерилзаміщені L-триптеїну та їх аналоги здатними змінювати психофізіологічний стан організму та чинити седативну дію.

Підтвердженням цьому є вивчення антидепресивної дії досліджуваних сполук у тесті Порсолта, в якому моделюється стан поведінкового відчаю з модифікацією рухової та емоційної активності і який дає змогу виявити 90% антидепресантів із будь-яким механізмом дії. Цей тест належить до тестів із сильною оверсивністю піддослідних тварин.

Результати, отримані на цій стрес-моделі, указують на наявність у деяких досліджених S-гетерилзаміщених L-триптеїну значної антидепресивної дії, що проявляється у зменшенні часу пасивного плавання у 1,3-2,1 рази і збільшенні часу настання першого «зависання» у 1,1-1,3 рази.

Найбільшу активність показали сполуки 3 і

8 (S-(піридин-4-іл)-N-сукциноіл-L-цистеїн та динатрієва сіль 2-(піридин-4-ілтїо)бурштинової кислоти), що, імовірно, пов'язано із значною антиоксидантною активністю фармакофора (бурштинової кислоти) і структурною схожістю S-похідних піридину на вітамін B₆, який бере участь у синтезі серотоніну («гормону радості») та підтримує антирадикальні властивості багатьох антиоксидантів (каскадне потенціювання).

Висновки. Проведено цілеспрямований синтез S-гетерилзаміщених L-цистеїну взаємодією галогенпохідних відповідних гетероциклів із цистеїном і його структурними аналогами. Досліджено їх антибактеріальну, цитотоксичну та психотропну дії. Встановлено наявність бактеріостатичної дії по відношенню до *B. subtilis* і *S. aureus* у S-акридинзаміщених L-цистеїну та їх структурних аналогів. Заміна гетероциклічної системи акридину в молекулі аналогічних речовин на піридин або 1,2,3,4-тетрагідроакридин веде до нівеляції зазначеного типу дії.

Вивчення цитотоксичності показало в біль-

шості досліджених сполук тенденцію поступового зменшення показників порівняно з контролем з утворенням «плато» між концентраціями діючої речовини 5 і 100 мкг/мл. Етерифікація кислот спиртами призводить до збільшення цитотоксичності порівняно з вихідними кислотами, а модифікація карбоксильних груп й утворення динатрієвих солей, навпаки, значно її зменшує.

Дослідження психотропної дії вказує на здатність сполук змінювати психофізіологічний стан організму, що в поєднанні з раніше встановленою нами антирадикальною активністю робить S-гетерилзаміщені L-цистеїну та їх структурні аналоги перспективними речовинами для подальшого дослідження та можливої розробки на їх основі препаратів для попередження стресогенних розладів. Найбільша антидепресивна активність властива сполукам, які поєднують у своїй структурі гетероциклічну систему піридину та бурштинову кислоту — відомий антиоксидант.

Надійшла в редакцію 18.12.2011 р.

Biological activity of some S-geterilsubstitutes of L-cysteine and their analogs

Y.Y. Petrusha, L.A. Omelyanchik, A.A. Brazhko, M.P. Zavgorodny

Zaporizhzhya National University
66, Zhukovskogo Str., Zaporizhzhya, Ukraine, 69600

Summary. It was investigated biological activity (antibacterial, cytotoxic, psychotropic) new synthesized S-geterilsubstitutes of L-cysteine and their structural analogs.

Keywords: S-geterilsubstitutes of L-cysteine, cytotoxicity, antibacterial activity, «open field», the test of Porsolt.

Перелік літератури

1. Омелянич Л.А. Синтез, свойства и биологическая активность N- и S-замещенных акридина, хинолина и пиридина: дис. ... доктора фарм. наук / Омелянич Людмила Александровна. — Запорожье, 1991. — 367 с.
2. Бражко О.А. Біологічно активні похідні хіноліну та акридину з азото- та сірковмісними функціональними групами: автореф. дис. на здобуття наук. ступеня докт. біол. наук. — Запоріжжя, 2005. — 43 с.
3. Тринус Ф.П. Фармакотерапевтический справочник / Ф.П. Тринус. — К.: Здоров'я, 1989. — 640 с.
4. Казарян С.А. Производные природных аминокислот в роли радиопротекторов (обзор) / С.А. Казарян, К.П. Григорян, С.Н. Айрапетян, О.Л. Мнджоян // Химико-фармацевтический журнал. — 1995. — № 7. — С. 11-15.
5. Биргер М.О. Справочник по микробиологическим и вирусологическим методам исследования / О.М. Биргер. — М.: Медицина, 1982. — 464 с.
6. Иванов В.Б. Клеточные основы роста растений / В.Б. Иванов. — М.: Наука, 1974. — 222 с.
7. Руководство по экспериментальному (доклиническому) изучению новых фармакологических веществ / Под общей ред. Хабриева Р.У. — М.: Медицина, 2005. — 832 с.
8. Островская Р.У. Выявление активности ноотропов по показателю острого угашения ориентировочной реакции / Р.У. Островская, Т.А. Гудашева // Бюлл. эксперим. биол. и мед. — 1991. — Т. 5, № 12. — С. 498-500.
9. Методики и основные эксперименты по изучению мозга и поведения: пер. с англ. Е.Н. Живописцевой / Я. Буреш, О. Бурешова, Д.П. Хьюстон [под ред. А.С. Бутаева]. — М.: Высшая школа, 1991. — 399 с.
10. Porsolt R.D. Psychotropic screening procedures. In: Methods in Behavioral Pharmacology. Ed. F. van Haaren. — New York: Elsevier, 1993. — P. 23-51.
11. Петруша Ю.Ю. Синтез і біологічна активність

S-гетерилзаміщених L-цистеїну та його аналогів / Ю.Ю. Петруша, Л.О. Омелянчик, О.А. Бражко, М.П. Завгородній // *Ukrainica Bioorganica Acta*. — 2010. — № 2. — С. 36-40.

12. Яковчук Т.В. Психотропная активность солей салициловой кислоты в условиях поведенческих тестов у крыс / Т.В. Яковчук, О.В. Катюшина, К.Р. Хусайнова и др. // *Ученые записки Таврического национального университета им. В.И. Вернадского*. — 2009. — Т. 22 (61), № 1. — С. 134-138.

13. Луценко Р.В. Вплив похідного 2-оксіндолін-3-

глюксілової кислоти на емоційно-поведінкові реакції щурів при гострому стресі / Р.В. Луценко, Т.О. Дев'яткіна, А.Г. Сидоренко, С.В. Колісник, В.В. Болотов // *Фармакологія та лікарська токсикологія*. — 2010. — № 3 (16). — С. 3-7.

14. Маркель А.Л. К оценке основных характеристик поведения крыс в тесте открытого поля / А.Л. Маркель // *Журнал высшей нервной деятельности*. — 1981. — Т. 31, № 2. — С. 301-307.

15. Калуев А.В. Груминг и стресс / А.В. Калуев. — М.: Авикс, 2002. — 161 с.