



УДК 547.235.44:541.69:615.31

## НОВЫЕ ДОНОРЫ И АКЦЕПТОРЫ ОКСИДА АЗОТА КАК ПОТЕНЦИАЛЬНЫЕ ТЕРАПЕВТИЧЕСКИЕ АГЕНТЫ

© 2003 г. В. И. Елинова<sup>\*,#</sup>, А. А. Бобко<sup>\*</sup>, Д. Г. Мажукин<sup>\*\*</sup>,  
А. Л. Маркель<sup>\*\*\*</sup>, В. В. Храпцов<sup>\*</sup>

<sup>\*</sup>Институт химической кинетики и горения СО РАН, 630090, Новосибирск, Институтская ул., 3;

<sup>\*\*</sup>Новосибирский институт органической химии СО РАН, Новосибирск;

<sup>\*\*\*</sup>Институт цитологии и генетики СО РАН, Новосибирск

Поступила в редакцию 04.04.2002 г. Принята к печати 08.04.2002 г.

Описан синтез новых доноров и акцепторов оксида азота. В качестве парамагнитных ловушек NO синтезированы и исследованы новые липофильные нитронилнитроксильные радикалы (NNR), содержащие липофильные группировки. Определена чистота полученных препаратов и подтверждена их структура. С использованием ЭПР-спектроскопии проверена их липофильность. Показано, что включение в липидные мультислой защищает NNR от восстановления в биологических образцах с сохранением их способности к спиновому захвату оксида азота и к переходу в иминонитроксильные радикалы, а снижение скорости восстановления NNR в этих условиях позволяет существенно повысить эффективность их применения в качестве парамагнитных акцепторов оксида азота в биологических системах. Описан синтез нового гидрофильного донора NO – 3-бром-3,4-дигидро-4,4-диметил-3-(2-пиридил)диазет-1,2-диоксида ( $DD_{\text{pyr}}$ ). Определены константы разложения  $DD_{\text{pyr}}$  в Трис-HCl-буфере (pH 7.5) и в DMSO ( $4.5 \times 10^{-6}$  и  $0.5 \times 10^{-6} \text{ c}^{-1}$  соответственно). Существенное увеличение скорости разложения  $DD_{\text{pyr}}$  в буфере по сравнению со скоростями, определенными для ряда диазетинов ранее, делает перспективным использование  $DD_{\text{pyr}}$  в водных средах. В экспериментах на перфузированной хвостовой артерии крысы установлено, что  $DD_{\text{pyr}}$  является эффективным вазодилататором. Внутривенное введение  $DD_{\text{pyr}}$  крысам с повышенным артериальным давлением (линия НИСАГ) в дозах 100–200 мкг/кг веса приводило к значительному снижению артериального давления.

*Ключевые слова:* акцепторы оксида азота; артериальное давление; вазодилататоры; доноры оксида азота; нитронилнитроксильный радикал; оксид азота.

### ВВЕДЕНИЕ

Оксид азота функционирует как сигнальная молекула практически во всех органах и тканях животных и человека. Он непрерывно продуцируется в организме, опосредуя протекание многих физиологических процессов; в частности, он регулирует тонус сосудов, нейротрансмиссию и цитотоксичность [1–4]. Важная роль оксида азота и необходимость исследования механизмов его действия обуславливают целенаправленный поиск соединений, способных регулировать содержание NO в организме. Будучи активным биологическим агентом, оксид азота может оказывать как положительное (регуляторное) воздействие, так и существенные отрицательные эффекты, которые могут приводить к разнообразным патологиям, таким, как инсульт, эндосептический шок и др. Доноры и акцепторы оксида азота – это большой набор

физиологически активных соединений, способных влиять на указанные процессы [5–7]. Так, отрицательного воздействия NO можно избежать применением лекарственных средств, способных либо снижать синтез NO в клетках, либо выступать в качестве его непосредственных ловушек. Низкая продолжительность жизни NO, исчисляемая несколькими секундами, до недавнего времени служила препятствием для количественного определения этого соединения в тканях. В настоящее время разработаны электродный, хемилюминесцентный и другие методы его регистрации. Развитие ЭПР-метода для обнаружения оксида азота в биосистемах показало высокую избирательность по отношению к NO таких ловушек, как комплексы железа с производными дитиокарбамата, а также различные NNR [8–9].

Впервые полученные Ульманом [10], NNR были использованы для измерения концентрации NO в газовой фазе [11]. Была описана и реакция NNR с NO в водном растворе [12]. Позднее различные NNR были использованы в качестве парамагнитных ловушек при изучении NO-доноров,

Сокращения: DD – 3,4-дигидро-1,2-диазет-1,2-диоксид, диазетин; DETC – диэтилдитиокарбамат; INR – иминонитроксильные радикалы; NNR – нитронилнитроксильные радикалы; SIN-1 – гидрохлорид 3-(4-морфолино)сиднонимина.

<sup>#</sup> Автор для переписки (факс: (3832) 34-2350; эл. почта: yelina@ns.kinetics.nsc.ru).

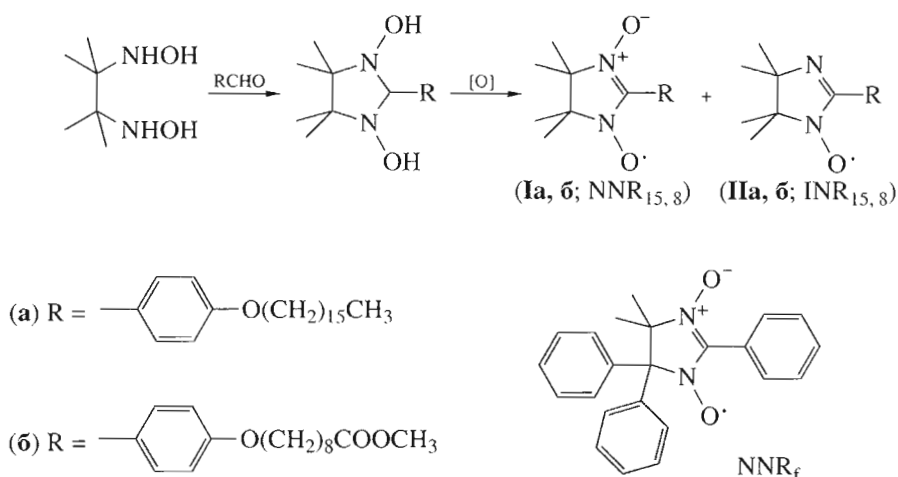


Схема 1.

таких, как нитропруссид натрия, *S*-нитрозоаддукты глутатиона и др. [13].

Ранее мы использовали новые NNR для регистрации оксида азота при разложении 3,4-дигидро-1,2-дiazет-1,2-диоксидов (дiazетинов), *N,N*-бисарилсульфонилгидроксиламина и производных нитрозометоксиаминов [14–16]. Показано, что NNR реагируют с NO, превращаясь в иминонитроксильные радикалы (INR) с характерным изменением спектра ЭПР, и могут использоваться для измерения скоростей генерации NO в водных растворах. Однако применение NNR в качестве парамагнитных ловушек ограничено тем, что в биологических системах они восстанавливаются до диамагнитных продуктов. Ранее мы показали, что в составе липосом NNR восстанавливаются существенно (примерно в 1000 раз) медленнее, чем в растворе [17]. В связи с этим применение липофильных NNR, включенных в липосомы или в мультислой, может существенно повысить их эффективность как акцепторов NO. В настоящей работе мы описываем синтез двух новых NNR (NNR<sub>8</sub> и NNR<sub>15</sub>), содержащих липофильные группировки (схема 1).

В свою очередь доноры NO – это важная группа соединений, применяемых при лечении ряда сердечно-сосудистых заболеваний [5, 6]. В качестве NO-доноров, обладающих сосудорасширяющими свойствами, широко используются нитроглицерин, сиднонимин, нитропруссид натрия, нитро-

зотиолы и др. Побочные эффекты, наблюдаемые при использовании наиболее распространенных вазодилататоров, стимулируют поиски новых эффективных сосудорасширяющих средств, действие которых опосредованно способностью генерировать NO в биологических системах.

Ранее сообщалось, что 3,4-дигидро-1,2-дiazет-1,2-диоксиды (дiazетины, DD) разлагаются в водных средах и в органических растворителях с выделением оксида азота [18–20], являются активаторами гуанилатциклазы и имеют вазодилаторную активность [20].

В настоящей работе синтезирован новый diaзетин DD<sub>pyr</sub> (IV) (схема 2), обладающий более высокой растворимостью в воде. Измерены константы скорости выделения NO *in vitro* и проведено сравнительное тестирование сосудорасширяющей активности DD<sub>pyr</sub> *in vitro* и *in vivo*.

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Известно, что применению NNR в биологических системах препятствует характерное для нитроксильных радикалов восстановление до диамагнитных веществ. Однако восстановление гидрофильных NNR, находящихся во внутреннем объеме липосом, происходит существенно (почти на три порядка) медленнее, чем во внешнем объеме [17]. В связи с этим, мы предположили, что примене-

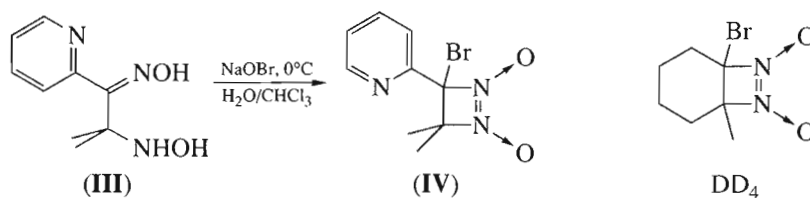
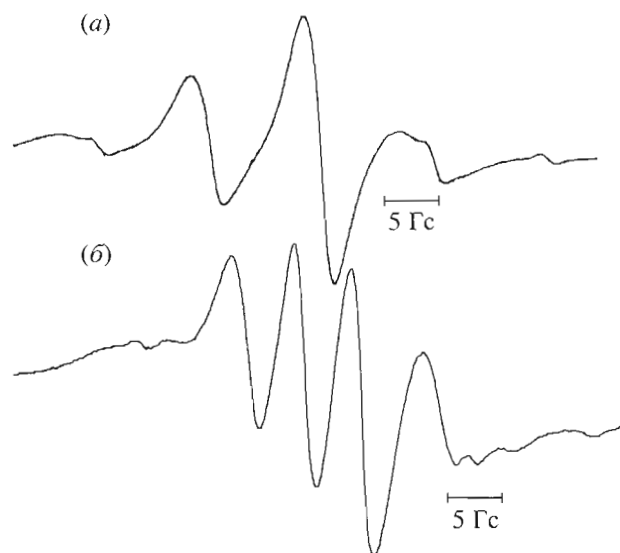
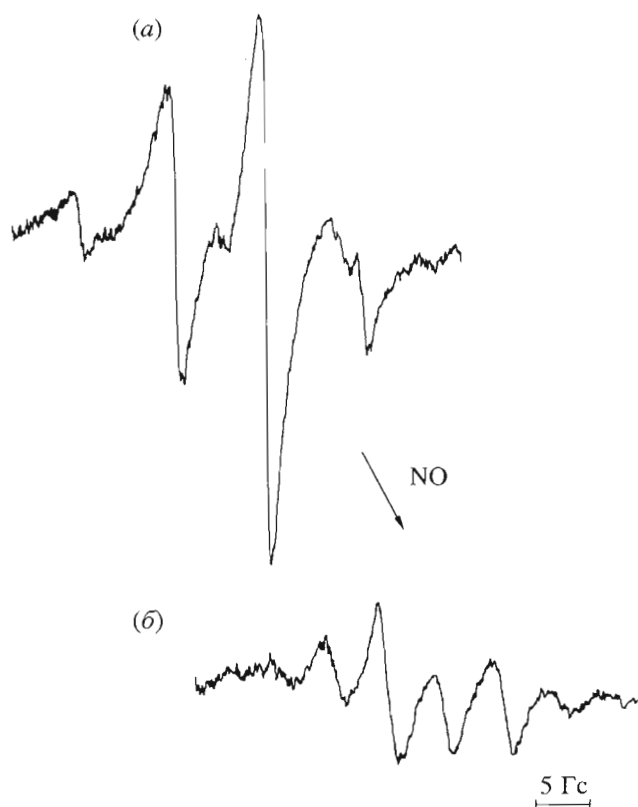


Схема 2.



**Рис. 1.** Спектр ЭПР  $\text{NNR}_8$  (1 мМ), встроенного в мультислои из фосфатидилхолина (24 мг/мл) (а), и спектр ЭПР  $\text{INR}_8$ , зарегистрированный после прибавления к образцу (а) донора NO SIN-1 (5 мМ) (б). Условия записи спектров ЭПР: микроволновая мощность 12.5 мВт, амплитуда модуляции 1 Гс, усиление  $3.2 \times 10^4$ .



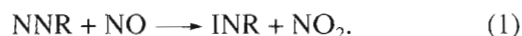
**Рис. 2.** Спектр ЭПР нитронитроксильного радикала: спектр ЭПР  $\text{NNR}_8$ , встроенного в мультислои из фосфатидилхолина в присутствии цитохрома из мозга крысы (а), и спектр ЭПР  $\text{INR}_8$ , зарегистрированный после прибавления к образцу (а) донора NO SIN-1 (5 мМ) (б). Условия записи спектров ЭПР: микроволновая мощность 12.5 мВт, амплитуда модуляции 1 Гс, усиление  $4 \times 10^5$ .

ние гидрофобных  $\text{NNR}$  обеспечит их надежное встраивание в липидную фазу фосфолипидных мультислоев, липосомных и клеточных мембран, тем самым ограничит доступность этих радикалов для биологических восстановителей и существенно повысит эффективность  $\text{NNR}$  как акцепторов NO.

В настоящей работе мы синтезировали два новых  $\text{NNR}$ , содержащих липофильные группировки. Для этого были получены ароматические альдегиды, содержащие объемистые алифатические заместители в бензольном кольце. В частности, алкилированием 4-гидроксибензальдегида гексадецилбромидом и метиловым эфиром 9-бромнонановой кислоты были получены 4-(гексадецилокси)бензальдегид и метиловый эфир 9-(4-формилфенокси)нонановой кислоты [21]. Конденсация полученных соединений с 2,3-(бисгидроксиамино)-2,3-диметилбутаном и последующее окисление полученных имидазолидинов позволило получить соответствующие  $\text{NNR}$  – 2-(4-гексадецилоксифенил)-4,4,5,5-тетраметил-4,5-дигидро-1*H*-имидазол-3-оксид-1-оксил (**1a**) ( $\text{NNR}_{15}$ ) и метиловый эфир 9-[4-(4,4,5,5-тетраметил-3-оксо-1-оксил-4,5-дигидро-1*H*-имидазол-2-ил)фенокси]нонановой кислоты (**1б**) ( $\text{NNR}_8$ ) (схема 1). В качестве побочных продуктов в этой реакции образуются соответствующие иминонитроксильные радикалы ( $\text{INR}$ ) (**1a**) и (**1б**).

Синтезированные в настоящей работе  $\text{NNR}_8$  и  $\text{NNR}_{15}$ , а также гидрофобный  $\text{NNR}_f$ , полученный по методике [22], имеют характерный спектр

ЭПР, состоящий из пяти линий с интенсивностями 1 : 2 : 3 : 2 : 1 благодаря близким константам сверхтонкого взаимодействия электрона с ядерными спинами атомов N1 и N3 ( $a_{\text{N1}} \approx a_{\text{N3}} \approx 8.1$  Гс) [9, 12, 23]. При реакции с оксидом азота  $\text{NNR}_f$  превращается в иминонитроксильный радикал ( $\text{INR}_8$ ) ( $a_{\text{N1}} \approx 9.8$ ,  $a_{\text{N3}} \approx 4.6$  Гс) [9, 12, 23] согласно реакции:



Радикалы  $\text{NNR}_8$  и  $\text{NNR}_f$  (1 мМ) были встроены в мультислои из яичного фосфатидилхолина (24 мг/мл) (см. рис. 1а). В дополнительных экспериментах мы изучали распределение полученных  $\text{NNR}$  между водной и липидной фазами. Для этого к образцу, содержащему  $\text{NNR}_8$  или  $\text{NNR}_f$ , прибавляли раствор гидрофильного парамагнетика  $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$ , который при использованных концентрациях (до 0.05 М) эффективно уширял сигналы ЭПР радикалов в водной фазе по механизму спинового обмена. Было обнаружено, что в образцах, которые содержали гидрофобный  $\text{NNR}$ , встроенный в фосфолипидные мульти-

слои, 85% радикала не подвергалось действию феррицианида, тогда как в растворе феррицианид уширял ЭПР-сигналы этого NNR. Это объясняется недоступностью радикала, встроенного в мультислои, для соударений с молекулами феррицианида, в то время как низкомолекулярная гидрофобная молекула NO свободно проникает через липидные мультислои. Прибавление раствора SIN-1 к образцу NNR<sub>8</sub>, находящемуся в мультислоях из фосфатидилхолина, приводило к трансформации спектра ЭПР этого NNR в спектр ЭПР соответствующего INR (рис. 1б). Аналогичные закономерности наблюдаются также для NNR<sub>f</sub>. Из полученных данных следует, что мембранный барьер значительно ограничивает доступность гидрофобных NNR для биологических восстановителей и существенно снижает скорость их восстановления. Прибавление цитозоля из мозжечка крысы (5 мг/мл белка) к образцу NNR (NNR<sub>8</sub> или NNR<sub>f</sub>), находящемуся в мультислоях из фосфатидилхолина, не сопровождалось изменением ЭПР спектра в течение нескольких часов (рис. 2а), в то время как спектр ЭПР для того же NNR в растворе в присутствии цитозоля не удавалось измерить вследствие быстрого восстановления радикала. Обработка раствором SIN-1 образца встроенного NNR в присутствии цитозоля мозжечка приводила к быстрой трансформации спектра ЭПР этого NNR в спектр INR (рис. 2б).

Известно, что супероксидный радикал – это один из эффективных восстановителей для NNR. Мы также наблюдали быстрое восстановление NNR в присутствии ксантин/ксантин-оксидазной системы, генерирующей O<sub>2</sub><sup>-</sup>. Напротив, было обнаружено, что в этих условиях около 80% интенсивности спектра ЭПР NNR, встроенного в липид, сохраняется в течение нескольких часов. Поэтому представляется перспективным использование NNR, способных встраиваться в мультислои, для увеличения их эффективности при детектировании NO и для продления срока их действия в качестве антагонистов NO *in vitro* и *in vivo*.

*Производные диазетина  
в качестве доноров оксида азота*

В соответствии с обнаруженной ранее корреляцией между структурой диазетинов и их способностью к выделению NO [14, 17] в настоящей работе был синтезирован диазетин (IV) с гидрофильными группировками. Для этого по методике [24] мы синтезировали N-[2-гидроксимино-2-метил-1-(2-пиридил)пропил-2]гидроксиламин (III), последующая обработка которого гипобромитом натрия с умеренным выходом привела к 3-бром-3,4-дигидро-4,4-диметил-3-(2-пиридил)диазет-1,2-диоксиду (DD<sub>pyr</sub>) (IV) (схема 2). Ранее методом спинового захвата с использованием NNR мы измерили константы

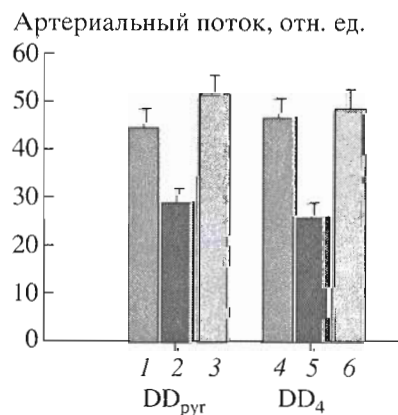
**Таблица 1.** Значения констант скорости ( $k_s$ ) спонтанного распада диазетинов в DMSO и буфере (50 мМ Трис-HCl, pH 7.5)

Среда	$k_s \times 10^6, c^{-1}$	
	DD <sub>pyr</sub>	DD <sub>4</sub>
DMSO	0.49 ± 0.1	1.02 ± 0.2
Буфер	4.44 ± 0.1	1.00 ± 0.2

скорости распада для ряда диазетинов [17]. В настоящей работе сравнение скоростей распада синтезированного DD<sub>pyr</sub> и ранее изученного DD<sub>4</sub> проводилось с использованием метода ЭПР и комплекса Fe(II)-дитиокарбамат, а также спектрофотометрически с использованием оксигемоглобина (см. “Эксперимент. часть”).

Константы скорости распада диазетинов в DMSO были вычислены из начальных скоростей образования парамагнитного комплекса NO-Fe(DETC)<sub>2</sub>. Константы скорости их распада в буфере определялись из начальных скоростей окисления оксигемоглобина до метгемоглобина в присутствии NO, выделяющегося при разложении диазетинов (см. “Эксперимент. часть”). Учитывалось, что при распаде одной молекулы диазетина продуцируется две молекулы NO.

Несмотря на то что структуры диазетинов DD<sub>4</sub> и DD<sub>pyr</sub> существенно различались (схема 2), ожидаемых различий в скоростях выделения оксида азота при их разложении в DMSO не наблюдалось (табл. 1). Однако в буфере мы наблюдали существенно большие скорости разложения DD<sub>pyr</sub> по



**Рис. 3.** Влияние доноров NO на артериальный поток в изолированном сегменте вентральной хвостовой артерии крысы: начальный поток через хвостовую артерию (1); поток в присутствии норадреналина (10–20 мкг/л) (2); поток после прибавления DD<sub>pyr</sub> (до концентрации 5 мкМ) (3); начальный поток через хвостовую артерию после внутренней и внешней перфузии раствором Рингера (4); поток в присутствии норадреналина (5); поток после прибавления DD<sub>4</sub> (до концентрации 80 мкМ) (6).

сравнению с DD<sub>4</sub>, а также с рядом других диазетинов [14, 17], что делает перспективным использование DD<sub>pyr</sub> в водных средах.

Ограничивающим фактором при использовании диазетинов является большое время его полураспада (>10 сут). Это делает необходимым применение больших концентраций для обеспечения достаточно высокого уровня продукции NO. Однако известно, что некоторые виды NO-доноров разлагаются тиолами в биологических системах. По-видимому, именно реакция с тиолами, ведущая к высвобождению NO, определяет биологические эффекты некоторых классов NO-доноров [25]. В работе [25] было обнаружено, что взаимодействие 3-галогено-3,4-дигидродиазет-1,2-диоксидов с тиолами сопровождается выделением оксида азота, причем скорость тиолстимулированного выделения NO может намного превышать скорость образования NO при спонтанном распаде 3,4-дигидродиазет-1,2-диоксидов. Такие данные предполагают увеличение скорости выделения NO диазетинами в биологических образцах вследствие высокой концентрации в них тиолов, в первую очередь, глутатиона.

Сосудорасширяющие свойства диазетинов исследовались в ряде работ как *in vitro*, так и *in vivo* [7, 17, 20]. В настоящей работе проведено исследование физиологической активности вновь синтезированного диазетина (IV).

Опыты *in vitro* проводились на изолированной хвостовой артерии крыс линии Вистар как описано в "Эксперимент. части". Сравнение сосудорасширяющих свойств диазетинов, спонтанно выделяющих оксид азота, приведено на рис. 3. Наблюдается значительный сосудорасширяющий эффект нового DD<sub>pyr</sub> (для сравнения был взят ранее изученный DD<sub>4</sub>) при использовании в концентрациях 5–80 мкМ.

Известно, что многие доноры NO снижают кровяное давление вследствие расширения сосудов, причем некоторые из них используются для лечения гипертонии. Для более полной характеристики диазетинов как доноров оксида азота была исследована способность DD<sub>pyr</sub> снижать кровя-

ное давление у крыс с наследственной гипертонией (в работе использовались крысы линии НИСАГ). Для сравнения был использован ранее изученный DD<sub>4</sub>. Было найдено, что при изученных концентрациях внутрибрюшинное введение DD<sub>pyr</sub> вызывает существенное снижение давления (см. табл. 2).

## ВЫВОДЫ

Таким образом, синтезированные нами нитро-нитроксильные радикалы обладают повышенной липофильностью и способны встраиваться в липосомные и клеточные мембраны. Показано, что такие встроенные NNR могут быть использованы в качестве акцепторов оксида азота. Кроме того, синтезировано новое, растворимое в воде производное 3,4-дигидродиазет-1,2-диоксида в качестве NO-донора. Исследованы физико-химические свойства полученных соединений, а также их физиологическая активность.

Показано, что вновь синтезированные липофильные NNR имеют ряд преимуществ, связанных с возможностью их встраивания в мембранные системы. Это позволяет существенно увеличить их эффективность при использовании в качестве антагонистов оксида азота.

Показано, что производное 3,4-дигидродиазет-1,2-диоксида (DD<sub>pyr</sub>), являясь донором NO, эффективно снижает давление у крыс гипертонивной линии НИСАГ. По реактивности изолированного артериального сегмента оценена сосудорасширяющая активность DD<sub>pyr</sub> *in vitro*.

## ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

В работе использовали NADH (Reanal, Венгрия), бычий дважды кристаллизованный гемоглобин фирмы (Koch-Light, ФРГ), яичный фосфатидилхолин (Россия), гидрохлорид 3-(4-морфолино)сиднонимина (SIN-1) (Kasselea-Hoechst, ФРГ) и дитионит натрия (Merk, ФРГ), DD<sub>4</sub> (1-бром-6-метил-7,8-диазабицикло[4,2,0]окт-7-ен-7,8-диоксид) синтезирован как описано в работе [14]. При спектральных методах анализа использовали следующие приборы: ИК-спектрометры Vector-22, Specord 80 и DB-GD (Beckman); УФ-спектрометры Specord 40, Ultrospec II LKB Biochrome и DB-GD (Beckman); ЭПР-спектрометры Bruker ESP-300 и Bruker ER 200D-SRC с IBM-совместимым компьютером.

DD<sub>4</sub> синтезировали как описано в работе [14]. ИК-спектры соединений (Ia), (Ib), (IIa) и (IV) измеряли в таблетках с KBr (концентрация 0.25%, толщина таблетки 1 мм); ИК-спектр соединения (IIb) – в CCl<sub>4</sub> (концентрация 5%) на спектрометре Specord M-80. УФ-спектры регистрировали на приборе Specord UV-VIS в этаноле. Спектры <sup>1</sup>H- и <sup>13</sup>C-ЯМР соединения (IV) записаны на приборе Bruker AC-200 (200.13 и 50.32 МГц соответствен-

**Таблица 2.** Снижение давления у крыс после внутрибрюшинной инъекции диазетинов и нитроглицерина\*

Контроль	DD <sub>pyr</sub> (100 мкг/кг)**	DD <sub>4</sub> (200 мкг/кг)**	Нитроглицерин (900 мкг/кг)**
180 ± 5	157 ± 5	145 ± 4	140 ± 6

\* Указаны минимальные систолические давления (в мм рт. ст.) в течение первых 10 мин после внутрибрюшинной инъекции 0.2 мл растворов соединений и среднеквадратичные ошибки, n = 4; P < 0.01 по отношению к контролю.

\*\* Дозы, приводившие к ≈ 20%-му снижению давления.

но), в качестве внутреннего стандарта использовали сигнал растворителя.

Контроль за ходом реакций осуществляли методом ТСХ на пластинках Silufol UV-254 в системе хлороформ–метанол, от 25 : 1 до 6 : 1.

**2-(4-Гексадецилоксифенил)-4,4,5,5-тетраметил-4,5-дигидро-1H-имидазол-3-оксид-1-оксил (Ia) и 2-(4-гексадецилоксифенил)-4,4,5,5-тетраметил-4,5-дигидро-1H-имидазол-1-оксил (IIa).** К раствору 0.37 г (2.5 ммоль) 2,3-бисгидроксиамино-2,3-диметилбутана [26] в 6 мл этанола прибавили 0.99 г (2.9 ммоль) 4-(гексадецилокси)бензальдегида, смесь кипятили 2 ч, выдержали 1 ч при 20°C, осадок отфильтровали и получили 0.72 г смеси соединений (Ia) и (IIa). Раствор этой смеси в 15 мл  $\text{CHCl}_3$  перемешивали 30 мин с 1.44 г (6 ммоль)  $\text{PbO}_2$ , осадок отфильтровали, а фильтрат упарили. Остаток хроматографировали на колонке с силикагелем (элюент  $\text{CHCl}_3$ ). Собирали две фракции – оранжевого ( $R_f \sim 0.65$ ) и темно-синего цвета ( $R_f \sim 0.45$ ), которые упарили; получили соответственно 0.38 г INR (IIa) и 0.15 г NNR (Ia). (Ia); выход 13%, т. пл. 85–87°C (из этанола); ИК ( $\nu$ ,  $\text{см}^{-1}$ ): 2860 (C–O), 1605 (C=C), 1360 (N–O); УФ [ $\lambda_{\text{max}}$ , нм ( $\lg \epsilon$ )]: 283 (4.26), 322 (3.75), 365 (3.90), 610 (2.98). Найдено, %: С 74.60, Н 11.01, N 5.80.  $\text{C}_{29}\text{H}_{49}\text{N}_2\text{O}_3$ . Вычислено, %: С 73.59, Н 10.58, N 5.90. (IIa); выход 33%, т. пл. 45–47°C (из этанола), ИК ( $\nu$ ,  $\text{см}^{-1}$ ): 2850 (C–O), 1605 (C=C); УФ [ $\lambda_{\text{max}}$ , нм ( $\lg \epsilon$ )]: 256 (4.27), 468 (2.84). Найдено, %: С 76.60, Н 11.20, N 5.80.  $\text{C}_{29}\text{H}_{49}\text{N}_2\text{O}_2$ . Вычислено, %: С 76.10, Н 10.80, N 6.10.

**Метилловый эфир 9-[4-(4,4,5,5-тетраметил-3-оксо-1-оксил-4,5-дигидро-1H-имидазол-2-ил)фенокси]нонановой кислоты (Iб) и метилловый эфир 9-[4-(4,4,5,5-тетраметил-1-оксил-4,5-дигидро-1H-имидазол-2-ил)фенокси]нонановой кислоты (IIб).** К суспензии 1.61 г (5.5 ммоль) 4-(8-метоксикарбонил)оксидбензальдегида в 5 мл метанола прилили раствор 0.74 г (5 ммоль) 2,3-бисгидроксиамино-2,3-диметилбутана в 5 мл  $\text{MeOH}$ . Реакционную смесь кипятили с обратным холодильником в течение 2.5 ч, охладили, разбавили метанолом до объема 50 мл и присыпали 2.61 г (30 ммоль) двуокиси марганца. Суспензию встряхивали в течение 2 ч, окислитель отфильтровали, и фильтрат упарили. Остаток хроматографировали на колонке с силикагелем (элюент хлороформ–метанол, 50 : 1). Собирали две фракции (оранжевого и темно-синего цвета), которые упарили; получили соответственно 0.20 г INR (IIб) и 0.06 г NNR (Iб). (Iб); выход 35%, т. пл. 81–83°C, ИК ( $\nu$ ,  $\text{см}^{-1}$ ): 1740 ( $\text{COOMe}$ ), 1605 (C=C), 1360 (N–O). Найдено, %: С 65.90, Н 8.34, N 6.80.  $\text{C}_{23}\text{H}_{35}\text{N}_2\text{O}_5$ . Вычислено, %: С 65.85, Н 8.41, N 6.68. (IIб); выход 10%, масло, ИК ( $\nu$ ,  $\text{см}^{-1}$ ): 1740 ( $\text{COOMe}$ ), 1605 (C=C). Найдено, %: С 68.20, Н 8.50, N 6.92.  $\text{C}_{23}\text{H}_{35}\text{N}_2\text{O}_4$ . Вычислено, %: С 68.46, Н 8.74, N 6.94.

**3-Бром-3,4-дигидро-4,4-диметил-3-(2-пиридил)-1,2-дiazет-1,2-диоксид (IV).** К охлажденному до 0°C раствору гипобромита натрия, полученному из 1.02 мл (20 ммоль) брома и 14 мл 10% водного раствора  $\text{NaOH}$  (40 ммоль), приливали 15 мл охлажденного хлороформа, после чего по каплям, при интенсивном перемешивании и постоянном охлаждении ледяной баней в течение 10 мин – насыщенный раствор 0.98 г *N*-[2-гидроксиимино-2-метил-1-(2-пиридил)пропил-2]гидроксиламина (III) [24] в 10 мл воды (этот раствор готовили при 60°C). Реакционную смесь перемешивали при 0°C в течение 15 мин, хлороформный слой отделяли, а водный слой дополнительно экстрагировали  $\text{CHCl}_3$  (2 × 10 мл). Объединенные органические вытяжки промывали 2 мл насыщенного раствора  $\text{Na}_2\text{SO}_3$ , сушили сульфатом магния и упаривали. Остаток хроматографировали на колонке с силикагелем при элюции хлороформом, собирая фракцию с  $R_f \sim 0.2$ . После упаривания остаток охлаждали до –12°C, выдерживали до начала кристаллизации и растирали с 10 мл гексана. Осадок отфильтровывали и получали 0.35 г (26%) diaзетина (IV). Т. пл. 91–93°C (разл., из этанола); ИК ( $\text{KBr}$ ,  $\text{см}^{-1}$ ): 1565 (с, N=N), 1475 (с, N=N → O);  $^1\text{H}$ -ЯМР ( $\text{CDCl}_3$ ): 1.35 (3 H, с, 4-Me), 1.99 (3 H, с, 4-Me), 7.31–7.38 (1 H, м, H3, пиридил), 7.77–7.81 (2 H, м, H4 и H5, пиридил), 8.67 (1 H, дт,  $^2J$  4.5,  $^3J$  1.4 Гц, H6, пиридил);  $^{13}\text{C}$ -ЯМР ( $\text{CDCl}_3$ ): 20.80 (к, Me), 22.06 (к, Me), 86.14 (с, C4), 90.72 (с, C3), 120.36, 124.58, 137.39, 150.01 (4 д, 4 CH, пиридил), 153.09 (с, C<sub>i</sub>, пиридил). Найдено, %: С 39.44, Н 3.58, N 14.96.  $\text{C}_9\text{H}_{10}\text{BrN}_3\text{O}_2$ . Вычислено, %: С 39.72, Н 3.71, N 15.45, Br 29.36.

**Животные.** В работе использовали самцов крыс гипертензивной линии НИСАГ и нормотензивной линии Вистар в возрасте 1, 2, 3 и 6 месяцев. Крыс содержали в стандартных условиях вивария ИЦиГ СО РАН, воду и пищу давали без ограничения.

**Изучение сосудорасширяющего эффекта diaзетинов DD<sub>4</sub> и DD<sub>pyr</sub> на сосудах.** Под нембуталовой наркозом (50 мг/кг) у крыс делали резекцию сегмента длиной 1.5 см вентральной хвостовой артерии. Удаленный сегмент немедленно помещали в раствор Рингера при температуре 0°C. Оба свободных конца артерии присоединяли под бинокулярным микроскопом к металлическим канюлям (толщина артерии около 500 мкм). Боковые артериальные веточки перевязывали шелковыми нитями. Затем артерию помещали в камеру объемом 8 мл и подвергали внутренней и внешней перфузии оксигенированным раствором Рингера при температуре 37°C. Перфузионное давление составляло 70 мм рт. ст. Через 30 мин после помещения артерии в камеру (время, необходимое для уравнивания со средой) начинали эксперимент. Поток через артерию регистрировали с помощью фотоэлектрического счетчи-

ка капель. В начале эксперимента в течение нескольких мин измеряли базовый поток через артерию. Затем в жидкость, омывающую артерию снаружи, вводили раствор норадреналина (до концентрации 10–20 мг/мл), и реакцию регистрировали в течение 10 мин и рассчитывали как отношение потока через артерию до и после введения норадреналина. Для определения сосудорасширяющей активности на фоне норадреналина исследуемые диазетины растворяли в DMSO, медленно разбавляли раствором Рингера и добавляли в жидкость, омывающую артерию снаружи, до концентрации 5–80 мкМ. Растворы диазетинов, вводимые в установку, содержали не более 1% DMSO. Реакцию регистрировали в течение 10 мин, и эффект введенного диазетина определяли как отношение потока через артерию до и после добавления этого реагента.

**Антигипертонические эффекты диазетинов** изучали в условиях внутрибрюшинного введения. DD<sub>4</sub> или DD<sub>пуг</sub> растворяли в растворе Рингера и вводили крысам линии НИСАГ в объеме 0.2 мл. Перед экспериментом крыс анестезировали эфиром. Измеряли систолическое давление методом манжетки в течение первых 10 мин после инъекции. В качестве контроля крысам вводили раствор Рингера.

**Газообразный оксид азота** получали постепенным прибавлением разбавленной азотной кислоты (1.42 г/см<sup>3</sup>) к медным стружкам. Полученный газ пропускали через слабощелочной раствор NaOH и собирали в сосуд методом вытеснения воды.

**Цитозоль из мозжечка крыс** готовили следующим образом. Крыс (Вистар, 150–200 г) декапитировали, мозжечок извлекали и гомогенизировали. Гомогенат центрифугировали в течение 10 мин при 4°C и 18000 g. Супернатант использовали как источник NO-синтазы.

**Приготовление липидных мультислоев из яичного фосфатидилхолина с встроенными NNR.** Концентрация липида составляла 24 мг/мл, концентрация NNR<sub>8</sub> или NNR<sub>f</sub> – 1 мМ. Все компоненты растворяли в хлороформе. Полученный раствор упаривали в вакууме. Сухой липидный остаток растворяли в 0.1 М калий-фосфатном буфере, pH 7.6. От радикала, не вошедшего в мультислой, освобождались следующим образом: образцы центрифугировали в течение 5 мин при 0°C и 10000 g, супернатант удаляли, а осажденный липид разбавляли буфером до начального объема. Эту процедуру повторяли 3–4 раза. Скорость выхода радикалов из липидной фазы определяли по скорости уменьшения сигнала ЭПР после прибавления 50 мМ K<sub>3</sub>Fe(CN)<sub>6</sub>. Скорость восстановления радикалов в присутствии цитозоля из мозжечка крысы измеряли таким же образом, но вместо K<sub>3</sub>Fe(CN)<sub>6</sub> прибавляли цитозоль.

**Скорость генерации NO** измеряли также методом ЭПР с использованием комплекса Fe(II)–дитиокарбамат. Растворы – 1 мМ FeSO<sub>4</sub> и 5 мМ диэтилдитиокарбамат (DETC) – готовили непосредственно перед измерением и использовали в течение нескольких часов. DETC был предварительно растворен в небольшом объеме DMSO. Все эксперименты проводили в 50 мМ калий-фосфатном буфере, pH 7.5.

**Спектрофотометрическое измерение скорости разложения диазетинов** проводили с использованием оксигемоглобина. Оксигемоглобин получали прибавлением 0.1 мг дитионита натрия к 0.1 мМ раствору метгемоглобина. Раствор очищали от избытка восстановителя гель-фильтрацией на колонке с сефадексом G-25. Раствор диазетина (5 мМ) в 50 мМ Трис-НСI-буфере, pH 7.5, содержащем 0.1% DMSO, нагревали до 78°C. Аликвоты объемом 1 мл отбирали через определенные промежутки времени. К отобраным аликвотам добавляли 0.1 мл раствора оксигемоглобина в 50 мМ Трис-НСI-буфере, pH 7.5, до конечной концентрации 8 мкМ. Регистрировали изменение оптического поглощения ( $\lambda$  415 нм,  $\epsilon$  101.3 мМ<sup>-1</sup> см<sup>-1</sup>) в результате реакции оксигемоглобина с оксидом азота.

**Статистическую обработку полученных результатов** проводили с помощью критерия Стьюдента.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований, гранты № 02-04-48291 и 02-04-48374.

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Bredt D.S., Snyder S.H.* // *Annu. Rev. Biochem.* 1994. V. 63. P. 175–195.
2. *Anggard E.* // *The Lancet.* 1994. V. 343. P. 1199–1206.
3. *Schmidt H., Walter U.* // *Cell.* 1994. V. 78. P. 919–925.
4. *Das S., Kumar K.N.* // *Life Sci.* 1995. V. 57. P. 1547–1563.
5. *Anderson T.J., Meredith I.T., Ganz P., Selwin A.P., Yeung A.C.* // *J. Am. Coll. Cardiol.* 1994. V. 24. P. 555–566.
6. *Bassenge E.* // *Cardiovasc. Drugs Therapy.* 1994. V. 8. P. 601–610.
7. *Severina I.A., Ryaposova I.K., Volodarsky L.B., Mazhukin D.G., Tikhonov A.Ya., Schwartz G.Ya., Granic V.G., Grigor'ev D.A., Grigor'ev N.B.* // *Biochem. and Molec. Biol. Internet.* 1993. V. 30. P. 357–366.
8. *Mordvintcev P., Mulsh A., Busse R., Vanin A.* // *Anal. Biochem.* 1991. V. 199. P. 142–146.
9. *Joseph J., Kalyanaraman B., Hyde J.S.* // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 1993. V. 192. P. 926–934.
10. *Ullman E.F., Call L., Osiecki J.H.* // *J. Org. Chem.* 1970. V. 35. P. 3623.
11. *Nadeau J.S., Boocock D.G.B.* // *Anal. Chem.* 1977. V. 49. P. 1672.

12. Akaike T., Yoshida M., Miyamoto Y., Sato K., Kohno M., Sasamoto K., Miyazaki K., Ueda S., Maeda H. // *Biochemistry*. 1993. V. 32. P. 827–832.
13. Singh R.J., Hogg N., Neese F., Joseph J., Kalyanaraman B. // *Photochem. Photobiol.* 1995. V. 61. P. 325–330.
14. Utepbergenov D.I., Khrantsov V.V., Vlassenko L.P., Markel A.L., Mazhukin D.G., Tikhonov A.Ya., Volodarsky L.B. // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 1995. V. 214. P. 1023–1032.
15. Balakirev M.Yu., Khrantsov V.V. // *J. Org. Chem.* 1996. V. 61. P. 7263–7269.
16. Khlestkin V.K., Mazhukin D.G., Tikhonov A.Ya., Rybalova T.V., Bagryanskaya I.Yu., Gatilov Y.V. // *Synthesis*. 2000. P. 681–690.
17. Храмов В.В., Утепбергенов Д.И., Вольдман Я.Ю., Влащенко Л.П., Маркель А.Л., Кирилук И.А., Григорьев И.А., Мажукин Д.Г., Тихонов А.Я., Володарский Л.Б. // *Биохимия*. 1996. Т. 61. С. 1731–1742.
18. Балушкина Н.Н., Григорьев Н.Б., Северина И.С. // *Биохимия*. 1996. Т. 61. С. 2140–2147.
19. Володарский Л.Б., Тихонова Л.А. // *Химия гетероцикл. соед.* 1975. Т. 6. С. 748–752.
20. Северина И.С., Бусыгина О.Г., Пятакова Н.В. // *Вест. РАМН*. 2000. Т. 4. С. 25–30.
21. Shimazu Y., Shigeta K., Kusabayashi S. // *Mol. Cryst. Liq. Cryst.* 1986. V. 40. P. 105–117.
22. Reznikov V.A., Volodarsky L.B. // *Tetrahedron Lett.* 1993. V. 49. P. 10669–10692.
23. Woldman Ya., Khrantsov V., Grigor'ev I., Kiriljuk I., Utepbergenov D. // *Bioch. Bioph. Res. Commun.* 1994. V. 202. P. 195–203.
24. Войнов В.М., Володарский Л.Б. // *Изв. АН. Серия хим.* 1997. № 1. С. 131–136.
25. Kirilyuk I.A., Utepbergenov D.I., Mazhukin D.G., Fechner K., Mertsch K., Khrantsov V.V., Blasig I.E., Haseloff R.F. // *J. Med. Chem.* 1998. V. 41. P. 1027–1033.
26. Lamchen M., Mittag T.W. // *J. Chem. Soc. (C)* 1966. № 24. P. 2300–2303.

## New Donors and Acceptors of Nitrogen Oxide as Potential Therapeutic Agents

V. I. Elinova<sup>##</sup>, A. A. Bobko<sup>\*</sup>, D. G. Mazhukin<sup>\*\*</sup>, A. L. Markel<sup>\*\*\*</sup>, and V. V. Khrantsov<sup>\*</sup>

<sup>#</sup> Fax: (3832) 34-2350; e-mail: yelinova@ns.kinetics.nsc.ru

<sup>\*</sup> Institute of Chemical Kinetics and Combustion, Siberian Division, Russian Academy of Sciences, ul. Institutskaya 3, Novosibirsk, 630090 Russia

<sup>\*\*</sup> Novosibirsk Institute of Organic Chemistry, Siberian Division, Russian Academy of Sciences, pr. Akademika Lavrent'eva 9, Novosibirsk, 630090 Russia

<sup>\*\*\*</sup> Institute of Cytology and Genetics, Siberian Division, Russian Academy of Sciences, pr. Akademika Lavrent'eva 10, Novosibirsk, 630090 Russia

The synthesis of new donors and acceptors of nitrogen oxide is described. New lipophilic nitronylnitroxyl radicals (NNR) that act as paramagnetic scavengers of nitrogen oxide are synthesized and characterized. The purity of the preparations is determined, and their structures are confirmed. The lipophilicity of the radicals is tested by ESR spectroscopy. The incorporation into lipid multilayers is shown to protect NNR from reduction in biological samples, while their ability to scavenge nitrogen oxide and form iminonitroxyl radicals is retained. A decreased rate of NNR reduction under these conditions substantially enhances their effectiveness as paramagnetic acceptors of nitrogen oxide in biological systems. The synthesis of a new hydrophilic NO donor, 3-bromo-3,4-dihydro-4,4-dimethyl-4-(2-pyridyl)-diazet-1,2-dioxide (DD<sub>pyr</sub>), is described. The constants of DD<sub>pyr</sub> decomposition in tris-HCl buffer (pH 7.5) and in DMSO are determined ( $4.5 \times 10^{-6}$  and  $0.5 \times 10^{-6} \text{ s}^{-1}$ , respectively). A substantially higher rate of DD<sub>pyr</sub> decomposition in buffer, compared with the decomposition rates determined previously for some diazetines, makes DD<sub>pyr</sub> a prospective candidate for the use in aqueous media. It is found in experiments on perfused rat caudal artery that DD<sub>pyr</sub> is an effective vasodilator. Intra-peritoneal injection of DD<sub>pyr</sub> to hereditarily hypertensive rats (ISIAH line) at doses of 100–200 µg/kg body mass considerably diminishes their systolic arterial pressure. The English version of the paper: *Russian Journal of Bioorganic Chemistry*, 2003, vol. 29, no. 4; see also <http://www.maik.ru>.

*Key words:* acceptors of nitrogen oxide, arterial pressure, donors of nitrogen oxide, nitronylnitroxyl radical, nitrogen oxide, vasodilators