

УДК 541.49 + 546.562

Г. И. ГОРБАЦЕВИЧ<sup>1</sup>, Н. В. ЛОГИНОВА<sup>1</sup>, Г. А. КСЕНДЗОВА<sup>2</sup>,  
Н. П. ОСИПОВИЧ<sup>2</sup>, С. И. СТАХЕВИЧ<sup>1</sup>, И. Н. СЛАБКО<sup>3</sup>

## БИОАКТИВНЫЕ МЕТАЛЛОКОМПЛЕКСЫ ПРОИЗВОДНЫХ 4,6-ДИ-ТРЕТ-БУТИЛ-2,3-ДИГИДРОКСИБЕНЗАЛЬДЕГИДА: АНТИОКСИДАНТНАЯ И АНТИМИКРОБНАЯ АКТИВНОСТЬ

<sup>1</sup>Белорусский государственный университет, Минск, Беларусь

<sup>2</sup>НИИ физико-химических проблем

Белорусского государственного университета, Минск, Беларусь

<sup>3</sup>Белорусский государственный медицинский университет, Минск, Беларусь

Определены условия синтеза комплексов Mn(II), Fe(II), Co(II), Ni(II), Cu(II), Zn(II) и Ag(I) с производными 4,6-ди-*трет*-бутил-2,3-дигидроксибензальдегида с высоким выходом продукта (70–90 %): инертная атмосфера (аргон), стехиометрическое соотношение лиганд / ацетат металла 2 : 1, метанол или водно-этанольная смесь в качестве растворителя. Установлено, что синтезированные комплексы являются рентгеноаморфными, имеют состав с мольным отношением металл : лиганд = 1 : 2, характеризуются высокой липофильностью ( $\lg P_{ow} = 1,6–3,0$ ) и антиоксидантной активностью, в частности способностью нейтрализовать супероксид анион-радикал ( $IC_{50} = 1,1–16,3$  мкмоль/л) и восстанавливать феррицитохром *c* ( $v = 0,2–0,5$  нмоль/мин) *in vitro*. Установлена высокая и умеренная активность металлокомплексов в отношении грамположительных бактерий (*B. subtilis*, *S. lutea*, *M. smegmatis*, МИК = 0,007–0,071 мкмоль/мл), дрожжевых и плесневых грибов (*A. alternata*, *A. niger*, *Candida spp.*, RI = 80–100 %).

The conditions of high yield (70–90 %) synthesis of Mn(II), Fe(II), Co(II), Ni(II), Cu(II), Zn(II), and Ag(I) complexes with 4,6-di-*tert*-butyl-2,3-dihydroxybenzaldehyde have been specified that were an inert atmosphere (argon), 2 : 1 ligand / metal acetate stoichiometric ratio, methanol or water-ethanol mixture as a solvent. The complexes synthesized were found to be amorphous, with a molar ratio of metal : ligand = 1 : 2. They were characterized by a high lipophilicity ( $\lg P_{ow} = 1.6–3.0$ ) and antioxidant activity, in particular, they were able to neutralize superoxide ( $IC_{50} = 1.1–16.3$   $\mu\text{mol/l}$ ) and to reduce ferricytochrome *c* ( $v = 0.2–0.5$   $\text{nmol/min}$ ) *in vitro*. The metal complexes were found to be highly or moderately active against Gram-positive bacteria (*B. subtilis*, *S. lutea*, *M. smegmatis*, MIC = 0.007–0.071  $\mu\text{mol/ml}$ ), yeast and moulds (*A. alternata*, *A. niger*, *Candida spp.*, RI = 80–100 %).

*Ключевые слова:* производные 4,6-ди-*tert*-бутил-2,3-дигидроксibenзальдегида; металлокомплексы; цитохром *c*; СОД-активность; антимикробная активность.

*Keywords:* 4,6-di-*tert*-butyl-2,3-dihydroxybenzaldehyde derivatives; metal complexes; cytochrome *c*; SOD activity; antimicrobial activity.

Одним из направлений координационной химии является синтез и изучение свойств комплексов металлов с органическими соединениями, поскольку они обладают практически важными свойствами, в том числе используются в медицине как химиотерапевтические и диагностические средства [1]. В настоящее время осуществляются разработка и поиск новых антимикробных агентов на их основе, что связано с ростом частоты инфекций, вызванных полирезистентными штаммами микроорганизмов. Один из перспективных методов борьбы с ними – использование агентов, действующих одновременно на несколько биомишеней, что снижает вероятность одновременной мутации в нескольких генах [1, 2].

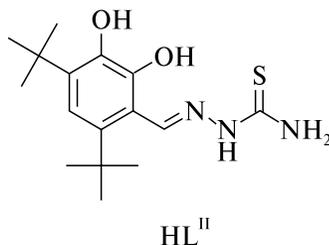
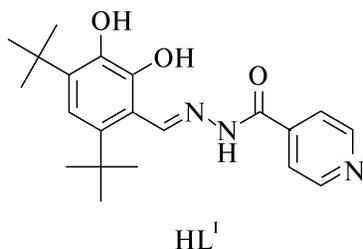
Среди органических лигандов, используемых для синтеза комплексов, важное место занимают природные и синтетические производные 1,2-дигидроксibenзолов, так как, проявляя окислительно-восстановительные свойства, они способны участвовать во многих биологических процессах (коферменты оксидоредуктаз, природные антиоксиданты, витамины и др.) [3]. Нами установлено, что металлокомплексы с синтетическими производными 1,2-дигидроксibenзолов проявляют антибактериальную и антифунгальную активность, т. е. характеризуются более широким спектром действия по сравнению со стандартными антибиотиками, что делает их перспективными базовыми структурами для дальнейшего поиска фармакологически активных соединений [4]. Кроме того, наличие у этих соединений антиоксидантных свойств позволяет рассматривать их в качестве потенциальных ранозаживляющих средств.

Для целенаправленного варьирования комплексообразующих свойств производных 1,2-дигидроксibenзолов и получения их новых биоактивных металлокомплексов сотрудниками кафедры радиационной химии и химико-фармацевтических технологий БГУ осуществлена модификация структуры лигандов путем взаимодействия производных 2,3-дигидроксibenзальдегида с азотсодержащими соединениями – гидразидами и тиосемикарбазидами [4, 5]. Образующиеся гидразоны представляют интерес как средства с потенциальной антимикробной активностью широкого спектра, в частности в отношении *Mycobacterium tuberculosis* – бактерии, вызывающей туберкулез [6].

Ранее нами было установлено, что ионы Mn(II), Fe(II), Co(II), Ni(II), Cu(II), Zn(II) и Ag(I) образуют в растворе с модифицированными лигандами – производными 2,3-дигидроксibenзальдегида – устойчивые металлокомплексы состава M(II) : L = 1 : 2 ( $\lg\beta = 10,4\text{--}15,7$ ) [7]. В данной статье описан метод синтеза и выделения этих металлокомплексов в твердом состоянии и проведена оценка их антиоксидантной и антимикробной активности в целях отбора соединений для дальнейших структурных и биологических исследований.

### МЕТОДИКА ЭКСПЕРИМЕНТА

В качестве лигандов для синтеза металлокомплексов использовали производные 4,6-ди-*трет*-бутил-2,3-дигидроксибензальдегида:  $N^2$ -(4,6-ди-*трет*-бутил-2,3-дигидроксибензилиден)изоникотиногидразид (HL<sup>I</sup>) и 2-(4,6-ди-*трет*-бутил-2,3-дигидроксибензилиден)гидразинкарботиоамид (HL<sup>II</sup>).



Синтез комплексов Mn(II), Fe(II), Co(II), Ni(II), Cu(II) и Zn(II) проводили в атмосфере аргона при температуре 25–30 °С следующим образом: к насыщенному раствору лиганда в метаноле (0,05–0,1 моль/л) постепенно при перемешивании добавляли насыщенный метанольный раствор ацетата металла (0,1–0,2 моль/л) в стехиометрическом соотношении 2 : 1; после перемешивания в течение 30 мин осадок отделяли от раствора на мембранном фильтре (0,2 мкм), промывали охлажденным до 0 °С метанолом, а затем высушивали в течение суток в вакуумном эксикаторе. Если в ходе синтеза не образовывался осадок (например, в случае комплексов Mn(II)), растворитель частично удаляли в ротационном испарителе (40 °С, 10 мм рт. ст.) до образования осадка. Синтез комплексов Ag(I) осуществляли в водно-этанольной смеси (объемное соотношение 1 : 1).

Коэффициент распределения ( $P_{ow}$ ) лигандов и их металлокомплексов оценивали с использованием метода распределения этих веществ в воде и октаноле-1 [8].

Способность соединений восстанавливать феррицитохром *c* (Fe(III)-Cyt *c*) изучали спектрофотометрическим методом, измеряя начальную скорость образования его восстановленной формы. Для исследования использовали насыщенные аргоном растворы лигандов и их металлокомплексов (3,5 ммоль/л) в ацетонитриле и раствор Cyt *c* (7,0 мкмоль/л) в фосфатном буфере (10 ммоль/л, pH 7,4). Реакцию восстановления Fe(III)-Cyt *c* соединениями HL<sup>I</sup>, HL<sup>II</sup> и их металлокомплексами проводили при температуре 20 ± 2 °С. К раствору Fe(III)-Cyt *c* добавляли аликвоты изучаемых соединений до конечной концентрации 35,0 мкмоль/л. Концентрацию образующегося Fe(II)-Cyt *c* определяли при 550 нм на спектрофотометре SOLAR PB2201B с использованием стандартной (1 см) кварцевой кюветы. Начальную скорость восстановления Fe(III)-Cyt *c* оценивали по углу наклона кинетической кривой [9].

Антиоксидантную активность синтезированных соединений определяли путем оценки их способности нейтрализовать супероксид анион-радикал с ис-

пользованием щелочного раствора ДМСО в качестве супероксид-генерирующей системы: 0,1 мл раствора исследуемых образцов в ацетонитриле прибавляли к 0,9 мл раствора 0,02 моль/л фосфатного буфера (рН 8,6), содержащего  $10^{-4}$  моль/л ЭДТА и  $5 \cdot 10^{-4}$  моль/л нитросинеготетразолиевого (НСТ). К полученной смеси прибавляли при перемешивании 1 мл щелочного раствора ДМСО (растворитель, содержащий 1 % воды и  $5 \cdot 10^{-3}$  моль/л гидроксида натрия). После выдерживания раствора 5 мин измеряли оптическую плотность образовавшегося из НСТ синего формазана при 550 нм. Эксперимент проводили при температуре 18–20 °С. В качестве растворов сравнения использовали аналогично приготовленную смесь, не содержащую гидроксида натрия. Контрольный опыт проводили с использованием 0,1 мл ацетонитрила вместо растворов исследуемых соединений [10]. Ингибирующий эффект соединений в отношении восстановления НСТ супероксид анион-радикалом выражали в величинах концентрации полумаксимального ингибирования ( $IC_{50}$ ), найденной путем интерполяции. Величину  $IC_{50}$  определяли как концентрацию соединения, необходимую для ингибирования восстановления НСТ на 50 %.

Антибактериальную (минимальную ингибирующую концентрацию, МИК) и антифунгальную (степень ингибирования радиального роста мицелия,  $RI$ ) активность органических лигандов и их металлокомплексов определяли в соответствии с рекомендациями по определению чувствительности микроорганизмов к химическим соединениям методом серийных разведений в жидких средах [11].

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

В целях сокращения времени синтеза металлокомплексов с производными 4,6-ди-*трет*-бутил-2,3-дигидроксибензальдегида, подавления образования окисленных форм лигандов в качестве побочных продуктов и достижения высокого выхода комплексов (70–90 %) их получали с использованием метанола в качестве растворителя, который обладает следующими препаративными возможностями: 1) способностью растворять как органические лиганды, так и ацетаты Mn(II), Fe(II), Co(II), Ni(II), Cu(II) и Zn(II); 2) невысокой сольватирующей способностью (донорное число  $DN = 19$ ); 3) высокой диэлектрической проницаемостью, способствующей диссоциации соли металла ( $\epsilon = 32,7$ ); 4) низкой температурой кипения ( $t_{\text{кип}} = 64,7$  °С). Выделенные в твердом состоянии продукты представляют собой рентгеноаморфные осадки, практически нерастворимые в воде, мало растворимые в метаноле, этаноле, глицерине и пропиленгликоле, растворимые в ацетоне, ацетонитриле и тетрагидрофуране, легко растворимые в диметилсульфоксиде [12].

Согласно результатам элементного анализа, представленным в табл. 1, комплексы имеют стехиометрический состав с мольным отношением металл : лиганд 1 : 2.

Таблица 1

Результаты элементного анализа металлокомплексов соединений HL<sup>I</sup> и HL<sup>II</sup>

Соединение	Элементное содержание (найдено/вычислено, %)				
	C	H	N	S	M
Mn(L <sup>I</sup> ) <sub>2</sub>	63,56/63,71	6,55/6,62	10,65/10,61	–	6,99/6,94
Fe(L <sup>I</sup> ) <sub>2</sub>	63,49/63,63	6,59/6,61	10,55/10,60	–	6,98/7,04
Co(L <sup>I</sup> ) <sub>2</sub>	63,35/63,39	6,62/6,59	10,51/10,56	–	7,45/7,41
Ni(L <sup>I</sup> ) <sub>2</sub>	63,31/63,41	6,52/6,59	10,51/10,56	–	7,31/7,38
Cu(L <sup>I</sup> ) <sub>2</sub>	63,12/63,02	6,67/6,55	10,52/10,50	–	7,88/7,94
Zn(L <sup>I</sup> ) <sub>2</sub>	62,79/62,88	6,55/6,53	10,55/10,48	–	8,05/8,15
[Ag(HL <sup>I</sup> ) <sub>2</sub> ]NO <sub>3</sub>	55,52/55,46	5,88/5,94	10,71/10,78	–	11,80/11,34
Mn(L <sup>II</sup> ) <sub>2</sub>	55,02/54,92	6,99/6,91	12,03/12,01	9,17/9,16	7,78/7,85
Fe(L <sup>II</sup> ) <sub>2</sub>	54,75/54,85	6,82/6,90	11,92/11,99	9,11/9,15	7,88/7,97
Co(L <sup>II</sup> ) <sub>2</sub>	54,55/54,61	6,82/6,87	11,85/11,94	9,01/9,11	8,45/8,37
Ni(L <sup>II</sup> ) <sub>2</sub>	54,68/54,63	6,79/6,88	11,75/11,94	9,05/9,11	8,45/8,34
Cu(L <sup>II</sup> ) <sub>2</sub>	54,15/54,25	6,81/6,83	11,81/11,86	9,09/9,05	8,89/8,97
Zn(L <sup>II</sup> ) <sub>2</sub>	54,15/54,11	6,75/6,81	11,69/11,83	9,09/9,03	9,26/9,20
[Ag(HL <sup>II</sup> ) <sub>2</sub> ]NO <sub>3</sub>	47,11/47,02	6,01/6,12	11,91/11,99	7,99/7,85	13,12/13,21

Установлено, что синтезированные комплексы характеризуются более высокими величинами коэффициентов распределения ( $\lg P_{ow} = 1,6-3,0$ ) по сравнению с исходными лигандами ( $\lg P_{ow} = 1,3-1,4$ ) и, следовательно, легче проникают через липидный слой мембран и связываются с белками-мишенями.

Согласно данным литературы [13] редокс-взаимодействия фармакологически активных соединений с оксидоредуктазами как макромолекулярными мишенями, а также с различными эндогенными биорадикалами (в частности, активными формами кислорода) могут иметь принципиальное значение для реализации их антимикробной, антиоксидантной и противовоспалительной активности, и, следовательно, тестирование синтезированных соединений на эти виды активности – необходимый этап преформуляционных исследований. Одной из первых мишеней химиотерапевтических агентов на пути в клетку микроорганизмов является цитохром *c* – мезосомальный белок, входящий в их дыхательную цепь. Результаты исследования спектрофотометрическим методом восстановления Fe(III)-*Cyt c* соединениями HL<sup>I</sup> и HL<sup>II</sup> и их металлокомплексами приведены в табл. 2. Установлено, что большинство синтезированных соединений восстанавливают Fe(III)-*Cyt c*. Отметим, что скорость восстановления Fe(III)-*Cyt c* комплексами Ag(I) с ли-

гандами  $HL^I$  и  $HL^{II}$  выше скорости процессов с участием исходных лигандов (см. табл. 2). Усиление восстановительной способности синтезированных комплексов  $Ag(I)$ , согласно [14], может быть связано с образованием комплексов с частичным переносом заряда (валентной изомерией). Низкие скорости восстановления металлокомплексов, образованных лигандом  $HL^I$ , по-видимому, обусловлены их очень низкой растворимостью в воде.

Таблица 2

Скорости восстановления *Cyt c* ( $v$ ) и СОД-активность ( $IC_{50}$ )  
лигандов  $HL^I$ ,  $HL^{II}$  и их металлокомплексов

Соединение	$v$ , нмоль · мин <sup>-1</sup>	$IC_{50}$ , мкмоль/л	Соединение	$v$ , нмоль · мин <sup>-1</sup>	$IC_{50}$ , мкмоль/л
$HL^I$	0,1	6,9	$HL^{II}$	0,3	1,5
$Mn(L^I)_2$	0,4	1,6	$Mn(L^{II})_2$	0,5	2,0
$Fe(L^I)_2$	0,1	3,2	$Fe(L^{II})_2$	0,4	1,1
$Co(L^I)_2$	0,1	10,0	$Co(L^{II})_2$	0,4	5,9
$Ni(L^I)_2$	0,0	7,5	$Ni(L^{II})_2$	0,3	4,6
$Cu(L^I)_2$	0,1	2,2	$Cu(L^{II})_2$	0,0	0,4
$Zn(L^I)_2$	0,0	8,3	$Zn(L^{II})_2$	0,5	16,3
$[Ag(HL^I)_2]NO_3$	0,2	>100	$[Ag(HL^{II})_2]NO_3$	0,5	59,1

Согласно данным литературы [15] соединения  $HL^I$  и  $HL^{II}$  (как индивидуальные, так и в составе комплексов) являются восстановителями и вступают в два последовательных одноэлектронных процесса окисления с образованием производных *орто*-бензохинона через промежуточную стадию образования семихиноновых производных. Этот вывод хорошо согласуется с данными работы [16], в которой показано, что комплексы переходных металлов могут взаимодействовать с  $Fe(III)$ -*Cyt c* как в молекулярной форме, так и посредством участия в редокс-реакции *орто*-изомера лиганда в форме моноаниона, образующегося при диссоциации металлокомплекса.

Способность к нейтрализации супероксид анион-радикала также является важной характеристикой потенциальных редокс-активных антимикробных агентов, так как некоторые бактерии способны его продуцировать. В частности, бактерии рода *Enterococcus* могут избегать действия бактерицидных механизмов за счет собственной способности продуцировать внеклеточный супероксид анион-радикал путем неферментативного восстановления кислорода встроенным в мембрану деметилменахиноном причем количество супероксида достаточно для повреждения ДНК эпителиальных клеток кишечника макроорганизма [17]. Кроме того, для медицинского применения в ряде случаев принципиально проявление антиоксидантных свойств, способствующих ранозаживлению.

Установлено, что синтезированные металлокомплексы проявляют выраженную способность нейтрализовать супероксид анион-радикал *in vitro* ( $IC_{50} = 1,1-16,3$  мкмоль/л, см. табл. 2). Отметим, что для комплексов Ag(I) нехарактерна высокая СОД-активность, возможно, из-за конкурирующего внутримолекулярного взаимодействия между ионами Ag(I) и 1,2-дигидроксибензолным фрагментом лигандов в реакционной среде (ДМСО–вода).

Высокая СОД-активность рассматриваемых металлокомплексов позволяет оценивать их в качестве перспективных антиоксидантов – ловушек супероксида, поскольку  $IC_{50}$  нативной Cu/Zn-СОД составляет 0,1 мкмоль/л.

Первичный фармакологический скрининг синтезированных соединений проведен для оценки их антимикробной активности в отношении тестштаммов грамотрицательных и грамположительных бактерий, плесневых и дрожжевых грибов; полученные результаты приведены в табл. 3–5.

Таблица 3

**МИК (мкмоль/мл) лигандов HL<sup>I</sup>, HL<sup>II</sup> и их металлокомплексов  
в отношении грамотрицательных бактерий**

Соединение	<i>Escherichia coli</i>	<i>Serratia marcescens</i>	<i>Salmonella typhimurium</i>	<i>Pantoea agglomerans</i>	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
HL <sup>I</sup>	>0,271	>0,271	>0,271	>0,271	>0,271
Mn(L <sup>I</sup> ) <sub>2</sub>	>0,126	>0,126	>0,126	>0,126	>0,126
Fe(L <sup>I</sup> ) <sub>2</sub>	>0,126	>0,126	>0,126	>0,126	>0,126
Co(L <sup>I</sup> ) <sub>2</sub>	>0,126	>0,126	>0,126	>0,126	>0,126
Ni(L <sup>I</sup> ) <sub>2</sub>	>0,126	>0,126	>0,126	>0,126	0,063
Cu(L <sup>I</sup> ) <sub>2</sub>	>0,125	>0,125	>0,125	>0,125	>0,125
Zn(L <sup>I</sup> ) <sub>2</sub>	>0,125	>0,125	>0,125	>0,125	>0,125
[Ag(HL <sup>I</sup> ) <sub>2</sub> ] <sub>2</sub> NO <sub>3</sub>	<0,007	<0,007	<0,007	<0,007	<0,007
HL <sup>II</sup>	>0,310	>0,310	>0,310	>0,310	>0,310
Mn(L <sup>II</sup> ) <sub>2</sub>	>0,143	>0,143	>0,143	>0,143	>0,143
Fe(L <sup>II</sup> ) <sub>2</sub>	>0,143	>0,143	>0,143	>0,143	>0,143
Co(L <sup>II</sup> ) <sub>2</sub>	>0,142	>0,142	>0,142	>0,142	>0,142
Ni(L <sup>II</sup> ) <sub>2</sub>	>0,142	>0,142	>0,142	>0,142	>0,142
Cu(L <sup>II</sup> ) <sub>2</sub>	>0,141	>0,141	>0,141	>0,141	>0,141
Zn(L <sup>II</sup> ) <sub>2</sub>	>0,141	>0,141	>0,141	>0,141	>0,141
[Ag(HL <sup>II</sup> ) <sub>2</sub> ] <sub>2</sub> NO <sub>3</sub>	>0,123	>0,123	>0,123	>0,123	>0,123
Стрептомицин	0,005	0,011	0,021	0,021	0,172
Тетрациклин	0,007	–	0,014	0,007	0,056
Хлорамфеникол	0,019	–	0,019	0,019	0,039

Таблица 4

**МИК (мкмоль/мл) лигандов HL<sup>I</sup>, HL<sup>II</sup> и их металлокомплексов  
в отношении грамположительных бактерий**

Соединение	<i>Staphylococcus aureus</i>	<i>Staphylococcus saprophyticus</i>	<i>Bacillus subtilis</i>	<i>Sarcina lutea</i>	<i>Mycobacterium smegmatis</i>
HL <sup>I</sup>	>0,271	>0,271	0,034	0,034	0,034
Mn(L <sup>I</sup> ) <sub>2</sub>	>0,126	>0,126	<0,008	>0,126	<0,008
Fe(L <sup>I</sup> ) <sub>2</sub>	>0,126	>0,126	>0,126	<0,008	>0,126
Co(L <sup>I</sup> ) <sub>2</sub>	>0,126	>0,126	>0,126	>0,126	>0,126
Ni(L <sup>I</sup> ) <sub>2</sub>	>0,126	>0,126	0,063	0,063	<0,008
Cu(L <sup>I</sup> ) <sub>2</sub>	>0,125	>0,125	>0,125	>0,125	>0,125
Zn(L <sup>I</sup> ) <sub>2</sub>	>0,125	>0,125	0,016	<0,008	<0,008
[Ag(HL <sup>I</sup> ) <sub>2</sub> ]NO <sub>3</sub>	<0,007	<0,007	<0,007	<0,007	<0,007
HL <sup>II</sup>	>0,310	>0,310	0,039	0,039	>0,310
Mn(L <sup>II</sup> ) <sub>2</sub>	>0,143	>0,143	0,018	>0,143	0,072
Fe(L <sup>II</sup> ) <sub>2</sub>	>0,143	>0,143	<0,009	0,018	>0,143
Co(L <sup>II</sup> ) <sub>2</sub>	>0,142	>0,142	0,018	0,071	>0,142
Ni(L <sup>II</sup> ) <sub>2</sub>	>0,142	0,018	<0,009	<0,009	>0,142
Cu(L <sup>II</sup> ) <sub>2</sub>	>0,141	>0,141	<0,009	<0,009	>0,141
Zn(L <sup>II</sup> ) <sub>2</sub>	>0,141	>0,141	<0,009	<0,009	>0,141
[Ag(HL <sup>II</sup> ) <sub>2</sub> ]NO <sub>3</sub>	0,031	0,031	0,031	0,031	>0,123
Стрептомицин	0,011	0,011	0,011	0,021	0,011
Тетрациклин	0,007	0,007	0,014	0,014	—
Хлорамфеникол	0,019	0,019	0,009	—	0,039
Изониазид	—	—	—	—	0,009

Таблица 5

**Степень ингибирования радиального роста культуры грибов (RI, %) лигандами HL<sup>I</sup>, HL<sup>II</sup> и их металлокомплексами**

Соединение	<i>Alternaria alternata</i>	<i>Aspergillus niger</i>	<i>Penicillium lividum</i>	<i>Mucor spp.</i>	<i>Candida spp.</i>
HL <sup>I</sup>	100	90	100	75	100
Mn(L <sup>I</sup> ) <sub>2</sub>	60	35	20	15	80
Fe(L <sup>I</sup> ) <sub>2</sub>	100	85	55	100	80
Co(L <sup>I</sup> ) <sub>2</sub>	0	0	0	0	0

Окончание табл. 5

Соединение	<i>Alternaria alternata</i>	<i>Aspergillus niger</i>	<i>Penicillium lividum</i>	<i>Mucor spp.</i>	<i>Candida spp.</i>
Ni(L <sup>I</sup> ) <sub>2</sub>	100	80	80	40	90
Cu(L <sup>I</sup> ) <sub>2</sub>	100	80	60	40	40
Zn(L <sup>I</sup> ) <sub>2</sub>	100	90	70	40	100
[Ag(HL <sup>I</sup> ) <sub>2</sub> ]NO <sub>3</sub>	100	90	100	100	100
HL <sup>II</sup>	100	80	50	90	100
Mn(L <sup>II</sup> ) <sub>2</sub>	100	20	20	0	30
Fe(L <sup>II</sup> ) <sub>2</sub>	100	60	25	0	30
Co(L <sup>II</sup> ) <sub>2</sub>	10	60	10	10	30
Ni(L <sup>II</sup> ) <sub>2</sub>	100	55	25	0	80
Cu(L <sup>II</sup> ) <sub>2</sub>	10	10	0	15	20
Zn(L <sup>II</sup> ) <sub>2</sub>	100	60	30	0	80
[Ag(HL <sup>II</sup> ) <sub>2</sub> ]NO <sub>3</sub>	40	20	10	0	40
Нистатин	50	90	70	70	100
Тербинафин	50	80	40	25	100
Амфотерицин Б	45	90	90	40	100

Согласно данным микробиологического исследования, комплексы Mn(II), Fe(II), Co(II), Ni(II), Cu(II) и Zn(II) с лигандами HL<sup>I</sup> и HL<sup>II</sup> имеют невысокую активность в отношении грамотрицательных бактерий (см. табл. 3). Однако большинство синтезированных металлокомплексов проявляют *in vitro* высокую или умеренную активность в отношении тест-культур грамположительных бактерий (*B. subtilis*, *S. lutea*, *M. smegmatis*, МИК = 0,007–0,071 мкмоль/мл), превосходящую активность исходных лигандов и стандартных антибиотиков (см. табл. 4).

Отметим, что комплексы Mn(II), Ni(II), Zn(II) и Ag(I) с лигандом HL<sup>I</sup>, имеющим структурное сходство с противотуберкулезным средством изониазидом, активно подавляют рост микобактерий (МИК = 0,007–0,008 мкмоль/мл, см. табл. 4). Кроме того, комплексы Fe(L<sup>I</sup>)<sub>2</sub>, Ni(L<sup>I</sup>)<sub>2</sub>, Zn(L<sup>I</sup>)<sub>2</sub> и [Ag(HL<sup>I</sup>)<sub>2</sub>]NO<sub>3</sub> проявляют высокую антифунгальную активность (см. табл. 5), сопоставимую с активностью антифунгальных средств (нистатина, амфотерицина В и тербинафина).

Среди синтезированных соединений наиболее высокий уровень и широкий спектр антимикробной активности демонстрирует комплекс [Ag(HL<sup>I</sup>)<sub>2</sub>]NO<sub>3</sub>: МИК = 0,007 мкмоль/мл и *RI* = 90–100 % (см. табл. 3–5), что дает основание

выбрать его в качестве базовой структуры (соединения-лидера) для следующего этапа модифицирования структуры лигандов – производных 4,6-ди-*трет*-бутил-2,3-дигидроксibenзальдегида, синтеза их комплексов и проведения структурного и преформуляционного исследования новых удачных образцов.

## ВЫВОДЫ

1. Разработан метод синтеза комплексов Mn(II), Fe(II), Co(II), Ni(II), Cu(II), Zn(II), Ag(I) с производными 4,6-ди-*трет*-бутил-2,3-дигидроксibenзальдегида с выходом продукта 70–90 %.

2. Металлокомплексы являются рентгеноаморфными, имеют состав с мольным отношением металл : лиганд = 1 : 2 и характеризуются более высокой липофильностью ( $\lg P_{ow} = 1,6-3,0$ ) по сравнению с исходными лигандами.

3. Металлокомплексы способны нейтрализовать супероксид анион-радикал *in vitro* ( $IC_{50} = 1,1-16,3$  мкмоль/л).

4. Комплексы  $Mn(L^I)_2$ ,  $[Ag(HL^I)_2]NO_3$ ,  $Mn(L^{II})_2$ ,  $Fe(L^{II})_2$ ,  $Co(L^{II})_2$ ,  $Ni(L^{II})_2$ ,  $Zn(L^{II})_2$ ,  $[Ag(HL^{II})_2]NO_3$  восстанавливают Fe(III)-Cyt c ( $v = 0,2-0,5$  нмоль · мин<sup>-1</sup>).

5. Металлокомплексы проявляют высокую и умеренную активность *in vitro* в отношении грамположительных бактерий *B. subtilis*, *S. lutea*, *M. smegmatis* (МИК = 0,007–0,071 мкмоль/мл), дрожжевых и плесневых грибов *A. alternata*, *A. niger*, *Candida spp.* ( $RI = 80-100$  %); среди них для дальнейшей фармацевтической разработки в качестве базовой структуры (соединения-лидера) выбран комплекс  $[Ag(HL^I)_2]NO_3$ .

## БИБЛИОГРАФИЧЕСКИЕ ССЫЛКИ

1. Metallotherapeutic Drugs and Metal-Based Diagnostic Agents. The Use of Metals in Medicine / ed. by M. Gielen, E. R. T. Tiekink. Weinheim : Wiley-VCH, 2005.

2. Raman N., Muthuraj V., Ravichandran S. [et al.] // Proc. Indian Acad. Sci. (Chem. Sci.). 2003. Vol. 115, № 3. P. 161–167.

3. Shadyro O. I., Edimecheva I. P., Glushonok G. K. [et al.]. Effects of phenolic compounds on reactions involving various organic radicals // Free Radical Res. 2003. Vol. 37, № 10. P. 1087–1097.

4. Loginova N. V., Polozov G. I., Koval'chuk T. V. [et al.]. Pharmacologically active benzene derivatives: Synthesis, complexation with biometals, and biological evaluation of sterically hindered 1,2-dihydroxybenzene and o-aminophenol derivatives / ed. by G. Tranfo, Benzene and its derivatives: New uses and impacts on environment and human health. Hauppauge, New York : Nova Science Publisher's. 2012. P. 23–68.

5. Loginova N. V., Koval'chuk T. V., Gres A. T. [et al.]. Redox-active metal complexes of sterically hindered phenolic ligands: Antibacterial activity and reduction of cytochrome c. Part IV. Silver(I) complexes with hydrazone and thiosemicarbazone derivatives of 4,6-di-*tert*-butyl-2,3-dihydroxybenzaldehyde // Polyhedron. 2015. № 88. P. 125–137.

6. Torres E., Moreno E. Ancizu S. [et al.]. New 1,4-di-*N*-oxide-quinoxaline-2-yl-methylene isonicotinic acid hydrazide derivatives as anti-*Mycobacterium tuberculosis* agents // Bioorg. Med. Chem. Lett. 2011. Vol. 21. P. 3699–3703.

7. Горбацевич Г. И., Ковальчук Т. В., Петрашевская Т. В. [и др.]. Комплексообразование ионов Mn(II), Fe(II), Co(II), Ni(II), Cu(II) и Zn(II) с пространственно экранированными производными 4,6-ди-трет-бутил-2,3-дигидроксибензальдегида // Вестн. БГУ. 2014. Сер. 2, № 2. С. 11–14.

8. Leo A., Hansch C., Elkins D. Partition coefficients and their uses // Chem. Rev. 1971. Vol. 71, № 6. P. 525–616.

9. Rahman N., Ahmad Y., Azmi S. N. H. Kinetic spectrophotometric method for the determination of ramipril in pharmaceutical formulations // AAPS PharmSciTech. 2005. Vol. 6. P. 543–551.

10. Hyland K., Voisin E., Banoun H. [et al.]. Superoxide dismutase assay using alkaline dimethylsulfoxide as superoxide anion-generating system // Anal. Biochem. 1983. Vol. 135, № 2, P. 280–287.

11. Определение чувствительности микроорганизмов к антибактериальным препаратам: методические указания. М. : Федеральный центр госсанэпиднадзора Минздрава России. 2004.

12. Общие сведения. Растворимость // Государственная фармакопея Республики Беларусь II. Т. 1 : Общие методы контроля лекарственных средств / М-во здравоохран. Респ. Беларусь, УП «Центр экспертиз и испытаний в здравоохранении» ; под общ. ред. А. А. Шерякова. Молодечно : Тип. «Победа», 2012. С. 21–22.

13. Kappus H. Overview of enzyme systems involved in bio-reduction of drugs and in redox cycling // Biochemical Pharmacology. 1986. Vol. 35, № 1. P. 1–6.

14. Горбацевич Г. И., Логинова Н. В., Ковальчук Т. В. [и др.]. Синтез наночастиц серебра разложением комплекса серебра с эффектом валентного таутомеризма и их свойства // Журн. прикл. спектроскопии. 2017. Т. 84, № 1. С. 19–25.

15. Loginova N., Chernyavskaya A., Polozov G. [et al.]. Bioactive silver(I) complexes with phenolic derivatives of thioglycolic and thiopropionic acids // Mini-Rev. Org. Chem. 2013. Vol. 10. P. 227–240.

16. Saleem M. M. M., Wilson M. T. Kinetic studies on the reduction of cytochrome c. Reaction with dihydroxy conjugated compounds (catechols and quinols) // Biochem. J. 1982. Vol. 201, № 3. P. 433–444.

17. Wang X., Huycke M. M. Extracellular superoxide production by *Enterococcus faecalis* promotes chromosomal instability in mammalian cells // Gastroenterology. 2007. Vol. 132, № 2. P. 551–561.

Поступила в редакцию 15.03.2018