

АНТИФУНГАЛЬНАЯ АКТИВНОСТЬ КОМПЛЕКСОВ МЕДИ(II) И ЦИНКА(II) С ОСНОВАНИЯМИ МАННИХА

Горбачевич Г.И., Петрашевская Т.В.*, Логинова Н.В.*

*Белорусский государственный медицинский университет,
кафедра фармацевтической технологии и химии, г. Минск*

**Белорусский государственный университет, кафедра неорганической химии,
г. Минск*

Ключевые слова: медь, цинк, основания Манниха, антифунгальная активность.

Резюме: синтезированы комплексы $Cu(II)$ и $Zn(II)$ с основаниями Манниха, установлены их физико-химические свойства, определена антифунгальная активность лигандов и комплексов, изучена *in vitro* кинетика их взаимодействия с цитохромом *c*.

Resume: $Cu(II)$ and $Zn(II)$ complexes with Mannich bases have been synthesized and characterized, antifungal activity of these compounds has been determined, their kinetics of cytochrome *c* reduction have been estimated *in vitro*.

Актуальность. В последние годы наблюдается стремительное распространение грибковых и бактериальных инфекций, которые встречаются наиболее часто у иммунокомпрометированных пациентов. К основным лекарственным средствам для борьбы с грибковыми инфекциями относятся два класса соединений: полиены и

азолы [1, 2]. Однако они малоэффективны в отношении многих культур плесневых грибов (*Fusarium spp.*, *Mucor spp.*, *Alternaria spp.* и др.) [3]. С целью решения этой проблемы осуществляется модернизация уже известных лекарственных средств и разработка новых субстанций, среди которых перспективными объектами являются металлокомплексы с биоактивными органическими лигандами, в частности редокс-активными производными дигидроксибензола.

Цель данной работы – изучить антифунгальную активность комплексов Cu(II) и Zn(II) в зависимости от модификации структуры их лигандов.

Для выполнения поставленной цели были решены следующие **задачи**: 1) синтез комплексов Cu(II) и Zn(II), установление их строения и определение физико-химических свойств, необходимых для фармацевтической разработки субстанций, 2) проведение первичного фармакологического скрининга соединений для оценки их антифунгальной активности и выбора базовых структур, 3) изучение скорости восстановления этими соединениями цитохрома *c* (одной из возможных биомишеней).

В качестве **объектов** исследования были выбраны комплексы Cu(II) и Zn(II) с основаниями Манниха – новым классом биологически активных соединений [4]. Антифунгальная активность соединений Cu(II) давно известна: они широко используются в сельском хозяйстве для борьбы с грибковыми болезнями растений (фитофтороз, пероноспороз и др.). Также известно, что в присутствии ионов Cu(II) некоторые фенольные соединения могут повреждать цитоплазматическую мембрану, что связывают с их антимикробным действием [5]. Сведения о практическом использовании в фармакологии комплексов Zn(II) с органическими лигандами относятся к небольшому числу соединений, в частности комплексам с пиритионом, фенотиразином и др., но их поиск и изучение перспектив использования в медицине осуществляется достаточно активно [6]. Согласно данным литературы, комплексы Zn(II) проявляют противовоспалительную, противовирусную, иммуностимулирующую, антипролиферативную, антимикробную, антиконвульсионную активность, а также способны повышать активность некоторых лекарственных веществ за счет комплексообразования [7].

Материал и методы: потенциометрическое титрование, элементный анализ, кондуктометрия, термогравиметрический анализ, ИК-спектроскопия, оптическая спектроскопия, ЭПР-спектроскопия, микробиологические испытания.

Результаты и их обсуждение. Нами синтезированы и изучены комплексы Cu(II) и Zn(II) с 2-тетрагидро-1H-1-пирролилметил-4,6-ди-*трет*-бутил-1,3-дигидроксибензолом (HL^I), 2-пиперидинометил-4,6-ди-*трет*-бутил-1,3-дигидроксибензолом (HL^{II}), 2-(1-азепанилметил)-4,6-ди-*трет*-бутил-1,3-дигидроксибензолом (HL^{III}), 2-морфолинометил-4,6-ди-*трет*-бутил-1,3-дигидроксибензолом (HL^{IV}), 2-(4-метилпиперазинометил)-4,6-ди-*трет*-бутил-1,3-дигидроксибензолом (HL^V).

Методом потенциометрического титрования установлено, что в водно-этанольной среде образуются комплексы Cu(II) и Zn(II) с мольным отношением ион металла : лиганд=1:2 и общими константами устойчивости $\beta_2 = 1 \cdot 10^{14} \div 9 \cdot 10^{19}$. По результатам элементного анализа, кондуктометрии, термогравиметрии, а также ИК-,

УФ- и ЭПР-спектроскопии определены стехиометрический состав комплексов и, а также состав $[MN_2O_2]$ ($M=Cu(II), Zn(II)$) и структура их координационных узлов (плоскоквадратная для CuL_2 и искаженная тетраэдрическая для ZnL_2) (рис. 1).

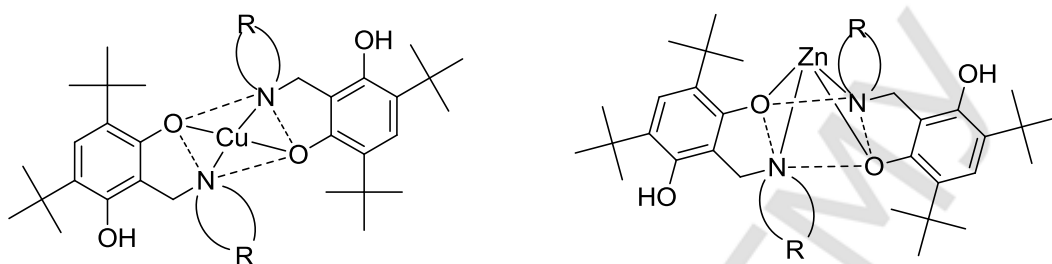


Рис. 1 - Схематическое изображение структуры комплексов Cu(II) и Zn(II)

Результаты первичного фармакологического скрининга (таблица 1) показали, что соединения HL^I-HL^V обладают низкой активностью, в то время как активность металлокомплексов имеет более высокие значения ($RI \geq 80\%$, где RI – степень ингибирования радиального роста мицелия). Среди синтезированных соединений следует выделить в качестве базовых структур все комплексы Zn(II) ($RI=100\%$), активность которых в отношении *Aspergillus niger*, *Fusarium spp.*, *Mucor spp.*, *Penicillium lividum*, *Sclerotinia sclerotiorum* и *Alternaria alternata* существенно превышает антифунгальный эффект антибиотиков нистатина и тербинафина.

Таблица 1 – Степень ингибирования радиального роста культуры грибов (RI , %) соединениями HL^I-HL^V и их комплексами Cu(II) и Zn(II)

Соединение	<i>Aspergillus niger</i>	<i>Fusarium spp.</i>	<i>Mucor spp.</i>	<i>Penicillium lividum</i>	<i>Sclerotinia sclerotiorum</i>	<i>Alternaria alternata</i>
HL^I	40	50	50	40	20	50
$Cu(L^I)_2$	100	90	80	80	100	100
$Zn(L^I)_2$	100	100	100	100	100	100
HL^{II}	30	0	10	10	20	0
$Cu(L^{II})_2$	90	90	80	80	100	80
$Zn(L^{II})_2$	100	100	100	100	100	100
HL^{III}	25	20	20	10	30	25
$Cu(L^{III})_2$	80	80	80	80	100	100
$Zn(L^{III})_2$	100	100	100	100	100	100
HL^{IV}	25	20	20	10	40	50
$Cu(L^{IV})_2$	100	90	80	100	100	80
$Zn(L^{IV})_2$	100	100	100	100	100	100
HL^V	30	40	40	20	40	50
$Cu(L^V)_2$	100	100	90	90	100	90
$Zn(L^V)_2$	100	100	100	100	100	100
$Cu(CH_3COO)_2$	0	0	0	0	0	0
$Zn(CH_3COO)_2$	0	0	0	0	0	0
Нистатин	80	90	100	90	50	50
Тербинафин	100	80	25	40	40	60

Ранее нами была установлена корреляция последовательностей величин RI и скоростей восстановления цитохрома c в рядах однотипных соединений – *o*-

дифенольных производных оснований Манниха и соответствующих металлокомплексов [8], которая может быть обусловлена общим механизмом восстановления фермента их редокс-активными формами, при котором в анаэробных условиях происходит двухстадийное одноэлектронное окисление вышеупомянутых соединений: фенолят переходит в бензохинон через промежуточное образование бензосемихинона [9].

Однако для *m*-дифенольных производных оснований Манниха HL^I-HL^V и их комплексов $Cu(II)$ и $Zn(II)$ вышеуказанная зависимость не выявлена (таблица 2), что свидетельствует об ином механизме восстановления фермента. Особо следует отметить очень низкие величины скорости восстановления цитохрома *c* комплексами $Zn(L^{IV})_2$ и $Zn(L^V)_2$ или отсутствие восстановления цитохрома *c* соединениями HL^{II} , HL^{III} , HL^V , $Zn(L^{II})_2$, $Zn(L^{III})_2$ и $Zn(L^{IV})_2$. Это может быть связано с тем, что металлокомплексы, подобно СОД, нейтрализуют анион-радикал, образующийся в качестве промежуточного продукта при окислении комплекса цитохромом *c*. Таким образом, из-за конкурирующей реакции скорость восстановления цитохрома *c* существенно снижается [10]. Для выяснения механизма восстановления цитохрома *c* соединениями HL^I-HL^V и их металлокомплексами необходимы дальнейшие исследования.

Таблица 2 – Скорости восстановления цитохрома *c* соединениями HL^I-HL^V и их комплексами $Cu(II)$ и $Zn(II)$.

Соединение	ν , нмоль \times мин $^{-1}$	Соединение	ν , нмоль \times мин $^{-1}$	Соединение	ν , нмоль \times мин $^{-1}$
HL^I	0,3	$Cu(L^I)_2$	0,3	$Zn(L^I)_2$	0,9
HL^{II}	0,0	$Cu(L^{II})_2$	0,3	$Zn(L^{II})_2$	0,0
HL^{III}	0,0	$Cu(L^{III})_2$	0,3	$Zn(L^{III})_2$	0,0
HL^{IV}	1,4	$Cu(L^{IV})_2$	0,5	$Zn(L^{IV})_2$	0,0
HL^V	0,0	$Cu(L^V)_2$	0,7	$Zn(L^V)_2$	0,2

Абсолютная погрешность определения ν составляет 0,1 нмоль \times мин $^{-1}$

Выводы:

1. Изучено комплексообразование оснований Манниха HL^I-HL^V с ионами $Cu(II)$ и $Zn(II)$ в растворе методом потенциометрии; на основании полученных данных рассчитаны константы устойчивости комплексов ($\beta_2 = 1 \cdot 10^{14} \div 9 \cdot 10^{19}$) и молярное отношение ион металла : лиганд (1:2) в комплексах. Показано, что моноядерные координационные полиэдры комплексов $Cu(II)$ (плоскоквадратные) и $Zn(II)$ (искаженные тетраэдрические) образуются двумя бидентатными лигандами в моноанионной форме.

2. Определены базовые структуры ($Zn(L^I)_2$, $Zn(L^{II})_2$, $Zn(L^{III})_2$, $Zn(L^{IV})_2$, $Zn(L^V)_2$ и $Cu(L^V)_2$), которые характеризуются наиболее высокой антифунгальной активностью ($RI \sim 100\%$) в отношении *Aspergillus niger*, *Fusarium spp.*, *Mucor spp.*, *Penicillium lividum*, *Sclerotinia sclerotiorum* и *Alternaria alternata*, которая превышает активность нистатина и тербинафина.

3. Установлено, что соединения HL^I , HL^{IV} , $Cu(L^I)_2 - Cu(L^V)_2$, $Zn(L^I)_2$ и $Zn(L^V)_2$ способны восстанавливать цитохром *c*.

Литература

1. Abu-Salah K. M. // *British J. Biomed. Sci.* – 1996. –Vol. 53. –P.122
2. Hay R.J. // *Antimicrob. Chemother.*–1987. –Vol.20. –P. 1
3. Singh N. // *Clin. Infect. Dis.* –2001. –Vol. 33. –P.1692
4. N.V. Loginova et al. In: G. Tranfo (Ed.), *Benzene and its derivatives: New uses and impacts on environment and human health*; Nova Science Publisher's Hauppauge, New York. –2012. –P. 23.
5. N. Yamashita, H. Tanemura, S. Kawanishi // *Mutat. Res.*, 1999. Vol. 425. P. 107.
6. *Metallotherapeutic drugs and metal-based diagnostic agents. The Use of Metals in Medicine* / eds. M. Gielen, E.R.T. Tiekink. – Weinheim: Wiley-VCH, 2005. –598 p.
7. F. Gao // *J. Inorg. Biochem.* – 1995. –Vol. 60. – P. 61–67.
8. N.V. Loginova et al. // *Polyhedron.* – 2013. – Vol. 57 – P. 39–46.
9. N.V. Loginova et al. In: R. Thom (Ed.), *Cytochromes b and c: Biochemical Properties, Biological Functions and Electrochemical Analysis*; Nova Science Publisher's, Hauppauge. New York. –2013. – P. 125.
10. *Enzymatic Assay of Superoxide Dismutase [Electronic Resource]* / Sigma Aldrich, 2014. – Mode of access <http://www.sigmaaldrich.com/technical-documents/protocols/biology/enzymatic-assay-of-superoxide-dismutase.html>. – Date of Access 02.06.2014.