

ПРОГНОЗ, АНТИОКСИДАНТНАЯ АКТИВНОСТЬ IN SILICO И СИНТЕЗ ПРОИЗВОДНЫХ 2,6-ДИ-ТРЕТ-БУТИЛ-4-[2-(R)-3Н-БЕНЗИМИДАЗОЛ-1-ИЛ]-ФЕНОЛА© Цакулова Т.В.^{1, 2}, Кодониди И.П.², Чиряпкин А.С.²¹ **Северо-Осетинская государственная медицинская академия (СОГМА)**

Россия, 362019, Республика Северная Осетия-Алания, г. Владикавказ, ул. Пушкинская, д. 40

² **Пятигорский медико-фармацевтический институт – филиал Волгоградского государственного медицинского университета (ПМФИ – филиал ВолгГМУ)**

Россия, 357732, Ставропольский край, г. Пятигорск, пр-т Калинина, д. 11

В рамках исследования был разработан метод синтеза новых производных бензимидазола, модифицированных фрагментом пространственно-затрудненного фенола. Ключевой стадией синтеза явилась реакция конденсации 2,6-ди-трет-бутил-п-бензохинонимина с рядом ароматических и алифатических альдегидов, позволившая получить целевые соединения – 2,6-ди-трет-бутил-4-[2-(R)-3Н-бензимидазол-1-ил]-фенолы. Идентификация и подтверждение структуры синтезированных веществ выполнены с помощью комплекса физико-химических методов, включая элементный анализ, ИК- и ¹H-ЯМР-спектроскопию. Проведенная оценка антиоксидантных свойств *in vitro* показала, что ряд полученных соединений обладает выраженной активностью, причем некоторые из них продемонстрировали более высокую эффективность по сравнению с референтными веществами – убихиноном и дибунолом.

Цель исследования – целенаправленный синтез ряда производных 2,6-ди-трет-бутил-4-[2-(R)-3Н-бензимидазол-1-ил]-фенола с применением усовершенствованной методики и последующая комплексная оценка их антиоксидантного потенциала.

Материалы и методы. Синтез гибридных структур на основе бензимидазола и экранированного фенола осуществляли по модифицированной методике, основанной на классических подходах органического синтеза. Установление структуры и подтверждение идентичности всех целевых соединений проводили с привлечением комплекса аналитических методов, включая ИК-спектроскопию, ЯМР ¹H-спектроскопию и элементный анализ. Исследование антиоксидантной активности синтезированных образцов проводили в модельной системе на основе кукурузного масла, богатого комплексом насыщенных и ненасыщенных жирных кислот. Пероксидное окисление липидов (ПОЛ) в данной системе индуцировали как физическим (УФ-облучение), так и химическим способом, используя в качестве продуцента свободных радикалов систему Фентона (H₂O₂/Fe²⁺). Для сравнительного анализа в идентичных условиях была изучена антирадикальная активность референтных соединений – убихинона и бутилированного гидрокситолуола. Последний является действующим веществом препарата дибунол и представляет собой классический пример экранированного фенола.

Результаты. Проведено исследование антиоксидантных свойств *in vitro* для синтезированных производных бензимидазола, модифицированных введением пространственно-затрудненного фенольного фрагмента. Результаты свидетельствуют о значительном антиоксидантном эффекте, превышающем таковой для референтных соединений (убихинона и дибунола). Выделен ряд соединений-лидеров с максимальной активностью.

Заключение. Перспективность 2,6-ди-трет-бутил-4-[2-(R)-3Н-бензимидазол-1-ил]-фенолов обусловлена их выраженной антиоксидантной активностью, что открывает возможности для изучения целого ряда опосредованных ею фармакологических эффектов.

Ключевые слова: 2,6-ди-трет-бутил-4-[2-(R)-3Н-бензимидазол-1-ил]-фенолы; бензимидазолы; пространственно-затрудненные фенолы; моделирование *in silico*; антиоксидантная активность; активные формы кислорода (АФК); перекисное окисление липидов (ПОЛ); PASS Online.

Цакулова Тамара Владимировна – ст. преподаватель кафедры фармации, СОГМА, г. Владикавказ; соискатель кафедры фармацевтической химии, ПМФИ – филиал ФГБОУ ВО ВолгГМУ, г. Пятигорск. ORCID iD: 0009-0004-9358-6772. E-mail: tsakulova7@mail.ru (автор, ответственный за переписку).

Кодониди Иван Панайотович – д-р фарм. наук, профессор, зав. кафедрой фармацевтической химии, ПМФИ – филиал ФГБОУ ВО ВолгГМУ, г. Пятигорск. ORCID iD: 0000-0003-1333-3472. E-mail: kodonidiip@mail.ru

Чиряпкин Алексей Сергеевич – канд. фарм. наук, ст. преподаватель кафедры фармацевтической химии, ПМФИ – филиал ФГБОУ ВО ВолгГМУ, г. Пятигорск. ORCID iD: 0000-0001-8207-2953. E-mail: alexey.chiriapkin@yandex.ru

Окислительный стресс, вызывающий дисбаланс в редокс-системе организма между генерацией активных форм кислорода (АФК) и работой антиоксидантной защиты, лежит в основе патогенеза целого ряда социально значимых заболеваний. Среди них – сердечно-сосудистые и нейродегенеративные патологии, диабет, онко-

логические и хронические воспалительные процессы [1-3].

В последние десятилетия активно исследуемой областью в фармацевтической химии становится целенаправленный дизайн, создание новых низкотоксичных, высокоэффективных «гибридных» антиоксидантных средств, а также выявление закономерности взаимосвязи «струк-

тура-активность». В данном поиске особую нишу занимают бензимидазолы, модифицированные фрагментом пространственно-затрудненного фенола, поскольку такой подход приводит к синергизму фармакологического потенциала бензимидазольного ядра с мощной и стабильной антиоксидантной активностью экранированного фенола. С одной стороны, ядро бензимидазола предоставляет удобную платформу для химической модификации, что ярко проявлено среди его противоопухолевых производных, которые могут индуцировать окислительный стресс в раковых клетках, как часть механизма действия, что приводит к его окислительной модификации или деградации (особенно в условиях окислительного стресса) [4, 5]. С другой стороны, ключевая роль фрагмента пространственно-затрудненного фенола состоит в образовании стабильных феноксильных радикалов и хелатировании ионов переходных металлов (Fe, Cu), катализирующих образование самых опасных АФК.

Цель исследования – поиск малотоксичных и безопасных веществ среди комбинированных дериватов бензимидазола и экранированного фенола, прогнозирование *in silico* соединений с оптимальными фармакометрическими параметрами, изучение антиоксидантной активности *in vitro* и установление количественных зависимостей «структура-активность».

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Проектирование и виртуальный скрининг соединений – производных бензимидазола, содержащих фрагмент экранированного фенола, включало несколько этапов. Структурные формулы целевых соединений были построены с использованием программного пакета BIOVIADraw 17.2. Для прогнозирования потенциальной фармакологической активности созданных структур был проведен виртуальный скрининг с помощью веб-ресурса PASS Online [6]. В результате был получен перечень видов биологической активности для каждого соединения с оценкой вероятности их проявления (Pa). Молекулярное моделирование и подготовка структур на следующем этапе состояло в создании трехмерных молекулярных моделей спроектированных соединений и их геометрическая оптимизация. Эта процедура была выполнена в программе HyperChem 8.0.4 с применением квантово-химического метода Ab Initio в комбинации с базовым набором STO-3G [7], что позволило получить энергетически наиболее выгодную конформацию молекул. Для проведения молекулярного докинга оптимизированные структуры бы-

ли конвертированы из формата *hin* в формат *pdb* с помощью программного обеспечения Open Babel 2.4.1 [8]. Синтезированные целевые соединения были охарактеризованы стандартным набором физико-химических методов. Температуру плавления определяли на приборе ПТП (М) ТУ 92–891. ИК-Фурье-спектры регистрировали на спектрометре ФСМ 1201; образцы для измерения готовили в виде таблеток с безводным бромидом калия. Протонные ЯМР-спектры (¹H-ЯМР) снимали на спектрометре Bruker с рабочей частотой 400 МГц. Для этого соединения растворяли в дейтерированных растворителях (DMSO-d₆ или CDCl₃), внутренним стандартом в которых выступал сигнал самого растворителя.

Общая методика получения производных 2,6-ди-трет-бутил-4-[2-(R)-3H-бензимидазол-1-ил]-фенола 3a-r

Получение исходного субстрата 2,6-ди-трет-бутил-п-бензохинонимина. Исходный 2,6-ди-трет-бутил-п-бензохинонимин синтезировали по модифицированной методике [9]. Для этого смесь о-фенилендиамина (0.04 моль) и 2,6-ди-трет-бутил-п-бензохинона (0.08 моль) в 30 мл пропилового спирта нагревали с обратным холодильником в режиме кипения в течение 4 часов. По завершении реакции полученную смесь охлаждали до комнатной температуры и переливали в 100 мл холодной воды. Выпавший осадок фиолетового цвета отфильтровывали, тщательно промывали водой (50 мл) и высушивали. Выход продукта составил 90%. Продукт представляет собой фиолетовый кристаллический порошок с температурой плавления 136–137°C (после перекристаллизации из изопропанола).

Синтез конечных продуктов 2,6-ди-трет-бутил-4-[2-(R)-3H-бензимидазол-1-ил]-фенола 3a-r. В колбе для синтеза смешивали 2,6-ди-трет-бутил-п-бензохинонимин (0.01 моль) и эквивалентное количество (0.01 моль) соответствующего ароматического альдегида. Реакционную массу постепенно нагревали до 140°C до образования расплава, после чего температуру повысили до 190°C. Смесь выдерживали при данной температуре в течение 2 часов в условиях постоянного механического перемешивания, плавно повышая температуру до 200°C к концу реакции. По истечении указанного времени реакционную массу охладили до 120°C и для экстракции продукта добавили 20 мл безводного толуола. Смесь нагревали при перемешивании до полного перевода реакционного плава в раствор. Далее раствор охлаждали ледяной баней до 20°C, что вызывало кристаллизацию целевого продукта. Выпавшие кристаллы отделяли фильтрованием, промывали 15 мл гексана и сушили.

In vitro изучение антиоксидантной активности соединений 3a-r. Антиоксидантную активность бензимидазольных производных, содержащих экранированный фенол, оценивали в тест-системе на основе кукурузного масла. Окисление липидов инициировали с помощью ультрафиолетового облучения (УФО) и химической системы Фентона (H_2O_2/Fe^{2+}). В качестве стандартов сравнения применяли убихинон и бутилированный гидрокситолуол (БГТ) — активный компонент препарата дибунол, представляющий собой классический экранированный фенол. Активность убихинона, принятую за 100% (1,0 у.е.), использовали как базовую единицу для оценки эффективности исследуемых соединений.

Общая методика определения АОА in vitro производных 2,6-ди-трет-бутил-4-[2-(R)-3H-бензимидазол-1-ил]-фенола 3a-r

Приготовление модельной системы (водно-спирто-масляной эмульсии). Первоначально формируют трехкомпонентную водно-спирто-масляную среду (ВСМ). Для этого 800 мкл кукурузного масла комбинируют с 3 мл этанола и интенсивно встряхивают до образования гомогенной эмульсии. Полученную смесь количественно переносят в мерную колбу на 100 мл и доводят до метки дистиллированной водой при постоянном перемешивании для обеспечения стабильности системы.

Подготовка реагентов. Исследуемое соединение — производное бензимидазола, содержащее фрагмент экранированного фенола, растворяют в подходящем растворителе до получения 10% концентрации. Параллельно готовят рабочие растворы: 10% сульфата железа (II) ($FeSO_4$) и 3% перекиси водорода (H_2O_2).

Моделирование процесса перекисного окисления. В центрифужные пробирки вносят реакционную смесь следующего состава:

- 2 мл приготовленной ранее ВСМ-эмульсии;
- 100 мкл 10% раствора тестируемого соединения;
- 200 мкл 10% раствора $FeSO_4$ (инициатор процесса);
- 10 мкл 3% раствора H_2O_2 (источник активных форм кислорода).

В качестве контрольного образца используют смесь, в которой 100 мкл раствора соединения заменяют эквивалентным объемом дистиллированной воды. Все пробирки помещают в термостат и инкубируют при 37°C в течение 60 минут для протекания реакции окисления. Для осаждения белков и фиксации продуктов реакции по окончании инкубации в каждую пробирку добавляют 1 мл 28% раствора трихлоруксусной кислоты (ТХУ). Пробирки центрифугируют в течение

10 минут при 6000 об/мин. для отделения осадка.

Колориметрическое определение продуктов ПОЛ. Из каждой пробирки отбирают 2 мл надосадочной жидкости (супернатанта), переносят в чистые пробирки и добавляют к ним 1 мл 1% раствора тиобарбитуровой кислоты (ТБК). Пробирки помещают на кипящую водяную баню на 15 минут, в ходе которой ТБК вступает в реакцию с продуктами окисления с образованием окрашенного комплекса.

Проведение спектрофотометрического анализа. Интенсивность развившейся окраски измеряют на спектрофотометре SF-46 при двух длинах волн:

- 450 нм — для количественной оценки промежуточных продуктов перекисного окисления липидов (диеновых конъюгатов);
- 532 нм — для определения концентрации конечного продукта окисления малонового диальдегида (МДА).

Полученные значения оптической плотности прямо пропорциональны степени окисления в образце и позволяют оценить антиоксидантную активность исследуемого соединения по его способности ингибировать этот процесс.

$$\% \text{ING} = 100 - (I_0/I_K \times 100),$$

где I_0 — оптическая плотность опыта (450+532), ОЕ;

I_K — оптическая плотность контроля (450+532), ОЕ.

АОА выражали в убихиноновых единицах (Q-ЕД), для этого:

$$\text{АОА (Q-ed)} = \% \text{ING}_i - \% \text{ING}_Q,$$

где $\% \text{ING}_i$ — процент уменьшения образования в тест-системе продуктов, реагирующих с ТБК, в присутствии тестируемого синтетического образца;

$\% \text{ING}_Q$ — процент уменьшения образования в тест-системе продуктов, реагирующих с ТБК, в присутствии убихинона.

Для сравнительного анализа в исследовании применяли референтные антиоксиданты: убихинон и бутилированный гидрокситолуол (дибунол), относящийся к классу экранированных фенолов.

Методика внесения соединений заключалась в следующем: нативную субстанцию дибунула в объеме 100 мкл, а также 100 мкл рабочего раствора убихинона добавляли в описанную выше тест-систему. Рабочий раствор убихинона получали путем растворения содержимого одной капсулы в 10 мл дистиллированной воды. Инкубацию проводили в стандартных условиях.

Для статистического анализа полученных данных использовали пакеты прикладных про-

грамм Microsoft Excel 2010 (Microsoft Office, США) и Statistica 10 (Statsoft, США).

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Стратегия дизайна новых соединений-лидеров была основана на структуре пространственно затрудненного фенола, выбранного в качестве ключевого скаффолда. Данное ядро обладает выраженной фармакологической активностью и служит стабильной платформой для дальнейших модификаций. Для направленного конструирования молекул с целевой активностью был применен логико-структурный подход, в рамках которого подобраны вторичные фармакофорные фрагменты. Ключевыми из них являются бензимидазольный и арильный радикалы с переменными заместителями. Систематическое варьирование этих заместителей позволяет не только тонко настраивать фармакологический профиль, но и целенаправленно менять геометрию молекулы. Это открывает возможность формирования дополнительных центров комплементарности к биологической мишени, расположенных на заданных расстояниях от центрального скаффолда.

Все виртуальные структуры были построены и оптимизированы в рамках вычислительного эксперимента. Первичное моделирование и геометрическая оптимизация методом Ab Initio с базисным набором STO-3G были выполнены в пакете HyperChem 8.0.4 [7]. Для последующего молекулярного моделирования файлы координат

были конвертированы из формата HIN в PDB с использованием программного обеспечения Open Babel 2.4.1 [8].

На рис. 1 в качестве примера представлены результаты для соединения 3b, демонстрирующие его оптимизированную геометрию и расположение ключевых центров комплементарности, обеспечивающих взаимодействие с биосубстратом.

Согласно данным конформационного анализа прогнозируемых структур 3a-г, введение объемного вторичного фармакофорного фрагмента приводит к образованию стабильных глобулярных конформаций, равномерно распределенных в пространстве вокруг молекулярного скаффолда. Можно предположить, что столь разнообразный набор фармакофорных заместителей способствует увеличению количества центров комплементарности лигандов к активному сайту биосубстрата, что потенциально обуславливает усиление фармакологического действия.

В рамках предварительной скрининговой оценки соединений 3a-г на предмет их синтетической перспективности был выполнен *in silico* анализ спектра вероятных фармакологических эффектов с применением сервиса PASS Online, результаты представлены в таблице 1.

Идентификация соединений 3a-г в ряду 2,6-ди-*tert*-бутил-4-[2-(R)-3H-бензимидазол-1-ил]-фенолов проводилась с использованием ИК-спектроскопии, ^1H ЯМР и элементного анализа. Некоторые физико-химические характеристики данных соединений представлены в таблице 2.

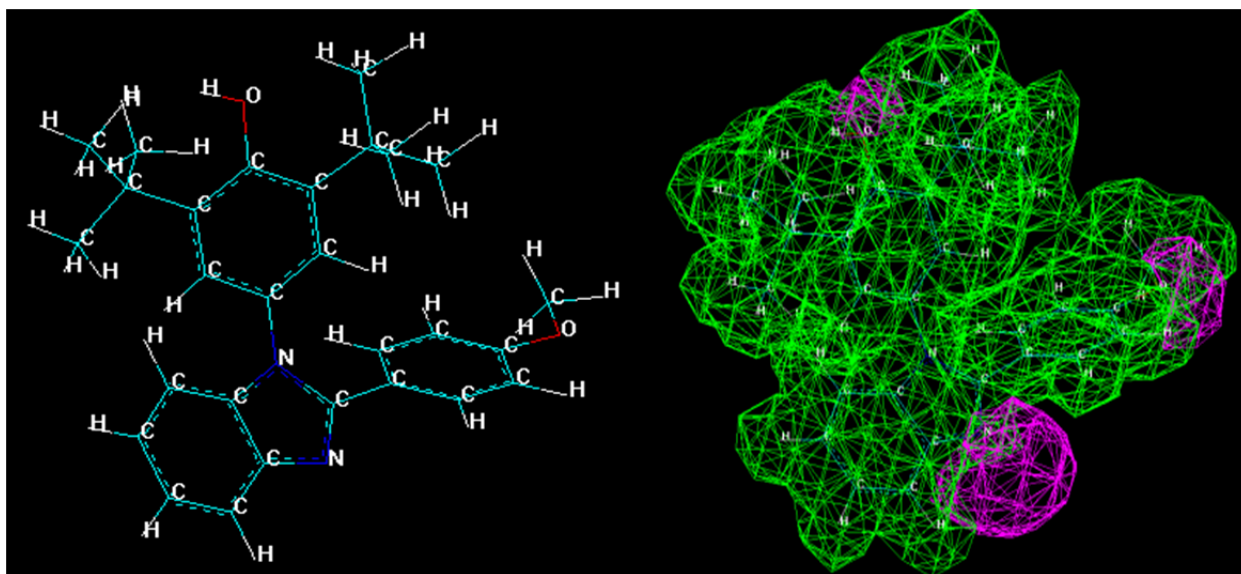


Рис. 1. Оптимизация геометрии 2,6-ди-*tert*-бутил-4-[2-(R)-3H-бензимидазол-1-ил]-фенола (3b) и центры комплементарности к биосубстрату (выделены фиолетовым).

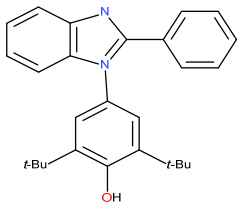
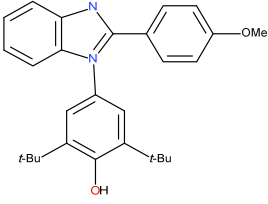
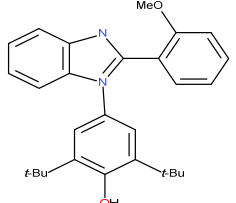
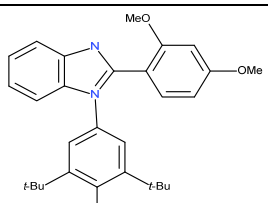
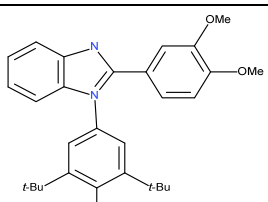
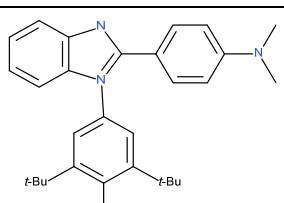
Fig. 1. Optimization of 2,6-di-*tert*-butyl-4-[2-(R)-3H-benzimidazol-1-yl]-phenol geometry (3b) and complementarity centers to biosubstrate (highlighted in purple).

Таблица 1

Table 1

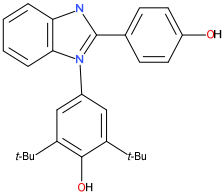
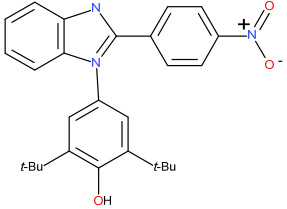
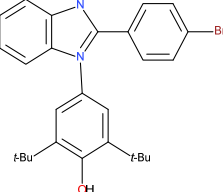
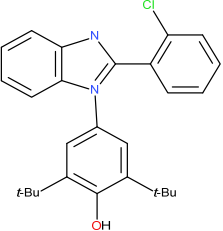
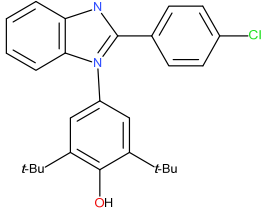
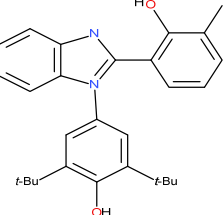
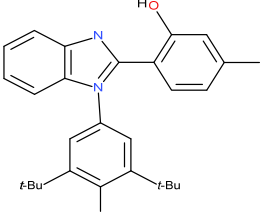
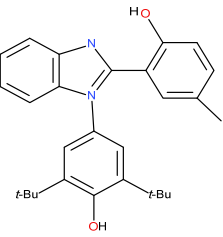
Прогнозируемые виды биологической активности 3a-г с помощью веб-ресурса PASS Online

Predicted biological activities of 3a-г using PASS Online

Соединение	Структурная формула соединения	Вид биологической активности							
		Ингиб. аспульвиндине- тилатилтрансфер.	Слиз.-мембр. протект.	Ингиб. протон. помпы	Антагон. Тромбокс. В2	Ингиб. убихин. дитох.- С-редукт.	Противовоспалит.	Ингиб. PARP	Леч. остр. неврол. расст.
		Pa – вероятность проявления активности, %							
3a		70.2	76.4	63.4	60.0	68.5	60.6	-	58.9
3b		79.2	68.8	63.8	61.3	67.7	56.5	60.2	-
3c		69.0	60.3	53.0	61.3	58.2	52.5	57.2	-
3d		73.5	72.9	60.3	61.1	72.6	56.2	-	-
3e		71.4	67.0	66.1	58.7	64.0	57.6	62.5	-
3f		-	69.0	55.1	-	-	-	-	56.0

Продолжение таблицы 1

Continuation of the table 1

3g		67.7	76.2	64.3	61.9	64.3	59.5	61.6	58.8
3h		-	73.2	59.5	60.0	80.3	-	-	71.2
3i		72.2	76.3	-	-	-	-	52.0	-
3j		-	71.4	58.0	-	65.8	58.8	-	66.2
3k		-	75.2	59.1	55.4	65.8	57.8	-	63.6
3l		-	78.0	59.6	58.1	61.2	58.7	60.5	56.0
3m		-	71.3	50.0	57.3	62.1	54.1	54.0	-
3n		-	79.8	54.6	60.3	67.6	58.7	58.3	-

3o		74.1	59.1	-	-	-	-	-	-
3p		67.7	77.7	58.3	62.7	71.8	60.0	56.7	54.9
3q		67.2	-	55.0	-	-	-	-	-
3r		58.3	77.1	60.8	57.3	57.3	59.2	60.6	57.1

Примечание: – вероятность проявления биологической активности характеризует значение Pa в %.

Note: – the probability of biological activity is characterized by the value of Pa in %.

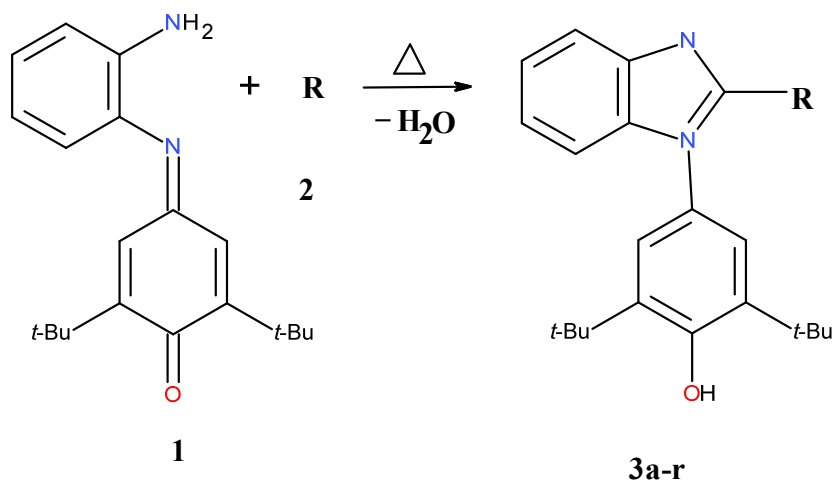


Рис. 2. Синтез 2,6-ди-трет-бутил-4-[2-(R)-3H-бензимидазол-1-ил]-фенолов.

Fig. 2. The synthesis of 2,6-ditert-butyl-4-[2-(R)-3H-benzimidazol-1-yl]-phenol.

Примечание: R = Ph (3a), 4-MeOPh (3b), 2-MeOPh (3c), 2,4-MeOPh (3d), 3,4-MeOPh (3e), 4-N(CH₃)₂Ph (3f), 4-OHPh (3g), 4-NO₂Ph (3h), 4-BrPh (3i), 2-ClPh (3j), 4-ClPh (3k), 2-OH-3-MePh (3l), 2-OH-4-MePh (3m), 2-OH-5-MePh (3n), 2-OH-3,5-BrPh (3o), 2-OHPh (3p), 3,5-*t*-Bu-4-OHPh (3q), 4-MePh (3r).

Note: R = Ph (3a), 4-MeOPh (3b), 2-MeOPh (3c), 2,4-MeOPh (3d), 3,4-MeOPh (3e), 4-N(CH₃)₂Ph (3f), 4-OHPh (3g), 4-NO₂Ph (3h), 4-BrPh (3i), 2-ClPh (3j), 4-ClPh (3k), 2-OH-3-MePh (3l), 2-OH-4-MePh (3m), 2-OH-5-MePh (3n), 2-OH-3,5-BrPh (3o), 2-OHPh (3p), 3,5-*t*-Bu-4-OHPh (3q), 4-MePh (3r).

Таблица 2

Table 2

Физико-химические характеристики производных 2,6-ди-*tert*-бутил-4-[2-(R)-3Н-бензимидазол-1-ил]-фенола 3а-г

Physical and chemical characteristics of 2,6-di-*tert*-butyl-4-[2-(R)-3H-benzimidazol-1-yl]-phenol derivatives 3a-r

Соединение	Выход, %	Т. пл (ТГФ: ДМФА)	Мол. масса	Брутто-формула*	$\nu_{\text{OH}}, \text{см}^{-1}$	$\nu_{\text{OH...O}}, \text{см}^{-1}$	$\nu_{\text{CN}} (\text{аром.}), \text{см}^{-1}$	$\nu_{\text{t-Bu}}, \text{см}^{-1}$
3a	80	232-233	409	$\text{C}_{27}\text{H}_{41}\text{N}_2\text{O}$	3560	3400	3000, 3050	3000, 2850
3b	78	258-259	438	$\text{C}_{28}\text{H}_{42}\text{N}_2\text{O}_2$	3630	3410	3000, 3047	3000, 2847
3c	82	229-230	438	$\text{C}_{28}\text{H}_{42}\text{N}_2\text{O}_2$	3600	3400	3010, 3052	3000, 2851
3d	76	234-235	467	$\text{C}_{29}\text{H}_{43}\text{N}_2\text{O}_3$	3630	3430	3000, 3050	3005, 2850
3e	74	249-250	467	$\text{C}_{29}\text{H}_{43}\text{N}_2\text{O}_3$	3600	3430	3010, 3049	3000, 2900
3f	86	239-240	451	$\text{C}_{29}\text{H}_{45}\text{N}_3\text{O}$	3610	3400	3012, 3051	3000, 2900
3g	80	219-220	424	$\text{C}_{27}\text{H}_{40}\text{N}_2\text{O}_2$	3600	3380	3000, 3050	3000, 2853
3h	80	215-216	453	$\text{C}_{27}\text{H}_{39}\text{N}_3\text{O}_3$	3620	3410	3012, 3047	3007, 2851
3i	84	209-210	487	$\text{C}_{27}\text{H}_{39}\text{N}_2\text{OBr}$	3620	3400	3010, 3053	3000, 2853
3j	80	215-216	442,5	$\text{C}_{27}\text{H}_{39}\text{N}_2\text{OCl}$	3580	3380	3012, 3047	3004, 2850
3k	80	220-221	442,5	$\text{C}_{27}\text{H}_{39}\text{N}_2\text{OCl}$	3570	3430	3010, 3049	3004, 2853
3l	74	197-198	437	$\text{C}_{28}\text{H}_{41}\text{N}_2\text{O}_2$	3600	3410	3012, 3051	3000, 2904
3m	70	203-204	437	$\text{C}_{28}\text{H}_{41}\text{N}_2\text{O}_2$	3600	3410	3012, 3053	3005, 285
3n	72	193-194	437	$\text{C}_{28}\text{H}_{41}\text{N}_2\text{O}_2$	3580	3420	3010, 3049	3013, 2857
3o	72	205-206	580	$\text{C}_{27}\text{H}_{36}\text{N}_2\text{O}_2\text{Br}_2$	3610	3400	3010, 3047	3004, 2853
3p	80	199-200	420	$\text{C}_{27}\text{H}_{36}\text{N}_2\text{O}_2$	3600	3400	3011, 3049	3000, 2856
3q	74	216-217	534	$\text{C}_{35}\text{H}_{54}\text{N}_2\text{O}_2$	3600	3420	3000, 3053	3004, 2855
3r	76	202-203	422	$\text{C}_{28}\text{H}_{42}\text{N}_2\text{O}$	3580	3410	3010, 3043	3002, 2852

Примечание:* – по данным элементного анализа (полученные значения соответствуют расчетным).

Note:* – based on elemental analysis (the obtained values correspond to the calculated ones).

In vitro изучение антиоксидантной активности соединений 3a-3r

Оценку антиоксидантных свойств исследуемых соединений проводили в модельных системах на основе кукурузного масла, содержащего комплекс насыщенных и ненасыщенных жирных кислот. Для индукции перекисного окисления липидов использовали два типа индукторов: физический (ультрафиолетовое облучение (УФО-тест-система № 1) и химический (система Фентона ($\text{H}_2\text{O}_2/\text{Fe}^{2+}$ – тест-система № 2), инициирующий свободно-радикальные процессы.

В качестве стандартных антиоксидантов (референтов) применяли убихинон и бутилированный гидрокситолуол, который является действующим началом препарата дибунола и представляет собой производное экранированного фенола. Антиокислительную активность убихинона во всех экспериментах принимали за эталонную (100% или 1,0 убихиноновая единица, Q-ed).

Исследование показало, что наибольший антиоксидантный эффект в условиях ультрафиолетового облучения продемонстрировали соединения, модифицированные фрагментами экранированного фенола. К лидерам по активности (оцениваемой в убихиноновых единицах) относятся: 3g – в орто-положении гидроксил, производных 3l-р (табл. 1, 3).

Среди выявленных лидеров особенно выделяются производные 2,6-ди-*tert*-бутил-4-[2-(R)-3Н-бензимидазол-1-ил]-фенола (3l-р). Эти соединения подавляют свободно-радикальные процессы на 60-67%, что существенно превышает эффективность референтного бутилированного гидрокситолуола, показавшего ингибирование на 39% в аналогично модельной системе.

Остальные протестированные соединения проявили неоднородную антиоксидантную активность. Наименьший эффект зафиксирован у соединения 3q, несущего два фрагмента экранированного фенола. Вероятной причиной низкой

активности является стерическая затрудненность, создаваемая объемной молекулярной структурой, которая препятствует взаимодействию с активными радикалами.

В то же время соединение 3g с гидроксильной группой в пара-положении ароматического кольца, сопряженного с бензимидазольной системой, показало активность, сопоставимую с эталонным убихиноном.

В тест-системе с перекисью водорода стабильно высокие антиокислительные свойства проявили вещества, содержащие в фенильном кольце гидроксильные группы 3l-р (табл. 4). Необходимо отметить менее выраженный эффект в данной тест-системе у этих веществ, что свидетельствует о меньшей устойчивости описываемых соединений к химическим индукторам свободно-радикальных процессов.

Таким образом, по модифицированной методике получены 18 производных 2,6-ди-трет-бутил-4-[2-(R)-3H-бензимидазол-1-ил]-фенола, структура которых подтверждена методами ¹H-ЯМР, элементного анализа, ИК-спектроскопии. По данным *in silico* прогноза на платформе PASS Online, изучаемые соединения в значительной степени могут стабилизировать клеточные мембраны, а также могут обладать опосредованно связанными с антиоксидантной активностью антитромботическими, противовоспалительными свойствами.

В ходе первичного фармакологического скрининга *in vitro* в тест-системах, инициируемых физическими и химическими индукторами ПОЛ, выявлены соединения-лидеры 3l-р, превосходящие референтные соединения – убихинон и дибунол в аналогичных условиях.

Таблица 3

Table 3

Антиоксидантная активность соединений 3a-г и референтов в тест-системе с УФО/Fe²⁺

Antioxidant activity of compounds 3a-r and referents in the test system with UVR/Fe²⁺

Соединение	Концентрация, моль/л	Оптическая плотность		АОА, % (Q-ed)
		λ=450 нм	λ=532 нм	
3a	1.0×10 ⁻³	0.425±0.01	0.345±0.01	23.0 (2.1)
3b	1.0×10 ⁻³	0.457±0.01	0.403±0.03	14.0 (1.3)
3c	1.0×10 ⁻³	0.461±0.02	0.419±0.02	12.0 (1.1)
3d	1.0×10 ⁻³	0.450±0.02	0.390±0.02	16.0 (1.4)
3e	1.0×10 ⁻³	0.466±0.03	0.434±0.01	10.0 (0.9)
3f	1.0×10 ⁻³	0.365±0.004	0.235±0.001	40.0 (3.6)
3g	1.0×10 ⁻³	0.350±0.004	0.160±0.001	49.0 (4.4)
3h	1.0×10 ⁻³	0.462±0.01	0.428±0.008	11.0 (1.0)
3i	1.0×10 ⁻³	0.422±0.004	0.328±0.003	25.0 (2.3)
3j	1.0×10 ⁻³	0.415±0.006	0.305±0.002	28.0 (2.5)
3k	1.0×10 ⁻³	0.404±0.006	0.296±0.004	30.0 (2.7)
3l	1.0×10 ⁻³	0.276±0.003	0.074±0.001	65.0 (5.9)
3m	1.0×10 ⁻³	0.284±0.003	0.116±0.001	60.0 (5.4)
3n	1.0×10 ⁻³	0.282±0.002	0.108±0.002	61.0 (5.5)
3o	1.0×10 ⁻³	0.278±0.003	0.082±0.001	64.0 (5.8)
3p	1.0×10 ⁻³	0.0274±0.004	0.056±0.001	67.0 (6.1)
3q	1.0×10 ⁻³	0.287±0.002	0.133±0.001	58.0 (5.3)
3r	1.0×10 ⁻³	0.412±0.006	0.298±0.005	29.0 (2.6)
Убихинон	1.0×10 ⁻³	0.460±0.003	0.430±0.001	11.0 (1.0)
Гидроксibuти- лированный толуол	1.0×10 ⁻³	0.391±0.005	0.219±0.002	39.0 (3.5)

Таблица 4

Table 4

Антиоксидантная активность соединений 3a-r и референтов в тест-системе с Fe^{2+} / H_2O_2 Antioxidant activity of compounds 3a-r and referents in the $\text{Fe}^{2+}/\text{H}_2\text{O}_2$ test system

Соединение	Концентрация, моль/л	Оптическая плотность		АОА, % (Q-ed)
		$\lambda = 450 \text{ нм}$	$\lambda = 532 \text{ нм}$	
3a	1.0×10^{-3}	0.432 ± 0.001	0.368 ± 0.001	20.0 (1.2)
3b	1.0×10^{-3}	0.460 ± 0.001	0.420 ± 0.003	12.0 (0.7)
3c	1.0×10^{-3}	0.469 ± 0.002	0.431 ± 0.002	10.0 (0.8)
3d	1.0×10^{-3}	0.450 ± 0.002	0.411 ± 0.002	13.0 (1.0)
3e	1.0×10^{-3}	0.463 ± 0.003	0.427 ± 0.001	11.0 (0.7)
3f	1.0×10^{-3}	0.394 ± 0.004	0.226 ± 0.001	38.0 (2.4)
3g	1.0×10^{-3}	0.355 ± 0.004	0.195 ± 0.001	45.0 (2.8)
3h	1.0×10^{-3}	0.474 ± 0.001	0.446 ± 0.008	8.0 (0.5)
3i	1.0×10^{-3}	0.430 ± 0.004	0.360 ± 0.003	21.0 (1.3)
3j	1.0×10^{-3}	0.422 ± 0.006	0.358 ± 0.002	25.0 (1.6)
3k	1.0×10^{-3}	0.419 ± 0.006	0.311 ± 0.004	27.0 (1.7)
3l	1.0×10^{-3}	0.278 ± 0.003	0.082 ± 0.001	64.0 (4.0)
3m	1.0×10^{-3}	0.323 ± 0.003	0.107 ± 0.001	57.0 (3.6)
3n	1.0×10^{-3}	0.321 ± 0.002	0.099 ± 0.002	58.0 (3.6)
3o	1.0×10^{-3}	0.281 ± 0.003	0.109 ± 0.001	61.0 (3.8)
3p	1.0×10^{-3}	0.280 ± 0.004	0.090 ± 0.001	63.0 (3.9)
3q	1.0×10^{-3}	0.326 ± 0.003	0.114 ± 0.001	56.0 (3.5)
3r	1.0×10^{-3}	0.429 ± 0.006	0.351 ± 0.005	22.0 (1.4)
Убихинон	1.0×10^{-3}	0.450 ± 0.003	0.390 ± 0.001	16.0 (1.0)
Гидроксibuти- лированный толуол	1.0×10^{-3}	0.398 ± 0.005	0.237 ± 0.002	36.5 (2.3)

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы декларируют отсутствие явных и потенциальных конфликтов интересов, связанных с публикацией настоящей статьи.

ИСТОЧНИКИ ФИНАНСИРОВАНИЯ

Авторы заявляют об отсутствии финансирования.

ЛИЧНЫЙ ВКЛАД АВТОРОВ

Цакулова Т.В. – проведение экспериментальной части работы, установление структуры полученных соединений, статистическая обработка полученных результатов, написание статьи, анализ и интерпретация полученных данных, обзор публикаций по теме исследования; Кодониди И.П. – разработка концепции и дизайна исследования, редактирование текста, утверждение окончательного варианта статьи; Чиряпкин А.С. – построение виртуальных структур моделируемых соединений, оптимизация их геометрии и форматирование файлов.

ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

- Liang P., Kolodieznyi D., Creeger Y. Subcellular Singlet Oxygen and Cell Death: Location Matters. *Front Chem.* 2020;8 1-11. DOI: 10.3389/fchem.2020.592941.
- Bennici G., Almahasheer H., Alghrably M., Valensin D. Mitigating diabetes associated with reactive oxygen species (ROS) and protein aggregation through pharmacological interventions. *RSC Adv.* 2024;14:17448-17460.

- Shlapakova T., Kostin R., Tyagunova E. Reactive oxygen species: participation in cellular processes and progression of pathology. *Russian Journal of Bioorganic Chemistry.* 2020;46 (5):657-674.
- Komarova E.F., Zhukovskaya O.N., Lukbanova E.A., Yengibaryan M.A., Vashenko L.N., Kharagezov D.A., Pozdnyakova V.V., Ushakova N.D. et al. Benzimidazole derivative as antitumor drug against experimentally induced lung carcinoma. *Bulletin of RSMU.* 2021;(3):44-48. DOI: 10.24075/BRSMU.2021.031. EDN: KSAVLG.
- Семенова А.А., Аракелян А.В., Зейналова П.А., Тумян Г.С. Опыт применения бендамустина (Розамустин); безопасность и эффективность. *Онкогематология.* 2020;15(3):27-37 [Semenova A.A., Arakelyan A.V., Zeynalova P.A., Tumyan G.S. Experience in the use of bendamustine (Rozamustin); safety and efficacy. *Oncohematology.* 2020; 15 (3): 27-37 (in Russ.)]. DOI: 10.17650/1818-8346-2020-15-3-27-37. EDN: VNPBJ.
- Poroikov V. Computer-aided prediction of biological activity spectra for organic compounds: the possibilities and limitations. *Russian Chemical Bulletin.* 2019;68(12):2143-2154.
- Ravi L. Handbook on protein-ligand Docking tool: AutoDock4. *Journal of Medical Science.* 2016;4:28-33.
- Brian J. Hyperchem, release 2: molecular modeling for the personal computer. *Journal of Chemical Information and Computer Sciences.* 1992;32:757-759.

9. Пожарский А.Ф., Анисимова В.А., Цупак Е.Б. Практические работы по химии гетероциклов. Ростов-на-Дону: Изд-во Рост. ун-та, 1988. 157 с. [Pozharsky A.F., Anisimova V.A., Tsupak E.B. Practical work on the chemistry of heterocycles. Rostov-on-Don: Publishing house Rost. University, 1988. 157 p. (in Russ.)].
Danilov D., Zhukov V., Kulikov A. Comparative analysis of statistical methods of scientific publica-

tions classification in medicine. Computer Research and Modeling. 2020;12(4):921-933.
DOI:10.20537/2076-7633-2020-12-4-921-933.

Поступила в редакцию 03.10.2025

Подписана в печать 25.04.2026

Для цитирования: Цакулова Т.В., Кодониди И.П., Чиряпкин А.С. Прогноз, антиоксидантная активность *in silico* и синтез производных 2,6-ди-*трет*-бутил-4-[2-(R)-3h-бензимидазол-1-ил]-фенола. *Человек и его здоровье*. 2026;29(1):70–81. DOI: 10.21626/vestnik/2026-1/08. EDN: UJYYBD.

PROGNOSIS, ANTIOXIDANT ACTIVITY IN SILICO AND SYNTHESIS OF 2,6-DI-*TERT*-BUTYL-4-[2-(R)-3H-BENZIMIDAZOL-1-YL]-PHENOL DERIVATIVES

© Tsakulova T.V.^{1,2}, Kodonidi I.P.², Chiryapkin A.S.²

¹ North Ossetian State Medical Academy (NOSMA)

40, Pushkinskaya Str., Vladikavkaz, Republic of North Ossetia-Alania, 362019, Russian Federation

² Pyatigorsk Medical and Pharmaceutical Institute – branch of Volgograd State Medical University (PMPI – branch of VolgSMU)

11, Kalinin Ave., Pyatigorsk, Stavropol Region, 357532, Russian Federation

As part of the study, a method was developed for the synthesis of new benzimidazole derivatives modified with a fragment of spatially hindered phenol. The key step in the synthesis was the condensation reaction of 2,6-di-*tert*-butyl-p-benzoquinonimine with a number of aromatic and aliphatic aldehydes, which made it possible to obtain the desired compounds – 2,6-di-*tert*-butyl-4-[2-(R)-3H-benzimidazol-1-yl]-phenols. Identification and confirmation of the structure of the synthesized substances were carried out using a set of physicochemical methods, including elemental analysis, IR and ¹H-NMR spectroscopy. Assessment of antioxidant properties in vitro showed that a number of the obtained compounds have pronounced activity, and some of them have shown higher efficiency compared to reference substances – ubiquinone and dibunol.

Objective – purposeful synthesis of a number of 2,6-di-*tert*-butyl-4-[2(R)-3H-benzimidazol-1-yl]-phenol derivatives using an improved procedure and subsequent comprehensive assessment of their antioxidant potential.

Materials and methods. Synthesis of hybrid structures based on benzimidazole and shielded phenol was carried out using a modified method based on classical organic synthesis approaches. Elucidation of structure and identity of all target compounds were performed using a complex of analytical methods including IR, NMR ¹H spectroscopy and elemental analysis. The antioxidant activity of the synthesized samples was studied in a model system based on corn oil rich in a complex of saturated and unsaturated fatty acids. Lipid peroxidation in this system was induced both physically (UV irradiation) and chemically using the Fenton system (H₂O₂/Fe²⁺) as a free radical producer. For comparative analysis under identical conditions, the antiradical activity of the reference compounds ubiquinone and butylated hydroxytoluene was studied. The latter is the active ingredient of the drug dibunol and is a classic example of shielded phenol.

Results. Antioxidant properties were studied in vitro for synthesized benzimidazole derivatives modified by introduction of spatially hindered phenol fragment. The results indicate a significant antioxidant effect exceeding that of the reference compounds (ubiquinone and dibunol). A number of leading compounds with maximum activity have been identified.

Conclusion. The promise of 2,6-di-*tert*-butyl-4-[2-(R)-3H-benzimidazol-1-yl] phenols is due to their pronounced antioxidant activity, which opens up opportunities for studying a number of pharmacological effects mediated by it.

Keywords: 2,6-di-*tert*-butyl-4-[2-(R)-3H-benzimidazol-1-yl]-phenols; benzimidazoles; sterically hindered phenols; in silico modeling; antioxidant activity; reactive oxygen species (ROS); lipid peroxidation (POL); PASS Online.

Tsakulova Tamara V. – Senior Lecturer, Department of Pharmacy, NOSMA, Vladikavkaz, Russian Federation; applicant for the Department of Pharmaceutical Chemistry, PMPI – branch VolgSMU, Pyatigorsk, Russian Federation. ORCID iD: 0009-0004-9358-6772. E-mail: tsakulova7@mail.ru (corresponding author)

Kodonidi Ivan P. – Dr. Sci. (Pharm.), Professor, Head of the Department of Pharmaceutical Chemistry, PMPI – branch VolgSMU, Pyatigorsk, Russian Federation. ORCID iD: 0000-0003-1333-3472. E-mail: kodonidiip@mail.ru

Chiryapkin Alexey S. – Cand. Sci. (Pharm.), Senior lecturer at the Department of Pharmaceutical Chemistry, PMPI – branch VolgSMU, Pyatigorsk, Russian Federation. ORCID iD: 0000-0001-8207-2953. E-mail: alexey.chiriapkin@yandex.ru

CONFLICT OF INTEREST

The authors declare the absence of obvious and potential conflicts of interest related to the publication of this article.

SOURCE OF FINANCING

The authors state that there is no funding for the study.

AUTHORS CONTRIBUTION

Tsakulova T.V. – conducting an experimental part of the work, establishing the structure of the obtained compounds, statistical processing of the results obtained, writing an article, analyzing and interpreting the data obtained, review of publications on the research topic; Kodonidi I.P. – study concept and design development, text editing, approval of the final version of the article; Chiryapkin A.S. – building virtual structures of simulated connections, optimizing their geometry and formatting files.

Received 03.10.2025

Accepted 25.04.2026

For citation: Tsakulova T.V., Kodonidi I.P., Chiryapkin A.S. Prognosis, antioxidant activity in silico and synthesis of 2,6-di-*tert*-butyl-4-[2-(R)-3H-benzimidazol-1-yl]-phenol derivatives. *Humans and their health*. 2026;29(1):70–81. DOI: 10.21626/vestnik/2026-1/08. EDN: UJYYBD.