

Пошук біологічно активних речовин як потенційних складових нових лікарських засобів

О.В.Вельчинська, Н.І.Шарикіна, Н.Є.Чумак, В.В.Вільчинська

Національний медичний університет ім. О.О.Богомольця МОЗ України, Інститут фармакології та токсикології
АМН України, Інститут екогієни і токсикології ім. Л.І.Медведя МОЗ України
Київ, Україна

Розглянуто деякі аспекти дослідження біологічних властивостей нових синтезованих біс-похідних бензимидазолу та 5-метилурацилу. Показано, що дані сполуки відносяться до середньотоксичних порівняно з препаратом порівняння 5-фторурацилом, а також виявляють значний протипухлинний ефект, що може поліпшувати стан онкологічних хворих та запобігати можливих ускладнень. Вони можуть використовуватися як компонент нових лікарських засобів, у складі комплексних засобів під час лікування та реабілітації онкохворих.

Ключові слова: бензимидазол, фторурацил, 5-метилурацил, фармакофори, гетероцикли, протипухлинний ефект.

ВСТУП

Відмічено, що ризик виникнення деяких пухлин у людини пов'язаний із додержанням певної дієти. Їжа зазнає різних перетворень у шлунково-кишковому тракті як за допомогою травних ферментів макроорганізму, так і біодеградації мікроорганізмами, що населяють слизові оболонки кишечника. До продуктів біодеградації відносяться проканцерогени, канцерогени й мутагени.

Одним зі шляхів зменшення їхнього впливу на макроорганізм є введення різних захисних факторів, до числа яких можуть бути віднесені дієтичні добавки з протипухлинною активністю. Важливою умовою профілактики є правильно підібраний раціон харчування. Так, наприклад, фрукти й овочі містять певні компоненти, які перетворюються кишковою флорою на біологічно активні гормони — подібні субстанції,

такі як лігнани й ізофлавоноїди. Взаємодія цих компонентів з ендогенними гормонами може стати дієтозалежним механізмом щодо запобігання раку. Знижений ризик гормонзалежних раків спостерігається у вегетаріанців.

Незважаючи на значні успіхи хіміотерапії при лікуванні деяких видів злоякісних новоутворів, результати її застосування залишаються незадовільними.

За таких умов цілком закономірними є пошуки шляхів елімінації пухлинних клітин із множинною лікарською стійкістю за допомогою інших механізмів. Розвивається сучасна концепція імунотерапії пухлин. Сучасні імунотерапевтичні агенти впливають як на пухлину, так і на різні регуляторні системи організму (у тому числі й на імунну систему) і призводять до протипухлинного ефекту через різні механізми.

Важливою є розробка сучасних рецептур дієтичних добавок та лікарських засобів, що сприяють захисту організму людини від шкідливого впливу факторів навколишнього середовища. Одним з перспективних шляхів пошуку засобів лікування та профілактики пухлинної хвороби є створення нових антиметаболітів пуринового та піримідинового обміну, здатних впливати на структуру та функції нуклеїнових кислот. Наявність цих речовин в організмі людини й обумовила актуальність дослідження їхньої ролі у фізіології макроорганізму. Вивчається також використання малих активних молекул, як для фармакопейних форм медичних біологічних препаратів і дієтичних добавок, з метою інгібіції пухлинного росту [1]. Останнім часом значно зросла кількість досліджень щодо синтезу нових похідних бензимидазолу та 5-заміщених урацилів, вивчення їхньої біологічної активності. Так, щодо піридо[1,2-а]-бензимидазолів описано їхню анксиолітичну активність, а нові 2-піперазинілбензимидазоли виявили властивості антагоністів 5-НТЗ рецепторів [2].

Для ефірів 1-оксиметил- та 1-(2-оксиетил)-бензimidазолів виявлено вплив на центральну нервову систему (слабка депримируюча дія), на артеріальний тиск, вегетативні реакції. Сам бензimidазол є інгібітором пуринів, має протисудомну дію. Бензimidазол гальмує ріст бактерій, дріжджів, мікробів кишково-тифозної групи [3]. При введенні в положення 1 молекули бензimidазолу заміників ароматичної, аліфатичної будови, галогеналкілів можна отримати сполуки з антибактеріальною, протівірусною або протизапальною дією [4].

Після синтезу похідних урацилу, а особливо 5-фторурацилу та фторафуру, які продемонстрували високу протипухлинну активність, значно зросла кількість досліджень із цього напрямку [5, 6].

Відомо, що пухлини використовують молекули урацилу активніше, ніж нормальні клітини. Оскільки ван-дер-ваальсові радіуси водню та фтору близькі, можна очікувати, що 5-фторурацил (або його похідні) виконуватиме роль субстрату та/або інгібітора ферментів і переважно поглинатиметься тканинами пухлини. Молекули 5-заміщених урацилів та їх похідних здатні виконувати роль фтор(галоген)вмісних синтонів в органічному синтезі. Тому їх активно використовують для створення оригінальних біологічно активних молекул. З іншого боку, введення фтор(галоген)вмісних фармакофорів у гетероциклічну молекулу призводить до підвищення розчинності сполук в ліпідах та робить лікарські засоби ефективнішими завдяки легкості їхнього транспортування в організмі [7]. При цьому зазначена увага до фторвмісних фрагментів у нових молекулах передбачає підсилення антиметаболітних властивостей сполук. Авторами роботи [8] описано метод введення до аліфатичного ланцюга або ароматичного кільця фармакофорної групи -CF₂CHBrCl при використанні доступного реагента та лікарського засобу фторотану з метою синтезу біологічно активних сполук з поліфторалкокси-групами. При цьому взаємодія фторотану з лугом супроводжується елімуванням фтористого водню та генеруванням проміжного продукту 2-бром-1,1-дифтор-2-хлоретилену, який безпосередньо реагує з молекулами спиртів при каталізі лугом.

Даний метод введення фармакофорних груп в молекули був нами досліджений на молекулах поліфторвмісних ацетиленових спиртів, заміщених піримідинів та 5(6)-заміщених урацилів [9]. Даний метод дозволяє виявити нову стратегію для синтезу селективно поліфунк-

ціональних молекул, хімічна будова яких дозволяє введення в молекулу нових фармакофорних фрагментів.

Метою дослідження було вивчити преформовані пурини та піримідини або близькі до них за хімічною будовою гетероцикли, їх синтез та хімічні і біологічні властивості.

МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ

Після конструювання потенційно активних структур розроблено новий препаративний метод синтезу оригінальних гетероциклів на основі бензimidазолу або 5-заміщених урацилів, а також фторзаміщеного загального анестетика фторотану (2-бром-1,1,1-трифтор-2-хлоретану), досліджено протипухлинну активність та токсичність синтезованих гетероциклічних біс-похідних.

Об'єктами дослідження були нові гетероциклічні біс-похідні, синтезовані на основі бензimidазолу або 5-метилурацилу та фторотану. Абсолютні розчинники отримували в такий спосіб: ацетонітрил переганяли над P₂O₅, діетиловий ефір — над металевим натрієм. Бензол та ДМФА переганяли у вакуумі. Індивідуальність синтезованих сполук контролювали методом тонкошарової хроматографії (ТШ) на пластинках Silufol-254 в системі ацетонітрил — гексан 2:1. ІЧ спектри записували на спектрофотометрі UR-20 (виробник «Charles Ceise Nema», Germany). Газорідинну хроматографію (ГРХ) проводили на газорідинному хроматографі «Perkin Elmer» з УФ-детектором (виробник «Perkin», Germany). Спектри ¹H ЯМР записували на приладах «Bruker WP-200» (виробник «Bruker», Switzerland), «Varian T-60» (виробник «Varian», USA) з робочою частотою 200-132 МГц у DMSO-d₆ з використанням тетраметилсилану як внутрішнього стандарту.

N(1),N(1')-(2''-бром-2''-хлоретеніл)-біс-(бензimidазол) (I). Приготування розчину №1. 0,47 г гідроксиду калію (0,008 моль), 0,047 г дибензо-18-краун-6-ефіру, 40 мл сухого бензолу перемішували при температурі 60°C близько 15 хв. до утворення на стінках хімічного реактора білого полімерного нальоту. Отриманий розчин охолоджували до кімнатної температури, додавали до нього краплями розчин 1,57 г (0,008 моль) фторотану в 30 мл діетилового ефіру. Приготування розчину №2. 1,89 г (0,016 моль) бензimidазолу розчиняли в 20 мл сухого бензолу при температурі 60°C в окремому хімічному посуді. Гарячий розчин №2 додава-

ли краплями через ділильну лійку до розчину №1, перемішували та нагрівали реакційну суміш при температурі 80-90°C 11 год. Залишок-осад кип'ятили з 30 мл ацетонітрилу, фільтрували, промивали водою, ацетонітрилом, ефіром, потім сушили у вакуумі водострунного насоса. Синтезована сполука — кристалічний порошок кремового забарвлення, нестійкий до дії гарячого органічного розчинника; при перекристалізації він розкладається до вихідного бензimidазолу. Вихід — 3,15 г (53 %). Тпл. — 222-225°C. Знайдено: С — 51,5%; Н — 3,0%; N — 14,65%. C₁₆H₁₀BrClN₄. Обчислено: С — 51,43%; Н — 2,7%; N — 14,99%. ІЧ спектр (KBr): 550-850 (C-C1, C-Br) см⁻¹, 650-900 (Ph) см⁻¹, 1450 (cis-C=C-) см⁻¹, 1600-1680 (trans-C=C-) см⁻¹, 3000-3100 (Ph) см⁻¹. ¹H ЯМР: 7.301-8.96 (10H, м., 2 Ph, 2 Heterocycles, -N=CH-). Аналогічно синтезували сполуку N(1), N(1')-(2"-бром-2"-хлоретеніл)-біс-(5-метилурацил) (II) із 0,87 г (0,0044 моль) фторотану та 1,11 г (0,0088 моль) 5-метилурацилу. Сполука II — кристалічний порошок кремового забарвлення, кристалізується у суміші розчинників етанол — гексан (1:1). Вихід — 1,58 г (36,8%). Тпл. — 265-268°C. Знайдено: С — 37,60%; Н — 3,08%; N — 14,53%. C₁₂H₁₀BrClN₄O₄. Обчислено: С — 37,1%; Н — 2,58%; N — 14,38%. ІЧ спектр (KBr): 515 см⁻¹, 615(C-Hal) см⁻¹, 1710 см⁻¹, 1750 (C=O) см⁻¹, 2800-3000 (CH₃) см⁻¹. ¹H ЯМР: 1,712 (6H, д., J_{2H,H} 5 Гц, 2xCH₃), 7,229 (2H, д., J_{2H,H} 5 Гц, 2xC(6)H), 10,7 (2H, уш. с., 2xN(3)H).

Дослідження параметрів гострої токсичності та протипухлинної активності біс-похідних бензimidазолу та 5-метилурацилу проводили в Інституті фармакології та токсикології НАМН України. Вивчення параметрів гострої токсичності проводили в дослідах на білих нелінійних мишах-самцях з масою тіла 22±2 г при підшкірному шляху введення. Результати досліду обраховували в альтернативній формі на 14 добу після введення. Статистичну обробку проводили за В.Б.Прозоровським та співавт. [10]. Оскільки структурних аналогів синтезованих сполук в літературі не описано, препаратом порівняння був відомий протипухлинний лікарський засіб 5-фторурацил. Для порівняння протипухлинної дії сполук I, II та 5-фторурацилу було відзначено параметри протипухлинної дії останнього: гальмування росту Лімфосаркоми Пліса 55% [10, 11]. Курс лікувальних впливів становив 6 введень через добу при внутрішньоочеревинному шляху введення, згідно з правилами введення речовин до організму піддослідних

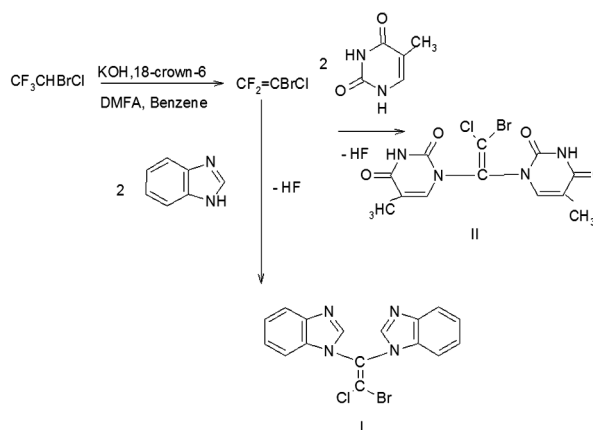
тварин, які рекомендовано Державним фармакологічним центром МОЗ України, в інтервалі доз 1/4-1/5 ЛД₅₀. Результати обраховувалися через 24 год. після закінчення лікування.

РЕЗУЛЬТАТИ ДОСЛІДЖЕННЯ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

За новим, розробленим нами методом синтезу, взаємодією фторотану в якості фторвмісного синтону та бензimidазолу або 5-метилурацилу в молярному співвідношенні 1:2, в системі розчинників (бензол — ДМФА — діетиловий ефір) в умовах міжфазного каталізу дибензо-18-краун-6-ефіром у лужному середовищі синтезовано нові біс-похідні з фармакофорною групою =C=CBrCl, (I, II):

Практичний інтерес до потенційних лікарських засобів зумовлений їх постійною дією на макроорганізм. Дослідження глибоких перетворень чутливих клітин під впливом цих речовин є важливим аспектом фармакології. Визначення одного з головних фармакологічних індексів гетероциклічних біс-похідних — гострої токсичності — показало, що сполуки I, II відносяться до середньотоксичних: ЛД₅₀ їх дорівнює 282 мг/кг та 515 мг/кг відповідно. Препарат порівняння — 5-фторурацил — відноситься до середньотоксичних сполук та характеризується наступними значеннями токсичності: ЛД₅₀ 5-фторурацилу становить 375 мг/кг. Доза речовини при підшкірному шляху введення становила від 282 мг/кг до 515 мг/кг (табл. 1). У піддослідних тварин спостерігалися тонічні судоми впродовж 1-2 год., блювота.

Після різнобічного дослідження біологічних властивостей синтезованих сполук I, II було виявлено їхню протипухлинну активність на деяких моделях пухлин. Молекули сполук I, II містять у своїй будові фрагмент молекули фто-



ТАБЛИЦЯ 1
Параметри токсичності сполук I, II у порівнянні з 5-фторурацилом

Сполука	ЛД ₅₀ (миші, мг/кг)
N(1),N(1')-(2"-бром-2"-хлоретеніл)-біс-(бензимидазол) (I)	282
N(1),N(1')-(2"-бром-2"-хлоретеніл)-біс-(5-метилурацил) (II)	515
5-фторурацил (препарат порівняння)	375

ротану. Згідно із зауваженнями клініцистів, фторотан є найбільш зручним лікарським засобом, що дає позитивні результати при оперативних втручаннях у онкологічних хворих [2, 14]. Тому синтезовані біс-гетероцикли I, II були вивчені в онкофармакологічних експериментах. Як модель застосовували перевивну модель експериментального пухлинного росту – Лімфосаркома Пліса.

Виражений протипухлинний ефект з високим процентом гальмування росту пухлини зареєстровано на Лімфосаркомі Пліса у біс-похідного 5-метилурацилу (II) (відсоток гальмування росту пухлини становив 65,7%). Для біс-похідного бензимидазолу (I) виявлено стабільну та виражену протипухлинну активність, найвищий серед досліджуваних комплексів індекс ефективності 5,56, високий відсоток первинного вилікування тварин: гальмування росту вказаного типу пухлини становило 87,0% і перевищувало протипухлинну активність 5-фторурацилу в 1,52 разу для Лімфосаркоми Пліса.

Зазначені ефекти вважаються вираженими щодо подальшого вивчення сполук I, II при пухлинах.

Таким чином, можна зробити висновок, що сполуки N(1), N(1')-(2"-бром-2"-хлоретеніл)-біс-(бензимидазол) (I) та N(1),N(1')-(2"-бром-2"-хлоретеніл)-біс-(5-метилурацил) (II) відносяться до середньотоксичних у порівнянні з відомим препаратом 5-фторурацилом. Крім того, сполуки I, II мають значний протипухлинний ефект з відсотком гальмування зросту пухлини 87,0% та 65,7% відповідно у дослідах на пухлині Лімфосаркома Пліса, що дозволяє розглядати їх як фізіологічно активні сполуки з перспективою подальшого вивчення за вимогами, як компоненти лікарських засобів з протипухлинними властивостями.

У наших експериментах переконливо показано, що препарати на основі нових похідних бензимидазолу та 5-заміщених урацилів поліпшують стан онкологічних хворих (піддослідних тварин), запобігають можливих інфекційних

ускладнень і мають протипухлинну активність. Враховуючи вищезазначене, можна розглядати ці речовини як потенційні складові лікарських засобів, що використовуються у комплексі заходів під час лікування та реабілітації після перенесених онкологічних захворювань або в період загострення при хронічному їх перебігу.

ВИСНОВКИ

1. Синтезовано нові біс-похідні бензимидазолу та 5-метилурацилу.
2. Показано, що синтезовані сполуки відносяться до середньотоксичних порівняно з препаратом порівняння 5-фторурацилом.
3. Нові біс-похідні бензимидазолу та 5-метилурацилу виявляють значний протипухлинний ефект з відсотком гальмування зросту пухлини 87,0% та 65,7% відповідно у дослідах на пухлині Лімфосаркома Пліса.

ЛІТЕРАТУРА

1. Noordhuis P. 5-fluorouracil incorporation into RNA and DNA in relation to thymidilate synthetase inhibition human colorectal cancer / P.Noordhuis, U.Holwerda [et al.] // *Annals of oncol.* – 2004. – Vol. 15. – P. 1025-1032.
2. Brown B.R. Biotransformation and hepatotoxicity of halothane / B.R.Brown, I.G.Sipes // *Biochem. Pharmacol.* – 1977. – Vol. 26. – P. 2091-2094.
3. Мнджоян А.Л. Биологические свойства химических соединений / А.Л.Мнджоян, Ю.З.Тер-Захарян. – Ереван: Изд. АН Арм. ССР, 1962. – Вып.1. – С. 235-246.
4. Барлоу Р. Введение в химическую фармакологию / Р.Барлоу. – М.: Изд. ин. лит., 1959. – С. 107.
5. Преображенская М.Н. Поиски противоопухолевых препаратов среди компонентов нуклеиновых кислот / М.Н.Преображенская // *ЖВХО им. Д.М.Менделеева.* – 1973. – №6. – С. 643-656.
6. Adjei A. A review of pharmacology and clinical activity of new chemotherapy agents for the treatment of colorectal cancer / A.Adjei // *Clin. Pharmacol.* – 1999. – Vol. 48. – P. 265-277.
7. Ягупольский Л.М. Ароматические и гетероциклические соединения с фторсодержащими заместителями / Л.М.Ягупольский. – Киев: Наукова думка, 1988. – С. 90-105.
8. Алкокси(арилокси)-1,1-дифтор-2-хлор-2-бромэтан / И.И.Герус, М.Т.Колычева, Ю.Л.Ягупольский, В.П.Кухарь // *Журн. орг. хим.* – 1989. – Т.25. – С. 2020-2021.
9. Радченко О.А. 2-Бром-1,1-дифтор-2-хлорэтиловое ацетиленовых спиртов / О.А.Радченко, Е.В.Прошак, А.Я.Ильченко // *Журн. орг. хим.* – 1991. – Т.27. – С. 2231-2232.
10. Прозоровский В.Б. Экспресс-метод определения средней эффективности дозы и ее ошибки / В.Б.Прозоровский, В.П.Прозоровский,

- В.М.Демченко // Фармакол. та токсикол. — 1978. — Т.41. — №4. — С. 407-509.
11. Экспериментальная оценка противоопухолевых препаратов в СССР и США / Под ред. З.П.Софьиной, А.Б.Сыркина, А.Голдина, А.Кляйна. — М.: Медицина, 1979. — 296 с.
 12. Провести поглиблене вивчення протипухлинної активності та механізмів дії нових ФАР похідних монофосфонатів / [Н.І.Шарикіна, М.І.Голубов, О.О.Сергієнко, А.С.Семеніхіна]. — К.: Звіт про науково-дослідну роботу ІФТ АМН України. №ДР 0103U000412. — 2005. — 271 с.
 13. Шарикіна Н.І. Розробити новий протипухлинний та протиметастазний засіб на основі фосфорильованого урацилу ФП-8: Звіт про науково-дослідну роботу (проміжний). ІФТ АМН України; №ДР 0106U000871 / Н.І.Шарикіна, М.І.Голубов. — К, 2006. — 176 с.
 14. Brody G.L. Halothane anesthesia as a possible cause of massive hepatic necrosis/ G.L.Brody, R.B.Sweet // Anesthesiol. — 1963. — Vol. 24. — P. 29-37.

Е.В.Вельчинская, Н.И.Шарыкина, Н.Е.Чумак, В.В.Вильчинская. Поиск биологически активных веществ как потенциальных составляющих новых лекарственных средств. Киев, Украина.

Ключевые слова: бензимидазол, фторурацил, 5-метилурацил, фармакофоры, гетероциклы, противоопухолевый эффект.

Рассмотрены некоторые аспекты исследования биологических свойств новых синтезированных

бис-производных бензимидазола и 5-метилурацила. Показано, что данные соединения относятся к среднетоксичным в сравнении с препаратом сравнения 5-фторурацилом, а также проявляют значительный противоопухолевый эффект, что может улучшать состояние онкобольных и предупреждать возможные осложнения. Они могут быть использованы в качестве компонента новых лекарственных средств, в составе комплексных средств во время лечения и реабилитации онкобольных.

E. V. Welchinska, N. I. Sharikina, N. E. Chumak, V. V. Vilchinska. Search of biological active substances as potential components of new medical drugs. Kyiv, Ukraine.

Key words: benzimidazole, fluorouracile, 5-methyluracile, pharmacophors, heterocyclics, antitumor effect.

Certain aspects of synthesized new bis-derivatives of benzimidazole and 5-methyluracile biological investigations have been observed. The research shows that given compositions refer to average toxically ones compared to the preparation of compare 5-fluorouracile and also manifest considerable anticancer activity, improve the condition of the cancer diseased people, and prevent possible complications. They may be used as a component of new medical remedies, at the composition of complex medicine in cancer treatment and rehabilitation period.

Надійшла до редакції 22.03.2011 р.