

О.В. Вельчинська<sup>1</sup>, Н.І. Шарикіна<sup>2</sup>, І.В. Ніженковська<sup>1</sup>, Е.О. Коваленко<sup>3</sup>

## Нові антиметаболіти пуринового обміну

<sup>1</sup>Національний медичний університет ім. О.О. Богомольця, м. Київ,<sup>2</sup>Інститут фармакології та токсикології АМН України, м. Київ,<sup>3</sup>Інститут мікробіології і вірусології ім. Д.К. Заболотного НАН України, м. Київ

**Ключові слова:** бактерійний лектин, бензимидазол, фторотан, пухлина.

**Ключевые слова:** бактериальный лектин, бензимидазол, фторотан, опухоль.

**Key words:** bacterial lectine, benzimidazole, halothane, tumour.

Описано новий препаративний метод синтезу гетероциклічного біс-похідного бензимидазолу з фторотаном при каталізі 18-краун-6-комплексом. Будова та склад синтезованої сполуки підтверджено даними елементного аналізу. Встановлено, що синтезована сполука та її молекулярний комплекс з бактерійним лектином *Bacillus polymyxa 102 KGU* відносяться до середньотоксичних: ЛД<sub>50</sub> їх становить 282 мг/кг та 235 мг/кг, відповідно. Виявлено високий протипухлинний ефект біс-похідного бензимидазолу на гетеротрансплантатах злоякісної гліоми людини з відсотком гальмування росту пухлини 43,8%. Високий протипухлинний ефект молекулярного комплексу (біс-гетероцикл – бактерійний лектин) зареєстровано на пухлині Лімфосаркома Пліса: гальмування росту пухлини сягало 80%.

Описан новый препаративный метод синтеза гетероциклического бис-производного бензимидазола с фторотаном при катализе 18-краун-6-комплексом. Строение и состав синтезированного соединения подтверждено данными элементного анализа. Установлено, что синтезированное соединение и его молекулярный комплекс с бактериальным лектином *Bacillus polymyxa 102 KGU* относятся к среднетоксичным: ЛД<sub>50</sub> их составляет 282 мг/кг и 235 мг/кг, соответственно. Обнаружен высокий противоопухолевый эффект бис-производного бензимидазола на гетеротрансплантатах злокачественной глиомы человека с процентом торможения роста опухоли 43,8%. Высокий противоопухолевый эффект молекулярного комплекса (бис-гетероцикл – бактериальный лектин) зарегистрирован на опухоли Лимфосаркома Плисса: торможение роста опухоли достигало 80%.

A new preparative synthesis method of heterocyclic bis-derivative of benzimidazole with halothane with 18-crown-6-complex as catalyst was described. The structure and composition of synthesized compound has been confirmed by data of elemental analysis. It was discovered that compound which was synthesized and its molecular complex with bacterial lectine *Bacillus polymyxa 102 KGU* correspond to middle toxic preparations: LD<sub>50</sub> are 282 mg/kg and 235 mg/kg, correspondingly. Strong antitumoral effect of bis-derivative of benzimidazole on the heterotransplantates of human glioma-cancer with 43,8% percents of tumour growth inhibition has been discovered. Strong antitumour effect of molecular complex (bis-heterocycle – bacterial lectine) on Lymphosarcoma Plissa tumour with 80% growth inhibition has been registered.

Численні роботи вітчизняної та світової літератури підтверджують актуальність досліджень щодо створення нових антиметаболітів пуринового та піримідинового обміну, здатних впливати на структуру та функції нуклеїнових кислот, малих активних молекул, з метою інгібіції пухлинного росту [1-4]. За останній час значно зросла кількість досліджень щодо синтезу нових похідних бензимидазолу та вивчення їх біологічної активності [4].

При введенні в положення 1 молекули бензимидазолу замісників ароматичної, аліфатичної будови, галогеналкілів, можна отримати сполуки з антибактеріальною, противірусною або протизапальною дією [5].

Введення галоген(фтор)вмісних фармакофорів в гетероциклічну молекулу призводить до підвищення розчинності сполук в ліпідах та робить лікарські засоби ефективнішими у зв'язку із легкістю їх транспорту в організмі [6]. Зазначена увага до фторвмісних фрагментів в нових молекулах викликана також підсиленням антиметаболітних властивостей цих сполук.

Метод введення фармакофорних груп в молекули було

досліджено нами на молекулах поліфторвмісних ацетиленових спиртів, заміщених піримідинів та 5(6)-заміщених урацилів [7]. Означений метод дозволяє виявити нову стратегію для синтезу селективно поліфункціональних молекул, хімічна будова яких дозволяє введення в молекулу нових фармакофорних фрагментів.

### Мета роботи

Полягає в означенні преформованих пуринів або близьких до них за хімічною будовою гетероциклів, їх синтезі та вивченні хімічних, фізико-хімічних та біологічних властивостей, а саме після конструювання потенційно активних структур розроблено новий препаративний метод синтезу оригінального гетероциклу на основі бензимидазолу з одного боку та фторзаміщеного загального анестетика фторотану (2-бром-1,1,1-трифтор-2-хлоретану) (I), досліджена протипухлинна активність та токсичність біс-похідного бензимидазолу як найбільш близької за хімічною будовою до пурину сполуки, на його основі створено молекулярний комплекс з бактерійним лектином *Bacillus polymyxa 102 KGU* з вираженими протипухлинними властивостями.

**Матеріали і методи дослідження**

Об'єктами дослідження стали: нове гетероциклічне біс-похідне, синтезоване на основі незаміщеного бензimidазолу та фторотану; молекулярний комплекс біс-похідного бензimidазолу з бактерійним лектином *Bacillus polytuxa* 102 KGU. Абсолютні розчинники одержували в такий спосіб: ацетонітрил переганяли над P<sub>2</sub>O<sub>5</sub>, діетиловий ефір – над металевим натрієм. Диметилформамід та бензол переганяли у вакуумі. Індивідуальність синтезованих сполук контролювали методом тонкошарової хроматографії на пластинах Silufol-254 в системі ацетонітрил-гексан 2:1. ІЧ спектри записували на спектрофотометрі UR-20 (виробник «Charles Ceise Hena», Germany).

ГРХ проводили на газорідному хроматографі «Perkin Elmer» з УФ-детектором (виробник «Perkin», Germany). Спектри <sup>1</sup>H ЯМР записували на приладах «Bruker WP-200» (виробник «Bruker», Switzerland), «Varian T-60» (виробник «Varian», USA) з робочою частотою 200-132 МГц у DMSO-d<sub>6</sub> з використанням тетраметилсилану як внутрішнього стандарту.

*N*<sub>(1)</sub>,*N*<sub>(1')</sub>-(2)-бром-2)-хлоретеніл)-біс-(бензimidазол) (III). Приготування розчину №1. 0,47 г гідроксиду калію (0,008 моль), 0,047 г дибензо-18-краун-6-ефіру, 40 мл сухого бензолу перемішують при температурі 60°C біля 15 хвилин до утворення на стінках хімічного реактору білого полімерного нальоту, тобто утворення калієвого комплексу з дибензо-18-краун-6-ефіром. Отриманий розчин охолоджують до кімнатної температури, додають 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 розчиняють в 20 мл сухого бензолу при температурі 60°C в окремому хімічному посуді. Гарячий розчин №2 додають краплями через ділильну лійку до розчину №1, перемішують при температурі 80–90°C 11 годин, фільтрують у гарячому стані, охолоджують, відганяють простою перегонкою розчинники. Залишок-осад кип'ятять з 30 мл ацетонітрилу, фільтрують, промивають водою, ацетонітрилом, ефіром, потім сушать у вакуумі водострумного насосу. Кристалічний осад кремового забарвлення, нестійкий до дії гарячого органічного розчинника; при перекристалізації він розкладається до вихідного бензimidазолу. Вихід 0,6 г (53 %). Т топл. 222-225°C. Знайдено, %: С 51,5; Н 3,0; N 14,65. С<sub>16</sub>H<sub>10</sub>BrClN<sub>4</sub>. Обчислено, %: С 51,43; Н 2,7; N 14,9. ІЧ-спектр (KBr), см<sup>-1</sup>: 550-850 (C-C1, C-Br), 650-900 (Ph), 1450 (cis-C=C-), 1600-1680 (trans-C=C-), 3000-3100 (Ph). <sup>1</sup>H ЯМР: 7.301-8.96 (10H, м., 2 Ph, 2 Heterocycles, -N=CH-).

Для створення молекулярного комплексу на основі бактерійного лектину та синтезованої сполуки (III) було відібрано найбільш активний продуцент позаклітинних лектинів: сапрофітна культура *Bacillus polytuxa* 102 KGU з Української колекції мікроорганізмів ІМВ НАНУ, ізольований з ґрунту. Раніше з культуральної рідини одержано препарати позаклітинних лектинів з високою питомою активністю (13232-16845 ГАО),

виходом по активності до 97% та ступеню очистки від 20,7 до 28,8 раз [8]. Культивування бактерій проводили періодичним способом на качалках при температурі 37°C в колбах Ерленмейера з робочим об'ємом 100 мл на оптимізованому для спрямованого біосинтезу лектинів середовищі Гаузе відповідного складу, г/л: бульон Хоттінгера – 30 мл; пептон – 5,0; NaCl – 5; галактоза – 10; початкове рН середовище – 6; час культивування – 18-20 год. Бактерійні клітини відділяли центрифугуванням при 6000 г протягом 20 хв. Лектини виділяли зі звільненої від клітин культуральної рідини (КР) шляхом висолювання сірчаноокислим амонієм при насиченні 70%, як описано раніше [9]. Одержані осади центрифугували при 6000 г протягом 20 хв, розчиняли в мінімальному об'ємі дистильованої води, діалізували проти останньої і прогрівали на водяній бані при температурі 65°C тричі протягом 30 хв. Термолабільні білки відділяли центрифугуванням при 5000 г протягом 20 хв; супернатант висушували і використовували для подальших досліджень. Молекулярний комплекс: бактерійний лектин – біс-похідне бензimidазолу отримували простим механічним перемішуванням двох компонентів у співвідношенні 1:1 у фізіологічному розчині.

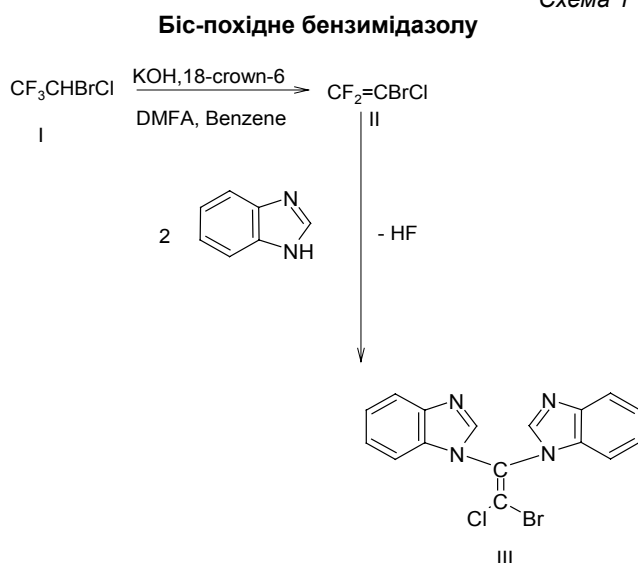
Дослідження параметрів гострої токсичності та протипухлинної активності біс-похідного бензimidазолу та його молекулярного комплексу з бактерійним лектином проводили в Інституті фармакології та токсикології АМН України. Вивчення параметрів гострої токсичності проводили у дослідах на білих нелінійних мишах-самцях з масою тіла 22±2 г та щурах-самцях з масою тіла 160±20 г при внутрішньоочеревинному шляху введення. Результати досліду обраховували у альтернативній формі на 14 добу після введення. Статистичну обробку проводили за В.Б. Прозоровським та ін. [10]. Оскільки структурних аналогів синтезованих сполук в літературі не описано, препаратом порівняння був відомий протипухлинний лікарський засіб 5-фторурацил. При вивченні протипухлинної активності біс-похідного бензimidазолу та його молекулярного комплексу з бактерійним лектином прийнятим критерієм значення для речовини з протипухлинною активністю вважалося % гальмування росту пухлини – понад 50% [11]. У якості моделей застосовували перевивні моделі експериментального пухлинного росту різного гістогенезу: Лімфосаркома Пліса та злоякісна гліобластома людини з використанням пухлини головного мозку людини (операційний та біопсійний матеріал) в підкапсульному тесті за методом Богдана [12]. При лікуванні гліобластоми критерієм активності був відсоток гальмування росту гетеротрансплантату – гліоми людини більш, ніж 25%. Курс лікувальних впливів становив 6 введень через добу при внутрішньоочеревинному шляху введення, згідно із правилами введення речовин до організму піддослідних тварин, які рекомендовано Фармакологічним Центром МОЗ України, у інтервалі доз 1/4 – 1/5 ЛД<sub>50</sub>. Результати обраховувалися через 24 години після закінчення лікування. Під час вивчення специфічної протипухлинної активності

молекулярного комплексу, зазначений молекулярний комплекс розчиняли у фізіологічному розчині та вводили одноразово при внутрішньоочеревинному шляху введення.

### Результати дослідження та їх обговорення

За новим, розробленим нами методом синтезу, взаємодією фторотану (I) у якості фторвмісного синтону та бензимидазолу у молярному співвідношенні 1:2, в системі розчинників (бензол – диметилформамід – діетиловий ефір) в умовах міжфазного каталізу дибензо-18-краун-6-ефіром в лужному середовищі синтезовано нове біс-похідне з фармакофорною групою =C=CBrCl, (III) (схема 1).

Схема 1



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 гетероциклічного біс-похідного (III) та його молекулярного комплексу з бактерійним лектином гострої токсичності показало, сполука (III) та її молекулярний комплекс відносяться до середньотоксичних: ЛД<sub>50</sub> їх становить 282 мг/кг та 235 мг/кг, відповідно.

Препарат порівняння – 5-фторурацил відноситься до середньотоксичних сполук та характеризується наступними значеннями токсичності: ЛД<sub>50</sub> 5-фторурацилу складає 372 мг/кг. Доза введеної речовини внутрішньоочеревинним способом становила від 235 до 282 мг/кг. У дослідних тварин спостерігалися тонічні судоми впродовж 1-2 годин, блювота (табл. 1).

Під час вивчення протипухлинної активності значний інтерес становило похідне загального анестетика фторотану та бензимидазолу (III), як найбільш близької за хімічною будовою до пурину сполуки. Сполука N<sub>(1)</sub>, N<sub>(1')</sub>-(2»-бром-2»-хлоретеніл)-біс-(бензимидазол) (III) була вивчена в онкофармакологічних експериментах з використанням пухлини головного мозку людини (операційний та біопсійний матеріал) в підкапсульному тесті за методом Богдана [12].

Таблиця 1

### Параметри токсичності сполуки (III) та її молекулярного комплексу з бактерійним лектином *Vacillus polytuxa* 102 KGU у порівнянні з 5-фторурацилом

Сполука, препарат порівняння	ЛД <sub>50</sub> (миші, мг/кг)	Молекулярний комплекс, препарат порівняння	ЛД <sub>50</sub> (миші, мг/кг)
N <sub>(1)</sub> , N <sub>(1')</sub> -(2»-бром-2»-хлоретеніл)-біс-(бензимидазол) (III)	282	<i>Vacillus polytuxa</i> 102 KGU-N <sub>(1)</sub> , N <sub>(1')</sub> -(2»-бром-2»-хлоретеніл)-біс-(бензимидазол) (III)	235
5-фторурацил	375	5-фторурацил	375

Таблиця 2

### Протипухлинна активність сполуки N<sub>(1)</sub>, N<sub>(1')</sub>-(2»-бром-2»-хлоретеніл)-біс-(бензимидазол) (III) при застосуванні у мишей-носіїв пухлин

Сполука	Зменшення маси гетеротрансплантату пухлини, мг	Гальмування росту пухлини, %
Гетеротрансплантати злоякісної гліоми людини		
N <sub>(1)</sub> , N <sub>(1')</sub> -(2»-бром-2»-хлоретеніл)-біс-(бензимидазол) (III)	1,51 ± 0,102	43,8

Маса гетеротрансплантату пухлини після дії сполуки N<sub>(1)</sub>, N<sub>(1')</sub>-(2»-бром-2»-хлоретеніл)-біс-(бензимидазол) (III) зменшилася до 1,51 ± 0,102 мг (43,8% гальмування росту пухлини), що підтверджено при проведенні морфологічного контролю (табл. 2).

При порівняльному гістологічному дослідженні клітинно-тканевих реакцій пухлини при лікуванні потенційною протипухлинною сполукою (III) в умовах субклітинного тестування встановлена залежність між вираженими регресивними змінами пухлин та рівнем гальмування їх росту. Зазначений ефект вважається вираженим щодо подальшого вивчення сполуки (III) при пухлинах головного мозку.

Певний інтерес становило дослідження протипухлинної активності створеного нами молекулярного комплексу сполуки (III) з бактерійним лектином *Vacillus polytuxa* 102 KGU на моделі експериментальної пухлининого зросту – Лімфосаркомі Гліса, оскільки раніше нами було досліджено аналогічні молекулярні комплекси на основі 5(6)-заміщених урацилів та бактерійних лектинів на вказаній моделі пухлини та отримано позитивні результати [13] (табл. 3).

Гальмування росту пухлини при застосуванні молекулярного комплексу: *Vacillus polytuxa* 102 KGU - N<sub>(1)</sub>, N<sub>(1')</sub>-(2»-бром-2»-хлоретеніл)-біс-(бензимидазол) (III) сягало 80% за масою, а препарату порівняння – 5-фторурацилу відповідно 55% (критерій значущості ≥ 50% гальмування пухлинного росту). Як показали досліди, молекулярний комплекс має виражену здатність гальмувати експериментальний пухлинний рост, перевищуючі за протипухлинною дією у проведених дослідах препарат порівняння – 5-фторурацил.

**Специфічна протипухлинна активність молекулярного комплексу сполуки (III) з бактерійним лектином *Vacillus polytuxa* 102 KGU в порівнянні з 5-фторурацилом на Лімфосаркомі Пліса**

Молекулярний комплекс	Доза, мг/кг	Середня вага пухлин, контроль, г	Середня вага пухлин, дослід, г	Гальмування росту пухлин, %
Лімфосаркома Пліса				
<i>Vacillus polytuxa</i> 102KGU - N <sub>(1)</sub> ,N <sub>(1')</sub> -(2''-бром-2''-хлоретеніл)-біс-(бензimidазол) (III)	35	13.9±1.93	2.5±1.3	80.0
5-фторурацил	35	13.9±1.93	2.5±1.3	55.0

Таким чином, можна зробити висновок, що сполука N(1),N(1')-(2''-бром-2''-хлоретеніл)-біс-(бензimidазол) (III) та її молекулярний комплекс з бактерійним лектином штаму *Vacillus polytuxa* 102 KGU, які мають високу протипухлинну активність на деяких штаммах пухлинної хвороби, а саме на моделях експериментального пухлинного росту – Лімфосаркомі Пліса та злоякісній гліобластомі людини з використанням пухлини головного мозку людини (операційний та біопсійний матеріал) в підкапсульному тесті за методом Богдана, значно перевищують протипухлинну активність препарату порівняння 5-фторурацилу, що дозволяє розглядати їх як фізіологічно активні сполуки з перспективою подальшого вивчення за вимогами до потенційних протипухлинних засобів для лікування людини.

#### Висновки

За новим, розробленим нами методом синтезу, взаємодією фторотану у якості фторвмісного синтону та бензimidазолу (молярне співвідношення 1:2) в системі розчинників (бензол–диметилформамід–діетиловий

ефір) в умовах міжфазного каталізу дибензо-18-краун-6-ефіром в лужному середовищі синтезовано нове біс-похідне з фармакофорною групою.

Створено молекулярний комплекс біс-похідного бензimidазолу з найбільш активним продуцентом позаклітинних лектинів – сапрофітною культурою *Vacillus polytuxa* 102 KGU.

Встановлено, що сполука – біс-похідне бензimidазолу та її молекулярний комплекс відносяться до середньотоксичних: LD<sub>50</sub> їх становить 282 мг/кг та 235 мг/кг, відповідно.

При використанні пухлини головного мозку людини (операційний та біопсійний матеріал) в підкапсульному тесті за методом Богдана, на підставі результатів експериментально-морфологічних досліджень в умовах субкапсулярного тестування, встановлено виражений протипухлинний ефект на пухлинну клітину біс-похідного бензimidазолу з відсотком гальмування 43,8%.

Для молекулярного комплексу: *Vacillus polytuxa* 102 KGU – N<sub>(1)</sub>,N<sub>(1')</sub>-(2''-бром-2''-хлоретеніл)-біс-(бензimidазол) зареєстровано значну протипухлинну дію відносно Ліфосаркоми Пліса (80%).

#### Література

1. Noordhuis P. 5-fluorouracil incorporation into RNA and DNA in relation to thymidilate synthetase inhibition human colorectal cancer / P. Noordhuis, U. Holwerda // *Annals of oncol.* – 2004. – Vol. 15. – P. 1025-1032.
2. 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.
3. Longley D.B. Mechanisms of action of 5-fluorouracil / D.B. Longley, D.P. Harkin // *Nature Rev. Cancer.* – 2004. – Vol. 4. – P. 230-238.
4. Orjales A. New 2-piperazinylbenzimidazole derivatives as 5-HT<sub>3</sub> antagonists. Synthesis and pharmacological evaluation / A. Orjales, R. Mosquera, L. Labeage, R. Rodes // *J. Med. Chem.* – 1997. – Vol. 40, N 4. – P. 586-593.
5. Мнджоян А.Л., Биологические свойства химических соединений / А.Л. Мнджоян, Ю.З. Тер-Захарян. – Ереван: Изд. АН Арм.ССР, 1962. – Вып. 1. – 246 с.
6. Ягупольский Л.М. Ароматические и гетероциклические соединения с фторсодержащими заместителями / Л.М. Ягупольский. – К.: Наукова думка, 1988. – С. 90-105.
7. Welchinska Hel.V. Biological activity of bacterial lectins and their molecular complexes with heterocyclic bis-adducts / Hel.V. Welchinska, B. Piecuszak, E.A. Kovalenko, N.I. Sharykina and al. // *Мікробіол. журн.* – 2003. – Т.65, №6. – С. 20-25.
8. Коваленко Э.А. Поиск продуцентов лектинов среди некоторых видов дрожжей / Э.А. Коваленко, С.С. Нагорная, Е.И. Гетьман и др. // *Мікробіол. журн.* – 2001. – Т.63, № 5. – С. 44-48.
9. Подгорский В.С. Поиск продуцентов лектинов среди дрожжей рода *Pichia Hansen emend. Kurtzman* / В.С. Подгорский, Э.А. Коваленко, С.С. Нагорная и др. // *Мікробіол. журн.* – 2002. – Т.64, № 3. – С. 13-19.
10. Прозоровский В.Б. Экспресс метод определения средней эффективности дозы и ее ошибки / В.Б. Прозоровский, В.П. Прозоровский, В.М. Демченко // *Фармакол. и 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. Шарыкина Н.И. Фармакологические свойства и механизм действия новых веществ с противоопухолевой активностью (фосфорилированные хлорэтиламины, хлорэтилгидразиды, гидразинопиримидин): автореф. дис. на соискание науч. степени докт. мед. наук: спец. 03.00.05 «Фармакология» / Н.И. Шарыкина. – Киев, 1980. – 460 с.
13. Вельчинська О.В. Модифікації молекул 5(6)-заміщених урацилів та протипухлинна активність їх нових похідних / О.В. Вельчинська // *Наук. зап. Терноп. нац. пед. ун-ту. Сер. Біол.* – 2009. – Вип. 40, № 3. – С. 41-46.

#### Відомості про авторів:

Вельчинська О. В., к. хім. наук, доцент каф. біоорганічної, біол. та фарм. хімії НМУ ім. О.О. Богомольця.  
 Шарикіна Н. І., д. мед. н., професор, зав. відділу онкофармакології Інституту фармакології та токсикології АМН України.  
 Ніженковська І. В., д. мед. н., зав. каф. біоорганічної, біол. та фарм. хімії НМУ ім. О.О. Богомольця.  
 Коваленко Е. О., д. біол. н., ст. наук. співробітник Інституту мікробіології і вірусології ім. Д.К. Заболотного.  
**Адреса для листування:** Вельчинська Олена Василівна, 02068, Україна, м. Київ, вул. Анни Ахматової, 16 г, 14.  
 E-mail: elena\_www@ukr.net. Тел.: 585-52-81.