

ХІМІЧНО МОДИФІКОВАНІ ПОХІДНІ 5-МЕТИЛУРАЦИЛУ ТА ЇХ ПРОТИПУХЛИННА АКТИВНІСТЬ

О.В. Вельчинська

Національний медичний університет ім. О.О.Богомольця
(Київ)

Вступ

Одним з перспективних шляхів пошуку засобів лікування пухлинної хвороби є створення нових антиметаболітів піримідинового обміну, здатних впливати на структуру та функції нуклеїнових кислот та малих активних молекул [1]. Наявність цих речовин в організмі людини і обумовила актуальність дослідження їхньої ролі у фізіології макроорганізму. Вивчається використання малих активних молекул для фармакопейних форм медичних біологічних препаратів з метою інгібіції пухлинного росту. Актуальність досліджень підтверджується чисельними роботами вітчизняної та світової літератури [1-3].

Останнім часом значно зросла кількість досліджень щодо синтезу нових похідних 5-фторурацилу та його хімічних аналогів, вивчення їхньої біологічної активності. Оскільки ван-дер-ваальсові радіуси водню та фтору близькі, можна очікувати, що 5-фторурацил, або його похідні, будуть виконувати роль субстрату та/або інгібітору ферментів і переважно поглинатися тканинами пухлини. Молекули 5(6)-фтор(галоген)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. Крім того, введення фтор(галоген) вмісних фармакофорів в гетероциклічну молекулу призводить до підвищення розчинності сполук в ліпідах та робить лікарські засоби ефективнішими у зв'язку із легкістю їх транспортування в організмі [4, 5]. При цьому зазначена увага до фтормістких фрагментів у нових молекулах передбачає підсилення антиметаболітних властивостей сполук.

Проблеми екологічної та медичної генетики і клінічної імунології

Мета даної роботи полягає в хімічній модифікації молекули 5-метилурацилу з подальшим вивченням біологічної активності синтезованих похідних 5-метилурацилу, а саме: після конструювання потенційно активних структур розроблено нові препаративні методи синтезу оригінальних гетероциклів на основі 5-метилурацилу, а також фторвмістких синтонів - загального анестетика фторотану (2-бром-1,1,1-трифтор-2-хлоретану) або 1,1-діетилкарбокси-2-хлор-2-трифторметилетилену, досліджено параметри токсичності та протипухлинна активність нових похідних 5-метилурацилу.

Матеріали та методи дослідження

Об'єкти дослідження: нові гетероциклічні моно- та біс-похідні, які було синтезовано на основі 5-метилурацилу та фторотану або 1,1-діетилкарбокси-2-хлор-2-трифторметилетилену, що використовували у якості фторвмісних синтонів. Абсолютні розчинники одержували перегонкою над P_2O_5 або металевим натрієм, перегонкою у вакуумі або простою перегонкою; сушили над сульфатом магнію безводним. Індивідуальність синтезованих сполук контролювали методом ТШХ на пластинках Silufol-254 в системі ацетонітрил-гексан 2:1. ГРХ виконували на газорідинному хроматографі "Perkin Elmer" з УФ-детектором (виробник "Perkin", Germany). ІЧ спектри записували на спектрофотометрі UR-20 (виробник "Charles Ceise Hena", Germany). Спектри ІН ЯМР записували на приладах "Bruker WP-200" (виробник "Bruker", Switzerland), "Varian T-60" (виробник "Varian", USA) з робочою частотою 200-132 МГц в $DMSO-d_6$ з використанням тетраметилсилану як внутрішнього стандарту.

$N_{(11)}, N_{(11)}$ - (2'-бром-2'-хлоретеніл)-біс-(5-метилурацил) (I).
Приготування розчину № 1. 0,25 г гідроксиду калію (0,0044 моль); 0,025 г дибензо-18-краун-6-ефіру в 20 мл сухого бензолу перемішували при температурі 60°C біля 15 хвилин до утворення на стінках хімічного реактора білого полімерного нальоту, тобто утворення калієвого комплексу з дибензо-18-краун-6-ефіром. Отриманий розчин охолоджували до кімнатної температури, додавали до нього краплями розчин 0,87 г (0,0044 моль) фторотану в 20 мл сухого ефіру. Приготування розчину № 2. 1,11 г (0,0088 моль) 5-метилурацилу розчиняли в 40 мл сухого ДМФА при температурі 60°C. Гарячий розчин № 2 додавали краплями через діліль-

Актуальні проблеми фармації та фармакотерапії

ну лійку до розчину № 1, перемішували при температурі 60°C 11,5 годин, фільтрували у гарячому стані, охолоджували, відганяли простою перегонкою розчинника. Залишок - осад промивали 30 мл суміші діетиловий ефір-гексан (1:1), сушили у вакуумі водострумного насосу. Сполука **I** - кристалічний порошок кремового забарвлення, нестійкий до дії гарячого органічного розчинника; при перекристалізації розкладається до вихідного урацилу. Вихід 1,2 г (36,8%). Т пл. 265-268°C. Знайдено, %: С 37,60; Н 3,08; N 14,53. $C_{12}H_{10}BrClN_4O_4$. Обчислено, %: С 37,1; Н 2,58; N 14,38. ІЧ спектр (KBr), cm^{-1} : 515, 615(C-Hal); 1710, 1750(C=O); 2800, 3000 (CH₃). ¹H ЯМР: 1,712 (6H, д., ³J_{H,H} 5 Гц, 2CH₃); 7,229 (2H, д., ³J_{H,H} 5 Гц, 2C₍₆₎H); 10,7 (2H, уш. с., 2N₍₃₎H).

Аналогічно синтезували сполуки: $N_{(1)}$ -(1',1'-дифтор-2'-бром-2'-хлоретил)-5-метилурацил (**II**), $N_{(1)}$ -(2'-бром-1'-гідрокси-2'-хлоретеніл)-5-метилурацил (**III**) із 1,54 г (0,84 мл; 0,0079 моль) фторотану та 1,0 г (0,0079 моль) 5-метилурацилу.

Сполука **II** - кристалічний осад кремового забарвлення. Вихід 0,76 г (32%). Т пл. 277-280°C. Знайдено, %: С 26,9; Н 1,88; N 9,19; Br 26,21. $C_7H_6BrClF_2N_2O_3$. Обчислено, %: С 27,7; Н 1,99; N 9,23; Br 26,32. ІЧ спектр (KBr), cm^{-1} : 550-690 (C-Hal); 1710, 1750 (C=O); 2820-3000 (CH₃). ¹H ЯМР: 1,714 (3H, с., CH₃); 7,219 (H, с., C₍₆₎H); 10,580 (H, с., 2N₍₃₎H). Сполука **III** - кристалічний осад кремового забарвлення. Вихід 0,27 г (25%). Т пл. 272-276°C. Знайдено, %: С 30,0; Н 2,2; N 9,9. $C_7H_6BrClN_2O_3$. Обчислено, %: С 29,9; Н 2,2; N 10,0. ІЧ спектр (KBr), cm^{-1} : 550-690 (C-Hal); 1710, 1750 (C=O); 2820-3000 (CH₃); 3200-3400 (OH). ¹H ЯМР: 1,74 (3H, с., CH₃); 7,26 (H, с., C₍₆₎H); 10,62 (H, с., 2 N(3)H); 11,03 (H, с., OH).

1,1-діетилкарбоксі-2-трифторметил-2-(5'-метилуридил-N(1')-)-етилен (**IV**). Приготування розчину № 1. 6,13 г натрію металевого (0,268 моль) розчиняли в 250 мл метанолу безводного, додавали краплями через ділильну лійку 43,0 г діетилового ефіру малонової кислоти (40 мл; 0,268 моль) та 62,0 г трифтороцтової кислоти (40 мл; 0,543 моль) при перемішуванні реакційної суміші та нагріванні. Кип'ятили суміш протягом 6 годин, охолоджували до кімнатної температури, відганяли простою перегонкою розчинник. Залишок - скловидну масу білого кольору заливали діетиловим ефіром. Осад білого кольору (про-

дукт А), що випадав, відфільтровували та використовували на наступній стадії реакції. Приготування розчину № 2. 8,0 г (0,0287 моль) продукту А розчиняли у 55 мл сухого дихлоретану при кімнатній температурі, додавали 6 г (0,0287 моль) п'ятихлористого фосфору. Реакційна суміш нагрівалася та набувала молочного забарвлення. Гарячий розчин перемішували з кип'ятінням 5 годин, охолоджували; осад, що утворився відфільтровували та промивали дихлоретаном, відганяли розчинник простою перегонкою. Залишок - масло очищували перегонкою у вакуумі (продукт В). Вихід 6,31 г (80%). Т. кип. 56-59°C (25 мм рт. ст.), n^{25D} 1,3010. Знайдено, %: С 39,36; Н 3,67; F 20,75. $C_9H_{10}ClF_3O_4$. Обчислено, %: С 39,37; Н 3,64; F 20,76. Приготування розчину № 3. До суміші 0,87 г (0,0069 моль) 5-метилурацилу у 30 мл ДМФА та 0,71 г (0,94 мл; 0,0069 моль) триетиламіну безводного додавали по краплям 1,92 г (0,0069 моль) продукту В у 10 мл діетилового ефіру при перемішуванні реакційної суміші та нагріванні до 60-70°C. Кип'ятили суміш протягом 2-х годин, фільтрували гарячий розчин та відділяли осад $N(C_2H_5)_3 \cdot HCl$, розчинники відганяли у вакуумі. Залишок - масло жовтого забарвлення заливали гексаном та кип'ятили, зливали гексан декантацією, заливали ацетоном, осад блідо-кремового забарвлення випадав із ацетону (продукт С - **IV**). Вихід 0,88 г (35%). Т пл. 272-275°C. Знайдено, %: С 46,13; Н 4,08; N 7,59. $C_{14}H_{15}N_2F_3O_6$. Обчислено, %: С 46,18; Н 4,15; N 7,68. ІЧ спектр (KBr), cm^{-1} : 400, 415, 470, 560 (CF₃); 600-800 (Heterocycl.); 905, 995, 1180, 1230, 1295 (CF₃); 1050-1150 (OCH₃, OC₂H₅); 1300-1600 (Heterocycl.); 1315, 1600 (C=C); 1710, 1715, 1735 (C=O); 3010-3080 (Heterocycl.). ¹H ЯМР: 1,18 (6H, т., ³J_{H,H} 7,0 Гц, 2CH₃); 1,76 (3H, с., CH₃ при C₍₆₎H); 3,737- 4,315 (4H, м., ³J_{H,H} 7,0 Гц, 2OCH₂); 7,78 (1H, д., ³J_{H,H} 10,0 Гц, C₍₆₎H); 8,57 (1H, с., N₍₃₎H).

Під час проведення хіміко-біологічних досліджень нами були відібрано серед значної кількості синтезованих преформованих піримідинів та досліджені сполуки із значущою протипухлинною дією [6]. Слід зазначити, що в молекулах більшості із цих сполук гетероциклічні фрагменти пов'язані залишком молекули загального анестетика фторотану, який широко використовується в хірургічній онкологічній практиці [7, 8].

Гостру токсичність (LD_{50}) вивчено у порівнянні з препаратом 5-фторурацил. Протипухлинну активність нових сполук $N_{(1)}, N_{(1)}$ -(2''-бром-2''-хлоретеніл)-біс-(5-метилурацил) (**I**), $N_{(1)}$ -(1',1'-дифтор-2'-бром-2'-хлоретил)-5-метилурацил (**II**), $N_{(1)}$ -(2'-бром-1'-гідрокси-2'-хлоретеніл)-5-метилурацил (**III**), 1,1-діетилкарбокси-2-трифторметил-2-(5'-метилуридил- $N_{(1)}$)-етилен (**IV**) досліджена з використанням операційного та біопсійного матеріалу з пухлиною мозку людини.

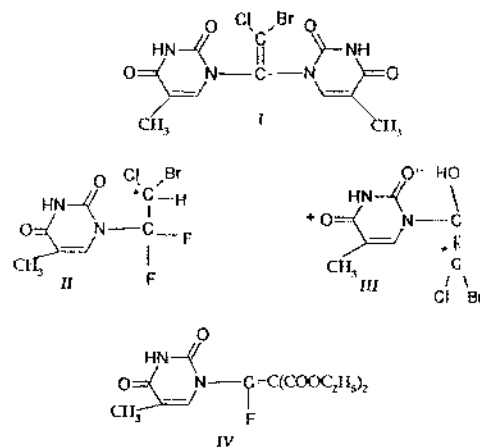
Дослідження параметрів гострої токсичності та протипухлинної активності моно- і біс-похідних 5-метилурацилу виконано в Інституті фармакології та токсикології АМН України. Вивчення гострої токсичності (LD_{50}) проведено на білих нелінійних мишах - самцях з масою тіла 22 ± 2 г при підшкірному шляху введення. Результати дослідження обраховано у альтернативній формі на 14 добу після введення. Статистична обробка проведена за [9]. Оскільки структурних аналогів синтезованих сполук в літературі не описано, препаратом порівняння був відомий протипухлинний лікарський засіб 5-фторурацил. Доза речовини при підшкірному шляху введення становила від 450 до 600 мг/кг. У піддослідних тварин спостерігалися тонічні судоми впродовж 1-2 годин, блювання.

Отримані результати та їх обговорення

За новими, розробленими нами методами синтезу, взаємодією фторотану у якості фторвмісного синтону з 5-метилурацилом у молярному співвідношенні 1:2 та 1:1 в системі розчинників (бензол-ДМФА-діетиловий ефір) в умовах міжфазного каталізу дибензо-18-краун-6-ефіром (лужне середовище) синтезовано нові моно- та біс-похідні 5-метилурацилу з фармакофорними групами $=C=SBBrCl$, $-CF_2-CHBrCl$, $-(HO)C=SBBrCl$ (**I-III**), а при взаємодії іншого фторвмісного синтону 1,1-діетилкарбокси-2-хлор-2-трифторметилетилену з 5-метилурацилом в еквімолярних кількостях в системі розчинників (діетиловий ефір-ДМФА-гексан-ацетон) синтезовано оригінальне похідне **IV** наступної формули (схема 1).

Дослідження гострої токсичності синтезованих сполук **I-IV** (табл.) показало, що монопохідні 5-метилурацилу **II-IV** та біс-похідне 5-метилурацилу **I** менш токсичні (у 1,27-1,515 рази), ніж 5-фторурацил. Значення їх LD_{50} знаходяться в межах від 479 мг/кг до 568 мг/кг.

Проблеми екологічної та медичної генетики і клінічної імунології



Таблиця
Параметри токсичності сполук **I-IV** у порівнянні з 5-фторурацилом

№ п/п	Сполука	LD_{50} , мг/кг
1.	$N_{(1)}, N_{(1)}$ -(2''-бром-2''-хлоретеніл)-біс-(5-метилурацил) (I)	515
2.	$N_{(1)}$ -(1',1'-дифтор-2'-бром-2'-хлоретил)-5-метилурацил (II)	485
3.	$N_{(1)}$ -(2'-бром-1'-гідрокси-2'-хлоретеніл)-5-метилурацил (III)	479
4.	1,1-діетилкарбокси-2-трифторметил-2-(5'-метилуридил- $N_{(1)}$)-етилен (IV)	568
5.	5-фторурацил (препарат порівняння)	375

Протипухлинна дія синтезованих сполук **I-IV** досліджена в експериментах з використанням пухлини головного мозку людини (операційний та біопсійний матеріал) в підкапсульному тесті за методом Богдана. При лікуванні гліобластоми людини критерієм значущості був відсоток гальмування росту гетеротрансплантату гліоми людини понад 25%. Курс лікувальних впливів становив 6 введень через добу при внутрішньоочеревинному шляху введення, в інтервалі доз $1/4$ - $1/5$ LD_{50} . Результати обраховано через 24 години після закінчення лікування [10]. Виявлено, що протипухлинна активність біс-похідного 5-метилурацилу **I** значно перевищує прийнятий критерій значущості (>25,0% гальмування пухлинного росту). Маса гетеротрансплантату злоякісної гліоми після дії біс-похідного 5-метилурацилу **I** зменшилася до $1,85 \pm 0,091$ мг.

Актуальні проблеми фармації та фармакотерапії

що відповідає за результатами морфологічного контролю 29,8% гальмування росту пухлини. Це в 1,2 рази більше прийнятого критерію активності при лікуванні гліобластоми 25%, що підтверджено при проведенні морфологічного контролю. При порівняльному гістологічному дослідженні клітинно-тканевих реакцій пухлини при лікуванні потенційною протипухлинною сполукою - біс-похідним 5-метилурацилом **I** в умовах субклітинного тестування встановлено залежність між вираженими регресивними змінами пухлин та рівнем гальмування їх росту. Зазначений ефект вважається вираженням щодо подальшого вивчення біс-похідного 5-метилурацилу **I** при пухлинах головного мозку.

Визначення одного з головних фармакологічних індексів моно- та біс-похідних 5-метилурацилу **I-IV** - гострої токсичності показало, що синтезовані сполуки відносяться до малотоксичних: значення LD_{50} їх знаходяться в межах від 479 мг/кг до 568 мг/кг. Вони у 1,27-1,515 рази менш токсичні, ніж препарат порівняння 5-фторурацил. Виявлено, що біс-похідне 5-метилурацилу **I** має значну протипухлинну дію відносно гетеротрансплантату гліоми людини (29,8%), що у 1,2 рази більше прийнятого критерію активності при лікуванні гліобластоми 25%.

Висновки

1. За новими, розробленими нами методами синтезу, взаємодією фторотану або іншого фторвмісного синтону 1,1-діетилкарбокси-2-хлор-2-трифторметилетилену з 5-метилурацилом в молярному співвідношенні 1:2 або еквімолярних кількостях, в умовах міжфазного каталізу дибензо-18-краун-6-ефіром, синтезовано нові моно- та біс-похідні 5-метилурацилу з фармакофорними групами.

2. Встановлено, що синтезовані моно- та біс-похідні 5-метилурацилу відносяться до малотоксичних: значення LD_{50} їх знаходяться в межах від 479 мг/кг до 568 мг/кг. Вони у 1,27-1,515 рази менш токсичні, ніж препарат порівняння 5-фторурацил.

3. При використанні пухлини головного мозку людини (операційний та біопсійний матеріал) в підкапсульному тесті за методом Богдана, на підставі результатів експериментально-морфологічних досліджень зареєстровано виражений протипухлинний ефект біс-похідного 5-метилурацилу з відсотком гальмування пухлинного росту 29,8% (критерій значущості $\geq 25\%$).

Проблеми екологічної та медичної генетики і клінічної імунології

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 Oncology*. - 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. Барлоу Р. Введение в химическую фармакологию / Р.Барлоу. - М.: Изд. ин. лит., 1959. - 107 с.

5. Ягупольский Л.М. Ароматические и гетероциклические соединения с фторсодержащими заместителями / Л.М.Ягупольский. - Киев: Наукова думка, 1988. - С. 90-105.

6. Biological activity of bacterial lectins and their molecular complexes with heterocyclic bis-adducts / Hel.V. Welchinska, B. Piecuszak, E.A. Kovalenko, N.I. Sharykina [e.a.] // *Мікробіол. журн.* - 2003. - Т.65, № 6. - С. 20-25.

7. Brody G.L. Halothane anesthesia as a possible cause of massive hepatic necrosis / G.L.Brody, R.B.Sweet // *Anesthesiology*. - 1963. - Vol. 24. - P. 29-37.

8. Brown B.R. Biotransformation and hepatotoxicity of halothane / B.R.Brown, I.G.Sipes // *Biochem. Pharmacol.* - 1977. - Vol. 26. - P. 2091-2094.

9. Прозоровский В.Б. Экспресс метод определения средней эффективности дозы и ее ошибки / В.Б. Прозоровский, В.П. Прозоровский, В.М. Демченко // *Фармакология и токсикология*. - 1978. - Т. 41, № 4. - С. 407-509.

10. 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.

Резюме

Вельчинська О.В. Хімічно модифіковані похідні 5-метилурацилу та їх протипухлинна активність.

Описано нові препаративні методи синтезу в умовах каталізу 18-краун-6-комплексом оригінальних гетероциклів на основі 5-метилурацилу та фторвмісних синтонів - фторотану та 1,1-диетилкарбокси-2-хлор-2-трифторметилетилену. Встановлено, що синтезовані моно- та біс-похідні 5-метилурацилу відносяться до малотоксичних: значення ЛД₅₀ їх знаходяться в межах від 479 мг/кг до 568 мг/кг. Виявлено значущий протипухлинний ефект біс-похідного 5-метилурацилу на гетеротрансплантатах злоякісної гліоми людини з відсотком гальмування росту пухлини 29,8% (критерій значущості > 25%).

Ключові слова: 5-метилурацил, фторотан, пухлина, гліома, токсичність.

Резюме

Вельчинская Е.В. Химически модифицированные производные 5-метилурацила и их противоопухолевая активность.

Описаны новые препаративные методы синтеза в условиях катализа 18-краун-6-комплексом оригинальных гетероциклов на основе 5-метилурацила и фторсодержащих синтонов - фторотана и 1,1-диэтилкарбокси-2-хлор-2-трифторметилэтилена. Установлено, что синтезированные моно- и бис-производные 5-метилурацила относятся к малотоксичным: значения ЛД₅₀ их находятся в интервале от 479 мг/кг до 568 мг/кг. Обнаружен значительный противоопухолевый эффект бис-производного 5-метилурацила на гетеротрансплантатах злокачественной глиомы человека с процентом торможения роста опухоли 29,8% (критерий значимости > 25%).

Ключевые слова: 5-метилурацил, фторотан, опухоль, глиома, токсичность.

Summary

Welchinska E.V. Chemical modified derivatives of 5-methyluracile and its antitumour activity.

A new convenient methods for the preparation with 18-crown-6-complex as catalyst of original heterocycles on the base of 5-methyluracile and fluorine containing sintones - fluorotan and 1,1-diethylcarboxy-2-chloro-2-threelfluoromethylethylene were described. It was discovered that mono- and bis derivatives of 5-methyluracile which synthesized applies to a little toxic preparations: its LD₅₀ are at the interval from 479 mg/kg to 568 mg/kg. A strongly antitumour effect of bis derivative of 5-methyluracile on the heterotransplantates of man's glioma cancer with percents of growth relaxation of cancer 29,8% has been discovered (the criteria of considerable are > 25 %).

Key words: 5-methyluracile, fluorotan, tumour, glioma, toxicity.

Рецензент: д.мед.н., проф. Л.В.Савченкова

ВИКОРИСТАННЯ МЕКСИКОРУ У ЛІКУВАННІ ХВОРИХ МОЛОДОГО ВІКУ ІЗ ГІПЕРТОНІЧНОЮ ХВОРОБОЮ В ПОЄДНАННІ З ХРОНІЧНИМ БЕЗКАМ'ЯНИМ ХОЛЕЦИСТИТОМ

В.Ю.Гусач

ДЗ «Луганський державний медичний університет»

Введення

Результати досліджень свідчать про те, що захворювання серцево-судинної системи залишаються головною проблемою в медицині. Це пов'язано з високою захворюваністю [3,5]. Але частота захворювань печінки та гепатобілярної системи в Україні також збільшується, що пов'язано з якістю харчових продуктів, несприятливими екологічними умовами, вживанням алкоголю тощо [5,6]. Захворювання гепатобілярної системи мають тенденцію до хронізації процесу, а це, в свою чергу, веде до інвалідизації хворих та погіршенню якості життя [9].

Відомо, що регуляція перекисації ліпідів (ПОЛ) здійснюється через систему антиоксидантного захисту [7]. Порушення рівноваги між процесами ліпопероксидації та антиоксидантною системою призводить до лавиноподібної реакції переокислення, яка закінчується загибеллю клітин. Інтенсифікація ліпопероксидації нерідко супроводжується пригніченням антирадикальної забезпеченості [4].

Тому дуже перспективним в лікуванні хворих з коморбідною патологією є застосування препаратів, які впливають на метаболічні показники та таким чином поліпшують якість життя хворих [1,2,8].

Зв'язок роботи з науковими програмами, планами, темами. Робота виконана у відповідності з основним планом науково-дослідних робіт (НДР) Луганського державного медичного університету і є фрагментом теми НДР "Реабілітація хворих зі сполученою терапевтичною патологією" (№ держреєстрації 0106U0010837).