



НОВЫЕ *N*-ГИДРОКСИ-, *N*-МЕТОКСИ- И *N*-АЦЕТОКСИБЕНЗОИЛ-ЗАМЕЩЕННЫЕ ПРОИЗВОДНЫЕ ТИМИНА И УРАЦИЛА ДЛЯ ПРОФИЛАКТИКИ И ЛЕЧЕНИЯ ОТДАЛЕННЫХ ОСЛОЖНЕНИЙ САХАРНОГО ДИАБЕТА

© 2019 г. А. А. Спасов*, **, ***, А. К. Брель*, Р. А. Литвинов*, ***, #, С. В. Лисина*, А. Ф. Кучерявенко*, Ю. Н. Будаева*, О. А. Салазникова*, А. И. Ращенко*, Д. Д. Шамшина*, В. В. Батраков*, А. В. Иванов*

*ФГБОУ ВО Волгоградский государственный медицинский университет Минздрава России
Россия, 400131, Волгоград, Площадь Павших Борцов, 1

**Волгоградский медицинский научный центр
Россия, 400081, Волгоград, ул. Рокоссовского, 1Г

***НИИ Фармакологии ВолГМУ
Россия, 400001, Волгоград, ул. Пугачевская, 3

Поступила в редакцию 25.06.2018 г.

После доработки 02.07.2018 г.

Принята к публикации 09.07.2018 г.

Синтезированы 14 новых производных урацила и тимина – N^1 -, N^3 - и N^1, N^3 -(*RO*-бензоил)-(1*H*,3*H*)-пиримидин-2,4-дионов (где *RO*- это гидрокси-, ацетокси- или метокси-группа). Соединения исследованы в комплексе тестов *in vitro* на способность тормозить развитие отдаленных осложнений диабета. Оценена их способность разрушать поперечные сшивки белков, а также установлены антигликирующая, хелатирующая и антиагрегантная активности – наиболее значимые в качестве путей фармакологической коррекции тромбозов, ангио-, нефро-, энцефало- и кардиопатий. Наиболее активный по уровню антиагрегантного действия N^1 -гидроксибензоилурацил превзошел ацетилсалициловую кислоту на ~44%. По способности к хелатированию катионов меди(II) все соединения (за исключением 1,3-бис(3-гидроксибензоил)-(1*H*,3*H*)-пиримидин-2,4-диона – не исследован в данном тесте) проявили активность, по уровню IC_{50} укладывающуюся в диапазон между таковым показателем для препаратов сравнения пиоглитазона (44.1 мкМ) и пиридоксамина (136.7 мкМ). Наивысшее антигликирующее действие в 1 мМ концентрации было отмечено для N^1, N^3 -бисметокси- и N^1, N^3 -бисацетоксибензоил-производных тимина. Максимальная разрушающая поперечные сшивки активность ($C = 1$ мМ), сопоставимая по выраженности с активностью алагебриума, установлена для 1,3-бис(4-метоксибензоил)урацила, для которого отмечены также высокие показатели прочих оцениваемых активностей. Таким образом, N^1 -, N^3 - и N^1, N^3 -(*RO*-бензоил)-производные урацила и тимина перспективны в качестве основы для создания средств, подавляющих развитие отсроченных осложнений диабета.

Ключевые слова: сахарный диабет, отдаленные осложнения диабета, производные пиримидина, тимин, урацил

DOI: 10.1134/S0132342319010172

ВВЕДЕНИЕ

Сахарный диабет (СД) представляет собой комплексную медико-социальную проблему во всем мире, в том числе и в Российской Федерации. Основное заболевание сопровождается раз-

витием многочисленных осложнений. По данным общемирового медико-экономического анализа, ежегодные затраты на борьбу с СД и комплексом его осложнений, включая нефропатию, кардиопатию, ангиопатию, полинейропатию, энцефалопатию и др., составляют порядка 12% всего бюджетного финансирования здравоохранения [1]. Большая часть средств оказывается непрямые затраты из-за потери трудоспособности населения, связанной с развитием отдаленных осложнений, наибольший вклад среди

Сокращения: СД – сахарный диабет; АФК – активные формы кислорода; КПП – конечные продукты гликирования; ЯМР – ядерный магнитный резонанс; BSA – бычий сывороточный альбумин.

Автор для связи: (тел.: +7 (902) 361-87-70; эл. почта: litvinov.volggmu@mail.ru).

которых вносят сердечно-сосудистые заболевания [2]. Вместе с тем, отсутствуют надежные медикаментозные средства, способные предотвратить развитие отдаленных последствий СД, лечение и профилактика которых долгое время уходило на второй план в сравнении с разработкой средств коррекции уровня глюкозы [3].

В основе патогенеза наиболее жизнеугрожающих отдаленных осложнений СД (повреждение сердечно-сосудистой системы с развитием острой ишемизации), а также ряда полисистемных патологий, лежит общий механизм, заключающийся в нарушении структурной организации белков (коллагены, эластин, кристаллины, бета-амилоиды и др.) вследствие образования ковалентных связей между ними [4–8]. Процесс образования белок-белковых сшивок активно протекает в стромах органов и сосудов на фоне длительной гипергликемии и окислительного стресса, наблюдаемых при СД [4, 5, 9]. Подобные этому процессы сшивания отмечены при старении организма, болезни Альцгеймера, Паркинсона и др [6]. Образование поперечно-сшитых белков протекает по глюкозозависимому пути (гликирование аминокислотных остатков => основания Шиффа => продукты Амadorи => реакция Суйяма или Намики, или Ходжа => образование аминокадипата => сшивание) или окислительному пути (образование активных форм кислорода (АФК) => путь Штадмана => образование аминокадипата (или иного продукта окислительной деградации аминокислот) => сшивание) [7]. Оба пути включают окислительно-восстановительные реакции, катализируемые непосредственно катионами переходных металлов (Cu^{2+} , Fe^{2+} , Fe^{3+} и др.) или ускоряющиеся под воздействием АФК, образуемых металлами [7, 8]. Таким образом, новыми мишенями потенциальных лекарственных веществ, способных замедлять процесс развития осложнений СД, могут служить АФК и пути их образования, переходные металлы, включая влияние на их электронные свойства, обуславливающие катализ, этапы реакций образования конечных продуктов гликирования (КПГ), а также сами ковалентные белок-белковые связи, доступные для разрыва. Можно предположить, что влияние на перечисленные мишени и реакции способно замедлить развитие отсроченных осложнений СД. При этом, учитывая взаимосвязь процесса окислительной деградации аминокислот, зависящего от продукции АФК и присутствия переходных металлов, с образованием КПГ, о чем сказано выше, количественное выражение активности соединений в их влиянии на каталитическую и АФК-продуцирующую функции переходных металлов будет, ве-

роятно, соотноситься со способностью этих же веществ препятствовать протеканию реакции гликирования, т.е. с их антигликирующей активностью. То есть способность веществ связывать катионы переходных металлов и их антигликирующее действие должны, вероятно, соотноситься количественно. По некоторым литературным данным [10], способность соединений связывать переходные металлы и одновременно инактивировать продуцируемые ими АФК именуется “многофакторной антиоксидантностью с хелатирующим действием”. Делая заключение из вышеприведенного, можно предположить, что способность соединений быть антиоксидантами и/или связывать переходные металлы может быть использована в борьбе с отдаленными осложнениями СД.

Значительная часть исследований в современной медицинской химии связана с поиском новых биологически активных структур в качестве основ для создания лекарственных средств и с разработкой эффективных методов их синтеза. Производные пиримидина – тимин и урацил, представляют интерес вследствие наличия у некоторых их производных совокупности указанных выше свойств. Например, производные нитразолопиримидина разрушают поперечные сшивки гликированных белков, подавляют образование КПГ, а также связывают ионы меди [11].

Гемодинамике в условиях развития ангиопатий при СД препятствует усиление атерогенеза и повышение тромбообразования на фоне снижения фибринолиза [12]. Нарушение гемостаза связано с дисгликемией, а осложняющий течение заболевания атерогенез опосредован патологическим воспалением, частично определяемым нарушенным антиоксидантным статусом организма. В настоящее время для борьбы с патологическим тромбообразованием широкое распространение получили антиагреганты (в числе которых ингибиторы циклооксигеназ, например, ацетилсалициловая кислота). В противостоянии развитию атеросклероза определенной эффективности в клинической практике, в особенности при диабете, удалось добиться, применяя вещества с антиоксидантным действием, например, пробукол, защищающий липопротеиды от пероксидации и подавляющий образование пенных клеток [13]. Рассматривая потенциальные возможности в создании новых соединений, влияющих на процессы тромбообразования, необходимо отметить, что для изомеров гидроксibenзойной кислоты установлено наличие антитромботической активности [14], следовательно, ее производные могут быть основой при создании средств с антиагрегатной активностью. Кроме этого, сооб-

щается, что вещества на основе пириимидина также проявляют антиагрегантное действие. Например, такое установлено для производных 2-аминопириимидина, 2-замещенных производных 4,6-диаминопириимидина, а также для полициклических соединений на его основе [15, 16]. А как показано в работе [11], нитразолопириимидины имеют также и признаки антиоксидантного действия, что выражено в торможении ими реакции автоокисления аскорбиновой кислоты. Приведенные данные придают дополнительную медико-фармакологическую значимость производным пириимидина, а также соединениям-аналогам гидроксibenзойной кислоты, и созданию на их основе новых антидиабетических средств.

Цель нашей работы – синтез и изучение биологических свойств новых *N*-(*RO*-бензоил)-пириимидинов (тиминовых и урациловых производных, где *RO*- это метокси-, ацетокси- или гидроксо-группа) как основы для создания потенциальных лекарственных средств для терапии осложнений СД.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Синтез целевых соединений осуществлялся реакцией ацилирования соответствующих азотистых оснований замещенными гидроксibenзоил-хлоридами в среде пиридина при комнатной температуре (схема).

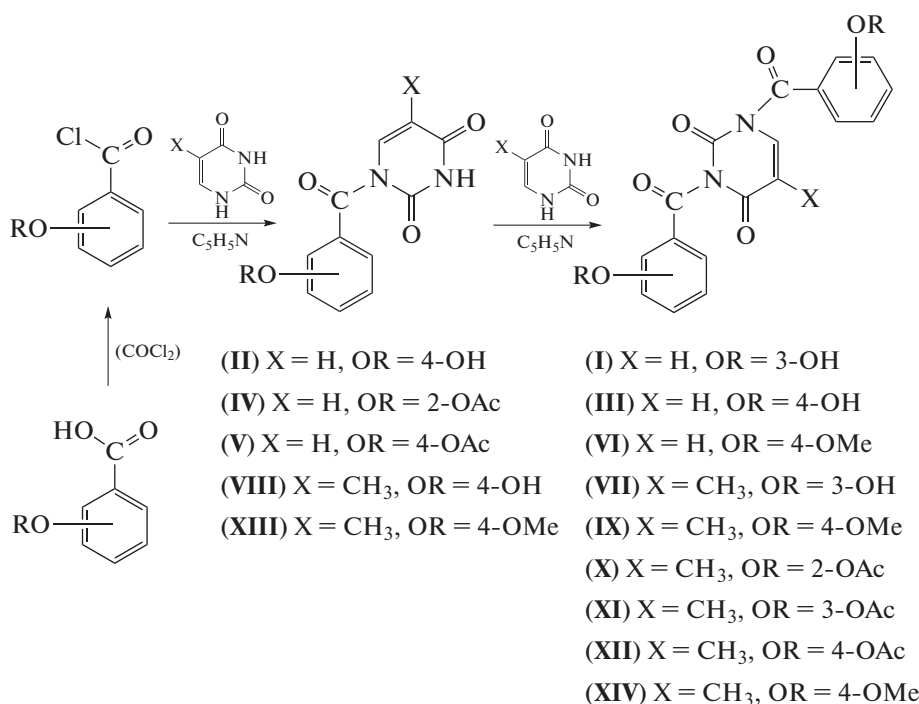


Схема.

*N*¹-Производные урацила и тимина синтезируются реакцией ацилирования соответствующего азотистого основания эквимольным количеством хлорангидрида *RO*-замещенной бензойной кислоты. Для получения *N*¹,*N*³-биспроизводных исходные реагенты использовались в соотношении 2 : 1; реакции проводили в пиридине при комнатной температуре. Таким образом, были синтезированы новые соединения (табл. 1), структура которых была подтверждена данными ¹H-ЯМР-спектроскопии (табл. 2).

Представленные экспериментальные модели оценки биологической активности имитируют отдельные этапы патогенеза отдаленных ослож-

нений СД. Методики, направленные на оценку медь-связывающей, антигликирующей и разрушающей поперечные шивки активности соединений, моделируют отдельные этапы метаболического пути образования поперечно-сшитых белков. Совокупные данные проведенных исследований биологической активности приведены в табл. 3.

В результате оценки антиагрегантного действия *N*-(*RO*-бензоил)-производных пириимидина мы установили, что для них характерно подавление ADP-индуцированной функциональной активности тромбоцитов при концентрации индуктора 5 мкМ. При анализе результатов соединений отметили, что производное (I) проявляет

Таблица 1. *N*-(*RO*-бензоил)-производные (1*H*,3*H*)-пиримидин-2,4-дионов (I)–(XIV). (См. схему)

Соединение	5- <i>X</i>	RO-заместитель в остатке <i>Bz</i>		Название
		N ¹	N ³	
(I)	H	3-ОН	3-ОН	1,3-Бис(3-гидроксибензоил)-(1 <i>H</i> ,3 <i>H</i>)-пиримидин-2,4-дион
(II)	H	4-ОН	H	1-(4-Гидроксибензоил)-(1 <i>H</i> ,3 <i>H</i>)-пиримидин-2,4-дион
(III)	H	4-ОН	4-ОН	1,3-Бис(4-гидроксибензоил)-(1 <i>H</i> ,3 <i>H</i>)-пиримидин-2,4-дион
(IV)	H	2-ОAc	H	1-(2-Ацетоксибензоил)-(1 <i>H</i> ,3 <i>H</i>)-пиримидин-2,4-дион
(V)	H	4-ОAc	H	1-(4-Ацетоксибензоил)-(1 <i>H</i> ,3 <i>H</i>)-пиримидин-2,4-дион
(VI)	H	4-OMe	4-OMe	1,3-Бис(4-метоксибензоил)-(1 <i>H</i> ,3 <i>H</i>)-пиримидин-2,4-дион
(VII)	CH ₃	3-ОН	3-ОН	1,3-Бис(3-гидроксибензоил)-5-метил-(1 <i>H</i> ,3 <i>H</i>)-пиримидин-2,4-дион
(VIII)	CH ₃	4-ОН	H	1-(4-Гидроксибензоил)-5-метил-(1 <i>H</i> ,3 <i>H</i>)-пиримидин-2,4-дион
(IX)	CH ₃	4-ОН	4-ОН	1,3-Бис(4-гидроксибензоил)-5-метил-(1 <i>H</i> ,3 <i>H</i>)-пиримидин-2,4-дион
(X)	CH ₃	2-ОAc	2-ОAc	1,3-Бис(2-ацетоксибензоил)-5-метил-(1 <i>H</i> ,3 <i>H</i>)-пиримидин-2,4-дион
(XI)	CH ₃	3-ОAc	3-ОAc	1,3-Бис(3-ацетоксибензоил)-5-метил-(1 <i>H</i> ,3 <i>H</i>)-пиримидин-2,4-дион
(XII)	CH ₃	4-ОAc	4-ОAc	1,3-Бис(4-ацетоксибензоил)-5-метил-(1 <i>H</i> ,3 <i>H</i>)-пиримидин-2,4-дион
(XIII)	CH ₃	4-OMe	H	1-(4-Метоксибензоил)-5-метил-(1 <i>H</i> ,3 <i>H</i>)-пиримидин-2,4-дион
(XIV)	CH ₃	4-OMe	4-OMe	1,3-Бис(4-метоксибензоил)-5-метил-(1 <i>H</i> ,3 <i>H</i>)-пиримидин-2,4-дион

наивысшую активность, значительно превышающую результат для ацетилсалициловой кислоты (однофакторный вариационный анализ, пост-тест Ньюмана-Кеулеса, $p < 0.05$). Соединение относится к урацил-производным, и является 1,3-бис(3-гидроксибензоил)-(1*H*,3*H*)-пиримидин-2,4-дионом. Антиагрегантная активность всех остальных синтезированных соединений была сопоставима с активностью ацетилсалициловой кислоты и, таким образом, можно заключить, что *RO*-бензоильный остаток в пиримидиновом гетероцикле является перспективным заместителем для направленного поиска средств с антиагрегантной активностью. Нарушение гемодинамики по механизму усиления тромбообразования является одним из значимых звеньев в патогенезе осложнений СД [17], а фармакологическая коррекция этого патологического процесса – важным вкладом в совокупное антидиабетическое действие.

При оценке медь-связывающей активности мы установили, что все соединения достаточно активны на модели медь-индуцированного аутоокисления аскорбиновой кислоты. Исключение составило соединение (I), уровень активности которого не удалось определить ввиду крайне высокой оптической плотности вещества при

265 нм, что является ограничением для соответствующей методики. Их значения IC_{50} по своей величине находились в диапазоне между таковым для контрольных пиридоксамина (136.7 мкМ) и пиоглитазона (44.1 мкМ). При этом ни одно из соединений статистически значимо не превзошло пиоглитазон по активности (табл. 3). Таким образом, все исследованные вещества можно считать хелаторами меди, имеющими достаточно высокий уровень данной активности, соотносимый с активностью пиоглитазона и/или пиридоксамина.

В результате проведенного структурно-функционального анализа соединений при оценке установленных по данной методике результатов, мы выявили соответствие между наличием более высокой хелатирующей активности и присутствием в качестве заместителя в бензоил-радикале метокси-группы (соединения (VI), (XIII) и (XIV)), но не гидрокси- или ацетокси-групп, носители которых имеют более низкую активность. Однако мы также отметили, что на проявление данной активности, вероятно, системное влияние оказывает и молекулярный кор. Соединения на основе урацила оказались способны более активно связывать медь в реакции аутоокисления аскорбиновой кислоты, чем производные тими-

Таблица 2. Характеристики полученных *N*-(*RO*-бензоил)-замещенных пиримидиндионов

Соединение	Выход, %	$T_{пл}$, °C	Спектры 1H -ЯМР (DMSO- d_6), δ , м.д.
(I)	71	321–323	8.25–8.23 (1 H, д, Pуг), 7.86–7.82 (2 H, м, C ₆ H ₄), 7.75–7.72 (2 H, м, C ₆ H ₄), 7.30–7.26 (2 H, т, C ₆ H ₄), 7.08 (2 H, с, OH), 6.95–6.94 (2 H, м, C ₆ H ₄), 5.48–5.45 (1 H, д, Pуг)
(II)	81	355–356	6.86–7.89 (4 H, м, C ₆ H ₄), 5.87–5.89 (1 H, д, Pуг), 7.90–7.92 (1H, д, Pуг), 1.86 (3H, с, CH ₃), 10.27 (1 H, с, OH), 11.48 (1 H, с, NH)
(III)	76	348–350	8.16–8.14 (1H, д, Pуг), 8.19 (2H, с, OH), 7.39–7.37 (4H, д, C ₆ H ₄), 6.82–6.80 (4H, м, C ₆ H ₄), 5.47–5.45 (1H, д, Pуг)
(IV)	72	338–339	7.14–7.81 (4 H, м, C ₆ H ₄), 5.86–5.88 (1 H, д, Pуг), 7.85–7.88 (1 H, д, Pуг), 2.38 (3H, с, OC(O)CH ₃), 11.48 (1 H, с, NH)
(V)	77	319–320	7.28–7.85 (4 H, м, C ₆ H ₄), 5.87–5.89 (1 H, д, Pуг), 7.87–7.89 (1 H, д, Pуг), 2.31 (3H, с, OC(O)CH ₃), 11.48 (1 H, с, NH)
(VI)	82	319–322	7.92–7.88 (1H, д, Pуг), 7.73–7.68 (4H, м, C ₆ H ₄), 7.33 (1H, д, Pуг), 7.05–7.01 (4H, м, C ₆ H ₄), 3.85 (6H, с, –CH ₃)
(VII)	80	313–314	6.93–8.22 (4 H, м, C ₆ H ₄), 8.22 (1H, с, Pуг), 1.80 (3H, с, CH ₃), 9.72 (2 H, с, OH)
(VIII)	73	382–383	6.84–7.62 (4 H, м, C ₆ H ₄), 8.07 (1H, с, Pуг), 1.86 (3H, с, Pуг, CH ₃), 10.27 (1 H, с, OH), 11.48 (1 H, с, NH)
(IX)	77	384–385	6.78–7.76 (8 H, м, C ₆ H ₄), 8.06 (1H, с, Pуг), 1.80 (3H, с, CH ₃), 10.27 (2H, с, OH)
(X)	86	331–332	7.16–7.96 (8 H, м, C ₆ H ₄), 7.89 (1H, с, Pуг), 2.38 (6H, с, OC(O)CH ₃), 1.91 (3H, с, CH ₃)
(XI)	79	309–310	7.38–7.99 (8 H, м, C ₆ H ₄), 8.04–8.05 (1H, д, Pуг), 2.28 (6H, с, OC(O)CH ₃), 1.80 (3H, с, CH ₃)
(XII)	84	312–313	7.28–7.91 (8 H, м, C ₆ H ₄), 8.06–8.07 (1H, д, Pуг), 2.31 (6H, с, OC(O)CH ₃), 1.80 (3H, с, CH ₃)
(XIII)	88	328–329	7.02–7.88 (4 H, м, C ₆ H ₄), 8.07 (1H, с, Pуг), 3.86 (3H, с, OCH ₃), 1.86 (3H, с, CH ₃), 11.48 (1 H, с, NH)
(XIV)	69	323–324	6.94–7.90 (8 H, м, C ₆ H ₄), 8.06 (1H, с, Pуг), 3.86 (6H, с, OCH ₃), 1.80 (3H, с, CH ₃)

Pуг – пиримидин.

на, а уровень активности соединений на основе урацила был выше по показателю IC₅₀.

В целом, учитывая особенности модели ауто-окисления аскорбиновой кислоты, способность соединений оказывать антиоксидативное и хелатирующее действие в системе, в которой индуктором окисления является катион переходного металла, позволяет дополнительно рассматривать (*RO*-бензоил)-содержащие производные пиримидина как соединения, способные вести фармакологическую коррекцию окислительного стресса в условиях СД, в частности, сопровождающегося нарушенным гомеостазом переходных металлов. Данный подход потенциально пер-

спективен в терапии отдаленных осложнений СД с учетом особенностей их патогенеза [9].

При оценке антигликирующей активности *N*-(*RO*-бензоил)-производных пиримидина в концентрации 1 мМ мы отметили наличие статистически значимой активности для соединений (II), (VI), (XII), (XIII) и (XIV). Соединения различаются как заместителем в *RO*-бензоильном остатке, так и по числу *N*-замещений (моно- и дизамещенные) в пиримидиновом цикле. Однако при визуальном сопоставлении отмечено, что более высокая антигликирующая активность присуща соединениям с урацильным кором, чем с тиминовым, подобно тому, что хелатирующая актив-

Таблица 3. Фармакологическая активность производных урацила (I)–(VI) и тимина (VII)–(XIV)

Соединения/ производные	Хелатирование, IC ₅₀ , мкМ	Антигликирование, Δ% (<i>M</i> ± <i>m</i>), <i>C</i> = 1 мМ	Антиагрегантная активность (тромбоциты) Δ% (<i>M</i> ± <i>m</i>), <i>C</i> = 0.1 мМ	Разрушение поперечных сшивок, Δ% (<i>M</i> ± <i>m</i>), <i>C</i> = 1 мМ
(I)	N.A.	−7.40 ± 2.40	25.10 ± 2.30	5.13 ± 9.69
(II)	117.5 (R ² = 0.98)	24.40 ± 2.10*	21.70 ± 1.80	–
(III)	107.2 (R ² = 0.99)	12.00 ± 4.90	18.12 ± 1.52	–
(IV)	148.2 (R ² = 0.99)	−5.20 ± 4.00	15.90 ± 1.14	–
(V)	174.8 (R ² = 0.98)	−9.70 ± 0.80	20.08 ± 1.64	6.32 ± 6.76
(VI)	67.5 (R ² = 0.93)	13.50 ± 2.00*	18.68 ± 1.90	22.19 ± 3.28
(VII)	108.1 (R ² = 0.98)	14.50 ± 4.00	17.21 ± 1.18	–
(VIII)	120.5 (R ² = 0.98)	−18.50 ± 7.10	21.35 ± 2.70	–
(IX)	128.3 (R ² = 0.99)	2.40 ± 7.80	15.28 ± 0.79	–
(X)	50.7 (R ² = 0.99)	25.60 ± 6.90	19.38 ± 2.50	–
(XI)	73.9 (R ² = 0.98)	27.80 ± 2.30*	13.59 ± 0.74	–
(XII)	71.0 (R ² = 0.96)	33.70 ± 1.80*	14.14 ± 2.30	–
(XIII)	32.6 (R ² = 0.99)	35.60 ± 1.10*	20.43 ± 1.43	–
(XIV)	45.6 (R ² = 0.98)	8.00 ± 3.80	19.15 ± 2.10	–
Аминогуанидин	>1000.0	43.40 ± 2.40*	N.A.	N.A.
Ацетилсалициловая кислота	N.A.	N.A.	17.38 ± 1.37	N.A.
EDTA	0.7 (R ² = 0.95)	N.A.	N.A.	N.A.
Пиоглитазон	44.1 (R ² = 0.98)	N.A.	N.A.	N.A.
Липоевая кислота	68.9 (R ² = 0.96)	N.A.	N.A.	N.A.
Пиридоксамин	136.7 (R ² = 0.98)	N.A.	N.A.	N.A.
Алагебриум (ALT-711)	N.A.	N.A.	N.A.	23.02 ± 8.79

Примечание: N.A. – вещество не исследовано или, по причинам ограничения методики, активность установить не удалось; “–” – отсутствие активности у вещества в тесте; однофакторный вариационный анализ, пост-тест Ньюмана-Кеулеса, $p < 0.05$; $M \pm m$ соответствуют среднему арифметическому (M) и стандартной ошибке среднего арифметического (m); значение R^2 соответствует коэффициенту детерминации в оценке IC₅₀ методом линейной регрессии и обозначает то, на сколько условная дисперсия модели (линии) отличается от дисперсии реальных значений.

ность испытуемых соединений также была более выражена у производных урацила.

Опираясь на то, что способность соединений устранять каталитическую и АФК-продуцирующую способность катионов меди соотносится с антигликирующей активностью [7, 8], уровень данных активностей был сопоставлен. Между двумя активностями определен коэффициент ранговой корреляции Спирмена $r(s) = -0.7$ при уровне значимости $p \leq 0.05$ (отрицательная величина $r(s)$ обусловлена сопоставлением величин IC₅₀ хелатирующей активности и показателя Δ, % антигликирующего действия). Из корреляцион-

ного анализа было исключено соединение (I), что связано с его высоким светопоглощением при λ 265 нм и связанной с этим невозможностью установить медь-связывающую активность.

Соотносимость двух активностей может быть связана с:

а) присутствием требуемой мишени в обеих экспериментальных моделях и ее ролью в ключевых процессах реакции;

б) общностью функциональных групп соединений, задействованных в обеих реакциях;

в) общностью факторов, влияющих на течение обеих реакций.

Обсуждая пункт а), следует упомянуть, что присутствие катионов меди(II), перманентно связанных сBSA, влияет на кинетику гликирования [18], таким образом, сам BSA в ходе реакции может выступать в качестве источника Cu^{2+} .

Для пункта б) общность групп подразумевает то, что в проявлении обеих активностей задействованы одни и те же фармакофорные группы соединения, то есть фрагменты молекулы, ответственные за проявленное действие. В одном случае эти группы выполняют роль центров связывания переходного металла, в другом – принимают участие в инактивации карбонильных интермедиатов. При этом, субмолекулярные механизмы участия атомов функциональных групп в реакциях различаются, а склонность к течению одной или другой из двух упомянутых реакций может несколько изменяться под влиянием условий среды. Одним из факторов, от которых зависит приверженность данных фармакофорных групп реакциям связывания металлов или инактивации карбонильных интермедиатов, является рН. Подобное отмечено для препарата метформина, как известно, широко применяемого при СД второго типа. Препарат одновременно проявляет антигликирующие и хелатирующие свойства [8], при этом, имеет два потенциальных центра связывания для металлов, которые при определенных условиях вовлекаются и в реакции связывания дикарбониллов. При нейтральной рН метформин находится в частично протонированном (монопротонированном) состоянии [19], что определяет его множественное действие – способность выступать в роли антигликирующего вещества, связывая напрямую карбонильные интермедиаты, и способность к связыванию переходных металлов. Это обусловлено биофизическими особенностями – возможностью принимать участие в ионном взаимодействии, выступать донором/акцептором протонов, вступать в пи-пи-взаимодействия [19]. В то же время, более кислая среда, благоприятная для сохранения группировок в протонированном состоянии, благоприятна также и для протекания обменных реакций с дикарбонилами, как это описано в работе [8]. При этом известно, что формирование отдаленных осложнений СД сопровождается смещением значения рН интерстициальной жидкости в сторону закисления [20]. Таким образом, одни и те же группировки, видимо, способны реализовывать несколько вариантов активности, что связано с их биофизическими особенностями.

Пункт в) подразумевает то, что аскорбиновая кислота, благодаря чувствительности к прямому окислительному действию переходных металлов, а также образуемых ими АФК, очень удобна в ис-

следовании влияния веществ на чувствительные к окислителям ОВР, входящих в метаболический путь образования поперечно сшитых белков (наглядно представлен в работе [7]) с целью установить, способны ли вещества препятствовать окислительному действию металлов или высокоактивных кислородных соединений. Реакции образования КПП являются одним из этапов на данном метаболическом пути. Но, кроме этого, реакция автоокисления аскорбиновой кислоты представляется схожей с реакцией автоокисления глюкозы, поскольку обе реакции протекают в присутствии переходных металлов и по схожему механизму. При постановке реакции гликирования автоокисление глюкозы, являющееся одним из этапов данной реакции, служит одним из источников карбонильных интермедиатов с высокой реактивностью [21], что способствует нарастанию скорости реакционного процесса. Однако, ввиду сходства двух реакций, можно сделать допущение, что вещества, тормозящие автоокисление аскорбиновой кислоты, могут в некоторой степени замедлять процесс автоокисления глюкозы, чем будут способствовать и замедлению реакции образования конечных продуктов гликирования на фоне снижения пула высокореактивных карбонильных интермедиатов, которые будут образовываться из глюкозы в меньшем количестве.

Таким образом, три представленные довода позволяют истолковать возможные причины соотношения двух фармакологических активностей соединений, а также двух неразрывно связанных путей патогенеза формирования отдаленных осложнений СД.

Мы установили, что только одно из синтезированных соединений способно эффективно разрушать сшивки белков. Соединение (VI) (табл. 3) по уровню активности оказалось сопоставимо с контрольным соединением, алагебриумом (ALT-711). Еще два соединения, а именно (I) и (V), проявили себя как низко активные. Для всех остальных изученных соединений разрушающей поперечные сшивки активности установлено не было. Для соединения (VI) и алагебриума установленные показатели IC_{50} составили 1.32 и 1.89 мМ соответственно (рис. 1). Соединения (I), (V) и (VI) имеют в качестве кора урацил.

Подводя итог оценке фармакологических свойств изученных соединений, можно сделать вывод, что данный класс соединений перспективен в качестве основы при разработке веществ, способных подавлять развитие диабет-ассоциированных патий. Все соединения в разной мере проявляют антиагрегантное действие (наивысшая активность отмечена у соединений (I), (II) и (VII)). Данное свойство, возможно, связано с особенностями строения бензоильного заместителя. Все синтезированные соединения за исключени-

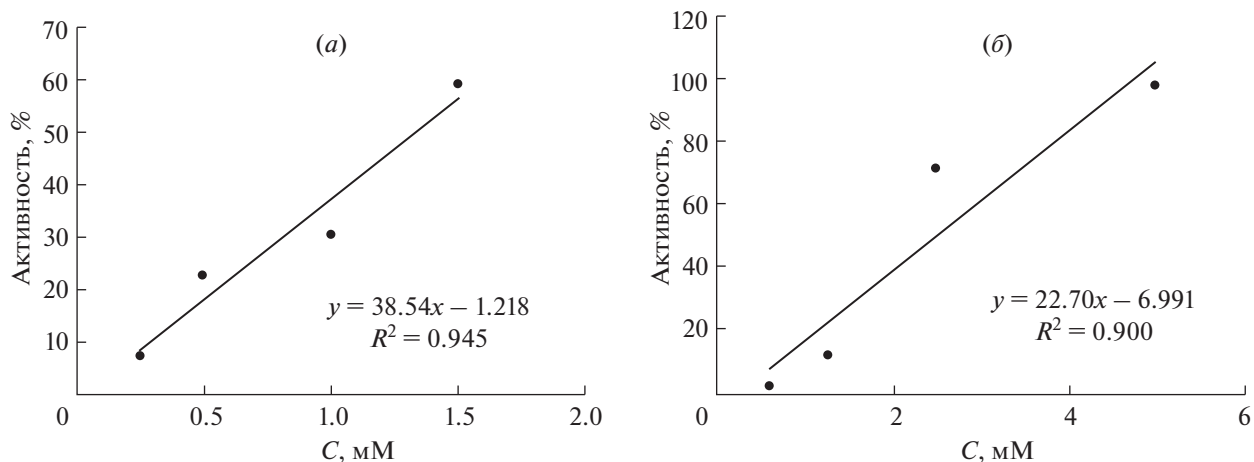


Рис. 1. Зависимость активности, разрушающей поперечные сшивки белков, соединения (VI) (а) и алагебриума (б) от концентрации.

ем (I) обладают хелатирующей медь (II) активностью с признаками антиоксидантности. Соединение (I) имело крайне высокую оптическую плотность при λ 265 нм, что ограничило возможность в его исследовании. Хелатирующая активность, вероятно, связана и частично определяет присутствие антигликирующего действия (соединения (II), (VI), (XI), (XII), (XIII)).

В ряду всех рассматриваемых производных тимина и урацила, наилучший профиль активностей был установлен для соединения (VI), что связано с наличием у него способности разрушать поперечные ковалентные белок-белковые связи. Образование этих связей является конечным этапом в цепи метаболических превращений, протекающих в строме у больных диабетом, что и является основой патогенеза развития некоторых диабет-ассоциированных патий. Кроме того, давая оценку потенциальной медицинской значимости установленной активности соединения (VI), можно сказать, что из приведенных активностей: хелатирование переходных металлов, подавление образования КПП и разрушение поперечных белок-белковых сшивок, последняя имеет особое значение.

Синтезированные *N*-(RO-бензоил)-замещенные производные тимина и урацила могут выступать перспективной основой при создании средств, замедляющих развитие СД-ассоциированных патий и отдаленных осложнений заболевания. Однако предполагается, что дополнительная разрушающая поперечные сшивки активность соединения (VI), сопоставимая с таковой у алагебриума, позволит не просто замедлять развитие отдаленных осложнений СД, но и, вероятно, частично восстанавливать биофизические свойства тонко организованной ультраструктуры стромы, которая претерпевает изменения при

данном заболевании. Таким образом, описываемый класс веществ имеет высокий медицинский и фармакологический потенциал.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Температуры плавления определяли капиллярным методом на приборе StuartSMP-30 при скорости нагрева $10^\circ\text{C}/\text{мин}$. Чистоту и индивидуальность соединений подтверждали методом тонкослойной хроматографии на пластинках "Silufol UV-254", подвижная фаза изопропанол-вода, 7 : 3, проявление – в парах йода и УФ-светом. Спектры ^1H -ЯМР производных в $\text{DMSO}-d_6$ регистрировали на спектрометре BrukerDRX500, внутренний стандарт гексаметилдисилоксан. Для интерпретации спектров использовали лицензионный программный продукт фирмы "Advanced Chemistry Development Inc." под коммерческим названием ACD/HNMR Predictor Pro v. 3.

При оценке антиагрегантной активности использовали двухканальный лазерный анализатор агрегации тромбоцитов 230 LA (НПФ "Биола", Россия). При оценке антигликирующей активности проводили измерение флуоресценции КПП на спектрофлуориметре TECAN M 200 Pro, $\lambda_{\text{(excitation)}}$ 370 нм, $\lambda_{\text{(emission)}}$ 440 нм. Способность соединений разрушать поперечные сшивки в белках определяли с помощью TECAN M 200 Pro по показателю абсорбции света (λ 450 нм). Хелатирующую активность определяли на спектрофотометре APEL PD 303 UV, Япония (λ 265 нм).

Все растворители и реагенты получены из коммерческих источников и использовались без очистки. **RO-замещенные** бензоилхлориды синтезировали по методикам [22, 23].

Общая методика синтеза производных 1,3-бис(RO-бензоил)-(1*H*,3*H*)-пиримидин-2,4-дионов

(I), (III), (VI), (VII), (IX), (X), (XI), (XII), (XIV) [24]. К раствору 100 ммоль урацила или тимина в 30 мл сухого пиридина прибавляли по каплям в течение 15 мин раствор 200 ммоль RO-бензоилхлорида в 10 мл хлороформа, при этом происходит осаждение твердого продукта и хлоргидрата пиридина. Смесь перемешивали в течение 1 ч при комнатной температуре. Затем раствор фильтровали под вакуумом, осадок промывали холодной водой и перекристаллизовывали из бензола.

N¹-Производные урацила и тимина (II), (IV), (V), (VIII), (XIII) получали аналогично при мольном соотношении исходных 1 : 1.

Выходы, температуры плавления и ЯМР-спектральные данные соединений (I)–(XIV) приведены в табл. 1.

Экспериментальная биологическая часть

Антиагрегантную активность веществ исследовали в концентрации 100 мкМ на модели ADP-индуцированной (Reanal, Венгрия) агрегации кроличьих тромбоцитов, по изменению степени светопропускания плазмы, богатой тромбоцитами [25]. Об активности веществ судили по снижению агрегации тромбоцитов по отношению к контролю. В качестве препарата сравнения использовали ацетилсалициловую кислоту (Shandong Xinhua Pharmaceutical Co., Ltd, Китай). Статистическую обработку данных проводили при помощи программного обеспечения Microsoft Excel 2007, а также программы GraphPad Prism 5.0 с использованием однофакторного вариационного анализа с пост-тестом Ньюмана-Кеулеса ($p < 0.05$) и предварительной проверкой нормальности распределения критерием Колмогорова–Смирнова.

Антигликирующую активность определяли по методу [16]. Реакционная среда при постановке реакции гликирования содержала 500 мМ глюкозу и 1 мг/мл BSA (фракция V), растворенные в фосфатном буферном растворе pH 7.4. Исследуемые соединения растворяли в 99% DMSO. Конечная концентрация веществ после их добавления в реакционную среду составляла 1 мМ. Контрольные пробы содержали эквивалентный объем DMSO. Образцы инкубировали 24 ч при 60°C. В качестве вещества сравнения использовали гидрохлорид аминокванидина (Sigma Aldrich). Статистическую обработку данных проводили при помощи программного обеспечения Microsoft Excel 2007, а также программы GraphPad Prism 5.0 с использованием однофакторного вариационного анализа и пост-теста Ньюмана-Кеулеса ($p < 0.05$) с предварительной проверкой нормальности распределения критерием Колмогорова–Смирнова.

Хелатирующую активность соединений исследовали в диапазоне концентраций 10–200 мкМ

по методике подавления медь-зависимого автоокисления аскорбиновой кислоты [26, 27], оценивая величину IC₅₀. В качестве контроля использовали липоевую кислоту, пиоглитазон и пиридоксамин [8], для которых показано сочетание хелатирующих и антипатийных свойств [28–30]. Растворение соединений осуществляли в 99% DMSO. Индикатор активности катионов меди(II) – 100 мкМ раствор аскорбиновой кислоты, источник Cu²⁺ – CuSO₄ · 5H₂O в конечной концентрации 150 мкМ (95 мкМ в пересчете той же массы на безводную соль). Комплексообразование проводили предварительным смешением и инкубацией в течение 5 мин при 37°C раствора сульфата меди и исследуемого вещества или DMSO. Смесь вносили в раствор аскорбиновой кислоты. Автоокисление регистрировали спектрофотометрически в кювете из кварца низкотемпературной обработки (λ 265 нм). Методом линейной регрессии определяли IC₅₀ тестируемых веществ (Microsoft Excel 2007). Статистическую обработку данных проводили при помощи программного обеспечения Microsoft Excel 2007, а также программы GraphPad Prism 5.0 с использованием критерия попарного сравнения Манна–Уитни, а также однофакторного вариационного анализа при $p < 0.05$.

Активность, разрушающую поперечные сшивки гликированных белков исследовали путем измерения оптического поглощения растворов, предварительно полученных при 3-месячном инкубировании раствора BSA (50 мг/мл) с глюкозой (0.5 М), внесенных в среду, содержащую коллаген для образования сшивок с данным белком [31]. Коллаген выделяли из хвоста 3–5-месячных крыс массой ~200 г, предварительно забитых посредством декапитации под эфирным наркозом. Забранный оперативным способом материал соединительной ткани хвоста был незамедлительно перенесен в 0.1% раствор уксусной кислоты для кислотного растворения коллагена и его экстракции в течение 7 сут. Затем содержимое сосуда центрифугировали при 8000 g (10 мин) для осаждения остаточных волокон и отбирали обогащенный коллагеном супернатант. Полученный коллаген-содержащий гель использовали для покрытия дна плоскодонных прозрачных 96-луночных микропланшетов (по 70 мкл геля в каждую лунку). Микропланшеты тщательно обрабатывали фосфатным буферным раствором (pH 7.4) в течение 1 ч для нейтрализации кислого коллагена. Планшеты блокировали Superblock (PIERCE) при 37°C в течение 1 ч. Затем добавляли раствор BSA (фракция V) и проводили инкубацию при 37°C в течение 4 ч с целью формирования сшивок. Раствор соединения в DMSO (10 мкл) в конечной концентрации 1 мМ, добавляли в лунки с гликированным белком и в лунки с БСА. Планшет инкубировали при 37°C в течение 16 ч. Затем в лунки добав-

ляли антитела кролика против BSA (1 : 500) 80 мкл/лунку, и планшет инкубировали при 37°C в течение 50 мин. Далее в лунки добавляли 80 мкл/лунку меченных пероксидазой хрена козых IgG против кроличьих (1 : 1000). Лунки инкубировали при 37°C в течение 50 мин. Затем добавляли субстрат 3,3',5,5'-тетраметилбензидин (ТМБ) 100 мкл/лунку. Планшет инкубировали при комнатной температуре в темноте в течение 20 мин. Для прекращения реакции использовали 2 М раствор H₂SO₄. В течение 10 мин после реакции регистрировали оптическое поглощение при 450. В качестве вещества сравнения использовали алагебриум (Sigma Aldrich). Обработку результатов выполнили в программе Microsoft Excel (Microsoft, США) с расчетом базовых статистических показателей описательной статистики.

Количественно активность соединений в тестах определения антиагрегантного и антигликирующего действий, а также действия, направленного на разрушение поперечных сшивок белков, оценивали по величине показателя Δ%, отражающего соотношение результатов, полученных для пробы с веществом, и результатов группы контроля. Показатель определяли по формуле: $\Delta\% = (1 - \text{data}_{\text{опыт}} / \text{Mdata}_{\text{контроль}}) \times 100\%$; где data_{опыт} — абсолютная величина регистрируемого в тесте признака (уровень флуоресценции, оптического поглощения или светорассеивания) в каждой отдельно взятой пробе с веществом, Mdata_{контроль} — среднеарифметический уровень этого же признака в контрольных пробах без вещества. При наглядном представлении значений Δ% пользовались определением показателей $M \pm m$, соответствующих среднему арифметическому (*M*) и стандартной ошибке среднего арифметического (*m*).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Дедов И.И., Омеляновский В.В., Шестакова М.В., Авксентьева М.В., Игнатова В.И. // Сахарный диабет. 2016. № 19(1). С. 30–43.
2. Дедов И.И., Концевая А.В., Шестакова М.В., Белосусов Ю.Б., Баланова Ю.А., Худяков М.Б., Карпов О.И. // Сахарный диабет. 2016. № 19(6). С. 518–527.
3. Петров В.И., Спасов А.А., Чепляева Н.И., Ленская К.В. // Антидиабетогенный потенциал бензимидазолов: химия, фармакология, клиника. Глава 1 / Ред. Спасов А.А., Петров В.И., Минкин М.И. Волгоград: Изд-во ВолгГМУ, 2016. 544 с.
4. Matough F.A., Budin S.B., Hamid Z.A., Alwahaibi N., Mohamed J. // Sultan Qaboos Univ. Med. J. 2012. V. 12(1). P. 5–18.
5. Ullaha A., Khana A., Khan I. // Saudi Pharmaceutical Journal. 2016. V. 24. P. 547–553.
6. Deroo S., Stengel F., Mohammadi A., Henry N., Hubin E., Kramer E.M., Aebbersold R., Raussens V. // ACS Chem. Biol. 2015. V. 10(4). P. 1010–1016.
7. Sell D.R., Strauch C.M., Shen W., Monnier V. // Biochem. J. 2007. V. 404. P. 269–277.
8. Nagai R., Murray D.B., Metz T.O., Baynes J.W. // Diabetes. 2012. V. 61(3). P. 549–559.
9. Спасов А.А., Чепляева Н.И., Снугур Г.Л. // Антидиабетогенный потенциал бензимидазолов: химия, фармакология, клиника. Глава 9 / Ред. Спасов А.А., Петров В.И., Минкин М.И. Волгоград: Изд-во ВолгГМУ, 2016. 544 с.
10. Kawada H., Kador P.F. // J. Med. Chem. 2015. V. 58(22). P. 8796–8805.
11. Hess K., Grant P.J. // Thromb. Haemost. 2011. V. 1. P. 43–54.
12. Spasov A.A., Babkov D.A., Sysoeva V.A., Litvinov R.A., Shamshina D.D., Ulomsky E.N., Savateev K.V., Fedotov V.V., Slepukhin P.A., Chupakhin O.N., Charushin V.N., Rusinov V.L. // Archiv der Pharmazie. 2017. V. 350. № 12. P. e1700226.
13. Stocker R. // Curr. Opin. Lipidol. 2009. V. 20(3). P. 227–235.
14. Koo Y.K., Kim J.M., Koo J.Y., Kang S.S., Bae K., Kim Y.S., Chung J.H., Yun-Choi H.S. // Pharmazie. 2010. V. 65. P. 624–628.
15. Bruno O., Schenone S., Ranise A., Bondavalli F., Barocelli E., Ballabeni V., Chiavarini M., Bertoni S., Tognolini M., Impicciatore M. // Bioorganic & Medicinal Chemistry. 2001. V. 9. P. 629–636.
16. Esfahanizadeh M., Mohebbi S., Bozorg B.D., Amidi S., Gudarzi A., Ayatollahi S.A., Kobarfard F. // Iran J. Pharm. Res. 2015. V. 14(2). P. 417–427.
17. Спасов А.А., Кучерявенко А.Ф., Ленская К.В. // Антидиабетогенный потенциал бензимидазолов: химия, фармакология, клиника. Глава 10 / Ред. Спасов А.А., Петров В.И., Минкин М.И. Волгоград: Изд-во ВолгГМУ, 2016. 544 с.
18. Segovia A.S.R., Wrobel K., Aguilar F.J.A., Escobosa A.R.C., Wrobel K. // Metallomics. 2017. V. 9(2). P. 132–140.
19. Hernández B., Pflüger F., Kruglik S.G., Cohen R., Ghomi M. // J. Pharm. Biomed. Anal. 2015. V. 114. P. 42–48.
20. Marunaka Y. // World J. Diabetes. 2015. V. 6(1). P. 125–135.
21. Wolff S.P., Dean R.T. // Biochem. J. 1987. V. 245(1). P. 243–250.
22. Брель А.К., Лусина С.В., Попов С.С. Патент РФ 2601309. 2016.
23. Брель А.К., Лусина С.В., Будаева Ю.Н., Попов С.С. // Ж. общей химии. 2015. Выпуск 85(9). С. 1561–1563.
24. Брель А.К., Спасов А.А., Лусина С.В., Попов С.С., Ращенко А.И. Патент РФ 2643520. 2018.
25. Брель А.К., Лусина С.В., Попов С.С., Будаева Ю.Н. // Ж. общей химии. 2016. Выпуск 86(3). С. 549–551.
26. Шамишина Д.Д., Литвинов Р.А. // Вестник ВолгГМУ. 2018. Выпуск 1(65). С. 115–117.
27. Иванов А.В., Шамишина Д.Д., Литвинов Р.А., Батраков В.В. // Вестник ВолгГМУ. 2018. Выпуск 2(66). С. 47–49.
28. Spasov A.A., Zhukovskaya O.N., Brigadirova A.A., Abbas H.S.A., Anisimova V.A., Sysoeva V.A., Rash-

- chenko A.I., Litvinov R.A., Mayka O.Yu., Babkov D.A., Morkovnik A.S.* // Russian Chemical Bulletin. 2017. V. 66. P. 1905–1912.
29. *Roxana Valdés-Ramos, Guadarrama-López Ana Laura, Martínez-Carrillo Beatriz Elina, Benítez-Arciniega Alejandra Donaj* // Endocr. Metab. Immune Disord Drug Targets. 2015. V. 15(1). P. 54–63.
30. *Golbidi S., Badran M., Laher I.* // Front Pharmacol. 2011. V. 2. P. 69.
31. *Лу Сун и др.* Патент РФ 2008134899/04. 2007.

Evaluation of N-Hydroxy-, Methoxy- and Acetoxybenzoyl-Substituted Derivatives of Thymine and Uracil as New Substances for Prevention and Treatment of Long-Term Diabetes Mellitus Complications

A. A. Spasov*, **, ***, A. K. Brel*, R. A. Litvinov*, ***, #, S. V. Lisina*, A. F. Kucheryavenko*, Yu. N. Budaeva*, O. A. Salaznikova*, A. I. Rashchenko*, D. D. Shamshina*, V. V. Batrakov*, and A. V. Ivanov*

#e-mail: litvinov.volggmu@mail.ru

*Volgograd State Medical University, Pavshikh Bortsov Sq., 1, Volgograd, 400131 Russia

**Volgograd Medical Scientific Center, Rokossovskogo st., 1G, Volgograd, 400081 Russia

***Scientific Institute of Pharmacology of VSMU, Antioxidant's Lab., Pugachevskaya st., 3, Volgograd, 400001 Russia

N^1 -, N^3 - and N^1,N^3 -RO-benzoyl-substituted uracil and thymine based new compounds (RO- hydroxy-, acetoxy- or methoxy-group) were synthesized and evaluated in *in vitro* tests, includes cross-link breaking, antiglycating, chelating and antiplatelet actions. These activities are the most actual in way of pharmacological correction of long-lasting diabetes mellitus complications, such as thrombosis, angio-, nephro-, encephalo- and cardiopathy. The most active antiplatelet compound (N^1 -hydroxybenzoyl-substituted uracil based compound) was about at 44% more active than acetylsalicylic acid. In the ascorbic acid autoxidation test the IC_{50} of all tested compounds (except 1,3-bis(3-hydroxy-substituted benzoyl-uracil – not tested) was between of 44.1 μM (IC_{50} of pioglitazone) and 136.7 μM (IC_{50} of pyridoxamin). The highest antiglycative action ($C = 1$ mM) was observed for N^1,N^3 -methoxy- and acetoxy-substituted benzoyl-thymines. Maximal anti-cross-linking ($C = 1$ mM) was detected for 1,3-bis(4-methoxybenzoyl)-(1H,3H)-pyrimidine-2,4-dione, which was highly active in other three tests as well. As a result, we declared, that N^1 -, N^3 - и N^1,N^3 -(RO-benzoyl)-substitution in thymine and uracil is highly perspective way for the creation of new medicinal products with anti-long-lasting diabetes mellitus consequences.

Keywords: diabetes mellitus, long-term diabetes mellitus complications, pyrimidine derivatives, thymine, uracil