



УДК547.213'857-32.057-026.81

СИНТЕЗ И БИОЛОГИЧЕСКАЯ АКТИВНОСТЬ ПРОИЗВОДНЫХ 3-(3-МЕТИЛ-2,6-ДИОКСО-2,3,6,7-ТЕТРАГИДРО-1Н-ПУРИН-8-ИЛ) ПРОПАНОВОЙ КИСЛОТЫ

**М.С. КАЗУНИН
Б.А. ПРИЙМЕНКО**

*Запорожский
государственный
медицинский
университет*

e-mail: aethoxy@mail.r

В статье изложены методы синтеза производных 3-(3-метил-2,6-диоксо-2,3,6,7-тетрагидро-1Н-пурин-8-ил)пропановой кислоты, 2-(5-(2-(3-метил-2,6-диоксо-2,3,6,7-тетрагидро-1Н-пурин-8-ил)этил)-4Н-1,2,4-триазол-3-илтио)уксусной кислоты а так же их водорастворимых аммониевых солей. Изучены их антиоксидантные и противотуберкулезные свойства.

Ключевые слова: антиоксидантная активность, противотуберкулезная активность, свободно-радикальное окисление, гидразид изоникотиновой кислоты, гидразоны, ксантины.

Среди производных ксантина найдено значительное количество веществ, обладающих аналептической, нейрорепаративной, диуретической, гипотензивной, актопротекторной, нейротропной, противомикробной и другими видами активности. Сегодня является актуальной проблема поиска новых препаратов производных пурина и ксантина, поскольку применение различного рода фармпрепаратов вызывает появление резистентных штаммов микроорганизмов. Получение различных производных N1-, N7-замещенных 3-метилпуридиндиона-2,6 (3-метилксантина) является перспективным направлением для поиска новых веществ, которые могут найти применение в медицинской практике и фармации.

Цель исследования – поиск биологически-активных веществ среди производных ксантина, обладающих антиоксидантной и противотуберкулезной активностью и установление закономерности между исследуемыми биологическими свойствами и особенностями химического строения синтезированных соединений.

Материалы и методы Для проведения биологических исследований были использованы N7-замещенные гидразоны, амиды и аммонийные соли 3-(3-метил-2,6-диоксо-2,3,6,7-тетрагидро-1Н-пурин-8-ил)пропановой кислоты [1-4] а так же некоторые соли 2-(5-(2-(3-метил-2,6-диоксо-2,3,6,7-тетрагидро-1Н-пурин-8-ил)этил)-4Н-1,2,4-триазол-3-илтио)уксусной кислоты.

Обсуждение результатов Для получения гидразонов были использованы эфиры 3-(3-метил-2,6-диоксо-2,3,6,7-тетрагидро-1Н-пурин-8-ил)пропановой кислоты [1]. Нагреванием соответствующих эфиров (1) в растворе изопропилового спирта в присутствии избытка гидразин-гидрата были получены гидразиды (2). Дальнейшее нагревание гидразидов в водном растворе уксусной кислоты с карбонильными соединениями приводило к образованию гидразонов (3). С целью получения замещенных карбоновых кислот (4) проводили щелочной гидролиз сложных эфиров (1) в двунормальном растворе NaOH с последующим подкислением минеральными кислотами. Образование амидов (7) реализовывалось нагреванием сложных эфиров (1) в спиртовой среде в присутствии избытка ароматического амина. Путем кипячения в течение трех часов сложного эфира (1) с орто-фенилендиамином в среде хлористоводородной кислоты (циклизация по Филлипсу) получен замещенный бензимидазол (8).

Данные представлены в рис. 1.

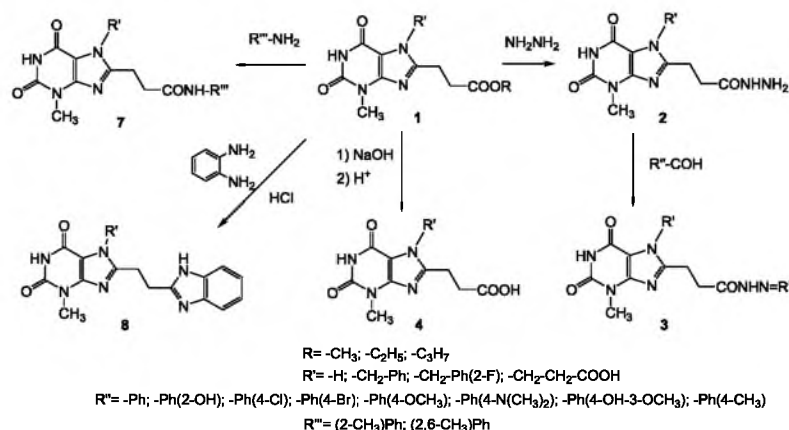


Рис. 1. Образование исходных 7-*R'*-3-(3-метил-2,6-диоксо-2,3,6,7-тетрагидро-1H-пурин-8-ил)пропановых кислот и их гидразонов

Для проведения исследования на противотуберкулезную активность были отобраны гидразиды кислоты формулы (3). Данные вещества для исследования на противотуберкулезную активность были взяты в концентрации 0,2 мкг/мл среды, идентичной концентрации изониазида в среде Левенштейна-Йенсена при определении устойчивости к антибиотикам по методу Канетти *in vitro*. В качестве культуры, выбранной для тестирования, использовали лабораторный штамм H₃₇RV, чувствительный к антибактериальным препаратам группы гидразида изоникотиновой кислоты (ГИНК). Рабочую концентрацию исследуемых веществ получали путем разведения навесок в 100мг:

- 100 мг + 100 мл растворителя – 1 мг\мл
- 1 мл 1-го разведения + 9,0 мл растворителя – 100 мкг\мл
- 1 мл 2-го разведения + 9,0 мл растворителя – 10 мкг\мл
- 1 мл 3-го разведения + 98,0 мл растворителя – 0,2 мкг\мл.

Среду Левенштейна-Йенсена с исследуемой концентрацией веществ разливали по 5 мл в стерильные пробирки и свертывали в коагулированном виде при 85°C на протяжении 30 минут в аппарате для свертывания сыворотки крови. На готовую среду проводили посев суспензии лабораторного штамма H₃₇RV, откалиброванной по стандарту мутности – 1 McF (300X10⁶ микр/тел в 1 мл) и разведенной до 10⁻⁴ стерильным физраствором. Как разведения использовались 10⁻² и 10⁻⁴, из них параллельно были сделаны два контрольных посева на среду Левенштейна-Йенсена без добавления исследуемых соединений. Посевы инкубировали в термостате при 37°C. Учет результатов проводили через 3-4 недели при появлении хорошего роста на контрольных посевах. Данные представлены в табл. 1.

Таблица 1

№	Структурная формула	Брутто-формула	Чувствительность к штамму H ₃₇ RV	
			4	5
1		C ₂₄ H ₂₃ ClN ₆ O ₅	C	-

Окончание табл. 1

1	2	3	4	5
2		C ₂₄ H ₂₀ ClN ₇ O ₄	C	-
3		C ₂₄ H ₁₉ BrClN ₇ O ₄	C	-
4		C ₁₇ H ₁₉ N ₅ O ₃	-	Ч
5		C ₁₅ H ₁₄ N ₆ O ₂	-	Ч
6		C ₁₆ H ₁₆ N ₆ O ₄	C	-
7		C ₁₆ H ₁₇ N ₅ O ₄	-	Ч
8		C ₂₀ H ₁₇ N ₇ O ₆	-	Ч
9		C ₂₀ H ₁₇ N ₇ O ₆	-	Ч

Примечание: Ч – чувствительный, С – стойкий.

Анализ полученных результатов показывает, что к большинству синтезированных гидразонов 3-(3-метил-7-*R*-2,6-диоксо-2,3,6,7-тетрагидро-1 H -пурин-8-ил)пропановой кислоты исследуемый штамм проявляет чувствительность. Штамм H_{37}RV не проявил чувствительности к гидразонам, содержащим в ароматическом кольце галогены, гидроксигруппы, метоксигруппы (например (E)- N' -(4-хлорфенилиден)-3-(3-метил-2,6-диоксо-2,3,6,7-тетрагидро-1 H -пурин-8-ил)пропангидразид, (E)- N' -(4-гидрокси-3-метоксибензилиден)-3-(3-метил-2,6-диоксо-2,3,6,7-тетрагидро-1 H -пурин-8-ил)пропангидразид).

К соединению 8 (8-(2-(1 H -бензо[d]имидазол-2-ил)этил)-3-метил-1 H -пурин-2,6(3 H ,7 H)-дион) а также к веществам, содержащим ароматическую нитрогруппу в бензольном и фурановом циклах (например (E)-3-(3-метил-2,6-диоксо-2,3,6,7-тетрагидро-1 H -пурин-8-ил)- N' -((5-

нитрофуран-2-ил)метил)пропангидразид и (Е)-3-(3-метил-2,6-диоксо-2,3,6,7-тетрагидро-1Н-пурин-8-ил)-N'-((Е)-3-(2-нитрофенил) аллилиден) пропангидразид), штамм Н₃₇RV проявил 100% чувствительность.

Для исследования предполагаемой антиоксидантной активности в молекулу ксантина был введен остаток, содержащий двухвалентную серу. Для синтеза N7-замещенных 2-(5-(2-(3-метил-2,6-диоксо-2,3,6,7-тетрагидро-1Н-пурин-8-ил)этил)-4Н-1,2,4-триазол-3-илтио)уксусной кислоты исходили из гидразида (2). Путем кипячения (2) в течение 2 часов в растворе HCl в присутствии роданида калия с последующей циклизацией была получена натриевая соль замещенного триазола (5). Алкилирование по атому серы хлороацетатом натрия в водном растворе и дальнейшее подкисление HCl приводило к искомой кислоте (6). Последующее взаимодействие с аминами в среде пропанола приводило к образованию хорошо кристаллизующихся водорастворимых солей.

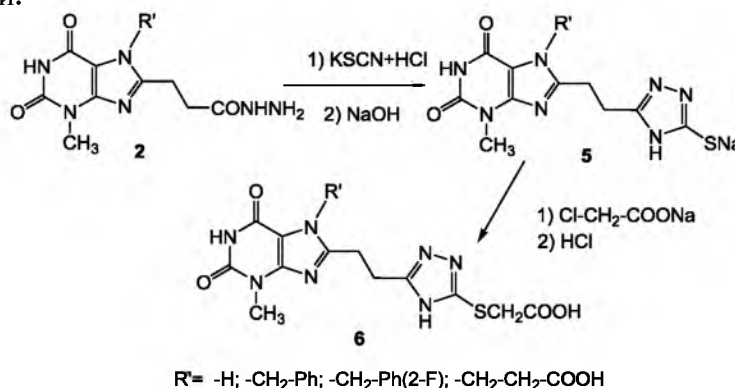


Рис. 2. Синтеза N7-замещенных 2-(5-(2-(3-метил-2,6-диоксо-2,3,6,7-тетрагидро-1Н-пурин-8-ил)этил)-4Н-1,2,4-триазол-3-илтио)уксусной кислоты

Для проведения исследований на антиоксидантную активность использовались водорастворимые аммониевые соли кислот с алифатическими аминами (формулы 4 и 6.). Применялся метод оценки АОА при неферментативной инициации СРО солями железа (II) (Halliwell В. Gutteridge JMC Free radicals in biology and medicine. – Oxford: Claredon Press, 1995. – 346 p.). В качестве субстрата использовалась суспензия яичных липопротеидов (СЯЛ). СЯЛ готовится путем гомогенизации яичного желтка с фосфатным буфером (рН = 7,4). К суспензии добавляют исследуемые соединения в концентрации 10⁻⁶ моль/л. Реакцию свободнорадикального окисления инициируют добавлением 0,025 М раствора FeSO₄ × 7Н₂O. Смесь инкубируют 60 мин при 37 °С. Реакцию останавливают 50% раствором трихлороацетатной кислоты с трилоном Б. После центрифугирования в течение 30 мин. к раствору тиобарбитуровой кислоты (ТБК) добавляют надосадочную жидкость и кипятят на водяной бане в течение 60 мин. Окрашенный комплекс малонового диальдегида с ТБК извлекают добавлением н-бутанола. Методом спектрофотометрии определяют концентрацию малонового диальдегида, которая свидетельствует об интенсивности процессов свободно-радикального окисления. Антиоксидантную активность (в процентах) определяют по формуле:

$$AOA = (C_{K1} - C_o / C_{K1} - C_{K2}) \times 100\%,$$

где

C_{K1}, C_{K2} – содержание ТБК-реактантов в контрольных пробах, моль/л;

C_o – содержание ТБК-реактантов в опытной пробе, моль/л.

В качестве эталонов сравнения использовали тиотриазолин и дибунол.

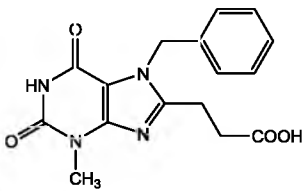
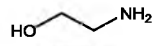
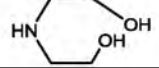
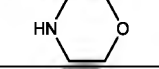
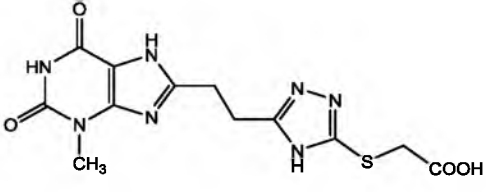
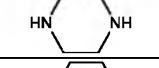
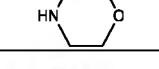
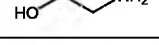
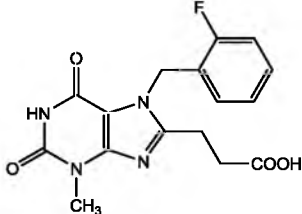
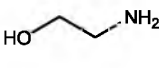
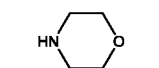
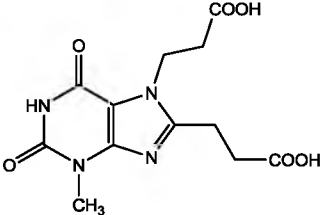
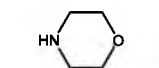
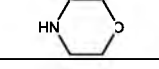
Результаты исследования приведены в табл. 2.

Таблица 2

Антиоксидантная активность исследуемых соединений (10⁻⁶ М) in vitro при неферментативной инициации СРО

№	Структурная формула	Амин	Брутто-формула	АОА %
1		3	4	5
			C ₁₁ H ₁₇ N ₅ O ₅	-10,58
			C ₁₃ H ₂₀ N ₆ O ₄	7,66
			C ₁₃ H ₁₉ N ₅ O ₅	13,14

Окончание табл. 2

1	2	3	4	5
2			C ₁₈ H ₂₃ N ₅ O ₅	25,91
			C ₂₀ H ₂₇ N ₅ O ₆	12,41
			C ₂₀ H ₂₅ N ₅ O ₅	20,07
3			C ₁₆ H ₂₃ N ₉ O ₄ S	0,36
			C ₁₆ H ₂₂ N ₈ O ₅ S	15,32
			C ₁₄ H ₂₀ N ₈ O ₅ S	37,22
4			C ₁₈ H ₂₂ FN ₅ O ₅	8,39
			C ₂₀ H ₂₄ FN ₅ O ₅	-2,92
5			C ₁₄ H ₂₁ N ₅ O ₇	19,34
6	Тиотриазолин		C ₉ H ₁₆ N ₄ O ₃ S	67,1
7	Дибунол	-	C ₁₅ H ₂₄ O	27,1

Исходя из полученных результатов видно, что большинство веществ проявляют слабую или умеренную антиоксидантную активность и прооксидантные свойства. Так, наибольшую активность проявляют моноэтаноламмониевые соли 2-(5-(2-(3-метил-2,6-диоксо-2,3,6,7-тетрагидро-1H-пурин-8-ил)этил)-4H-1,2,4-триазол-3-илтио)уксусной кислоты (АОА 37,22%) и 3-(3-метил-7-бензил-2,6-диоксо-2,3,6,7-тетрагидро-1H-пурин-8-ил)пропановой кислоты (АОА 25,91%). Прооксидантные свойства были обнаружены у соли 3-(3-метил-2,6-диоксо-2,3,6,7-тетрагидро-1H-пурин-8-ил)пропановой кислоты с моноэтаноламином (АОА -10,58%).

Литература

1. Синтез, физико-химические и биологические свойства производных 2-((3-метил-2,6-диоксо-2,3,6,7-тетрагидро-1H-пурин-8-ил)-метилтио)алкановых кислот / А.О. Прийменко, М.С. Казунин, Д.А. Васильев, та ін. // «Ліки – людині. Матеріали XXVIII всеукр. науково-практ. конф. з міжнародною участю». – Харків, 2011. – С. 336-341.
2. Синтез, строение и физико-химические свойства 1-метил-7,8-дигидро-1H-пирроло [1,2-f]пурин-2,4,6(3H)-триона и некоторых его производных / М.С. Казунин, А.О. Прийменко, Д.А. Васильев, Б.А. Прийменко // «Акт. питання фармацевтичної медичної науки та практики». – Запоріжжя, 2011. Вип. 11 (1). – С. 89-92.
3. Синтез, физико-химические свойства 3-(3-метилксантинил-8)пропановой кислоты и некоторых ее производных / М.С. Казунин, А.О. Прийменко, Д.А. Васильев, Б.А. Прийменко // Запорж. мед. журн. – 2010. – № 3 (12). – С. 103-107.
4. Синтез и противомикробная активность производных 3-(метилксантинил-8)пропановой кислоты / Казунин М.С., Васильев Д.А., Прийменко А.О., Ачкасова Е. Н., Прийменко Б.А. // «Акт. питання експериментальної, клінічної медицини та фармації». – Луганськ, 2012. – Т. 15 (5). – С. 120-121.



5. Изучение антиоксидантной активности бензилиденгидразидов *s*-(4-хиназолил)-меркаптоуксусной кислоты на модели «нитрозирующего стресса» *in vitro* / И.Ф. Беленичев, В.В. Дунаев, А.В. Карпенко, С.И. Коваленко // Экспериментальная и клиническая фармакология, 2004. – № 3. – С. 69-72.

6. Туберкулез. Патогенез, защита, контроль: пер. с англ. / под ред. Барри Р. Блума. – Медицина. М.: 2002. – 696 с.

SYNTHESIS AND BIOLOGICAL ACTIVITY OF DERIVATIVES 3-(3-METHYL-2,6-DIOXO-2,3,6,7-TETRAHYDRO-1H-PURIN-8-YL) PROPANOIC ACID

M.S KAZUNIN
B.A. PRIIMENKO

Zaporozhye
State Medical
University

e-mail: aethoxy@mail.ru

The article describes the methods for the synthesis of derivatives 3-(3-methyl-2,6-dioxo-2,3,6,7-tetrahydro-1H-purin-8-yl)propanoic acid, 2-(5-(2-(3-methyl-2,6-dioxo-2,3,6,7-tetrahydro-1H-purin-8-yl)ethyl)-4H-1,2,4-triazol-3-ylthio) acetic acid and their water-soluble ammonium salts. We have studied their antioxidant and anti-tuberculosis properties.

Key words: antioxidant activity, antituberculous activity, free-radical oxidation, isonicotinic acid hydrazide, hydrazones, xanthines.