

О. В. Кушир¹, О. Н. Волощук¹, Р. И. Ефтьенева¹,
М. М. Марченко¹, М. В. Вовк²

СИНТЕЗ И АНТИОКСИДАНТНАЯ АКТИВНОСТЬ АМИДОВ 2-ТИОКСО-1,2,3,4-ТЕТРАГИДРОПИРИМИДИН-5-КАРБОНОВЫХ КИСЛОТ

¹ Черновицкий национальный университет им. Ю. Федьковича, Черновцы, Украина;

² Институт органической химии Национальной академии наук Украины, Киев, Украина

Трехкомпонентной конденсацией ацетоацетамидов, ароматических альдегидов и тиомочевины получен ряд новых амидов 2-тиоксо-1,2,3,4-тетрагидропиримидин-5-карбоновой кислоты, структура которых подтверждена методами ИК, ЯМР ¹H спектроскопии и масс-спектрометрии. Среди синтезированных соединений найдены вещества, проявляющие высокую ингибирующую активность по отношению к супероксид-генерирующей способности митохондрий как в печени, так и в трансформированной ткани крыс опухоленосителей.

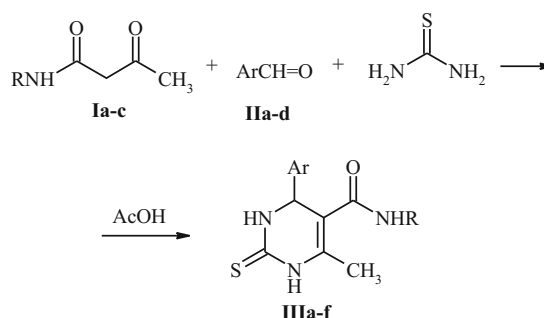
Ключевые слова: амиды 2-тиоксо-1,2,3,4-тетрагидропиримидин-5-карбоновых кислот; реакция Биджинелли; конденсация; супероксидный анион-радикал; супероксид-генерирующая активность; карцинома Герена.

В течение 2 последних десятилетий эфиры 2-оксо(тио)-1,2,3,4-тетрагидропиримидин-5-карбоновых кислот, известные как соединения Биджинелли [1], являются объектами повышенного внимания исследователей благодаря своей структурной аналогии с клинически активными дигидропиримидинами — блокаторами кальциевых каналов. Они характеризуются широким спектром фармакологической активности: противоопухолевой [2–4], анальгетической [5], противовоспалительной [6], противовирусной [7–9], антиоксидантной [10]. Известно также, что биологическое действие частично гидрированных пиримидиновых соединений в значительной мере зависит от характера и степени их функционализации [11, 12]. Например, установлено, что весьма перспективными объектами для фармакологических исследований являются амиды 2-оксо-1,2,3,4-тетрагидропиримидин-5-карбоновых кислот [13–16]. Биологические свойства их 2-тиоаналогов к настоящему времени практически не исследовались [17].

Известно, что активные формы кислорода (АФК) принимают участие в трансформации нормальной клетки в опухолевую, а также играют ключевую роль в инвазировании и метастазировании неоплазмы [18]. С учетом того, что одним из современных направлений экспериментальной онкологии является поиск препаратов, ингибирующих генерацию АФК в клетке, большой интерес вызывает изучение биологических эффектов пиримидинов Биджинелли. Представлялось целесообразным исследовать влияние такого типа соединений на супероксид-генерирующую активность митохондрий печени и опухолевой ткани крыс с трансплантированной карциномой Герена.

В настоящей работе трехкомпонентной конденсацией ацетоацетамидов (Ia–c), ароматических альдегидов (IIa–d) и тиомочевины в растворе уксусной кислоты при 50 °C с выходами 65–83 % синтезированы

новые амиды 4-арил-6-метил-2-тиоксо-1,2,3,4-тетрагидропиримидин-5-карбоновых кислот (IIIa–f). Их состав и строение подтверждено результатами измерений ИК, ЯМР ¹H и масс-спектров. В частности, ИК-спектры характеризуются полосами поглощения групп С=О (1655–1665 см⁻¹) и N–H (3260–3345 см⁻¹). В спектрах ЯМР ¹H наряду с сигналами NH-протонов пиримидинового цикла и амидной группы, а также протонов ароматических заместителей, наблюдаются характеристичные синглеты протонов H-4 гидрированного пиримидинового ядра при 5,33–5,62 м.д.



I: a) R=H; b) R=Ph; c) R=2-CF₃C₆H₄;

II: a) Ar=3-MeO-4-OH-C₆H₃; b) Ar=2-MeO-5-BrC₆H₂;

c) Ar=2,4-(MeO)₂C₆H₃; d) Ar=3-MeO-4-OH-5-BrC₆H₂;

III: a) R=H, Ar=3-MeO-4-OH-C₆H₃; b) R=H, Ar=2-MeO-5-BrC₆H₂;

c) R=Ph, Ar=3-MeO-4-OH-5-BrC₆H₂; d) R=2-CF₃C₆H₄,

Ar=3-MeO-4-OH-C₆H₃; e) R=2-CF₃C₆H₄, Ar=2-MeO-5-BrC₆H₂;

f) R=2-CF₃C₆H₄, Ar=2,4-(CH₃O)₂C₆H₃.

Экспериментальная химическая часть

ИК-спектры соединений в таблетках КВг записаны на приборе UR-20. Спектры ЯМР ¹H в (CD₃)₂SO измерены на спектрометре Bruker Avance DRX-500 (500,13, МГц), внутренний стандарт — ТМС. Масс-спектры получены на приборе PE SCIEX API 150 EX [детекторы UV (254 нм) и ELSD]. Данные элементного анализа

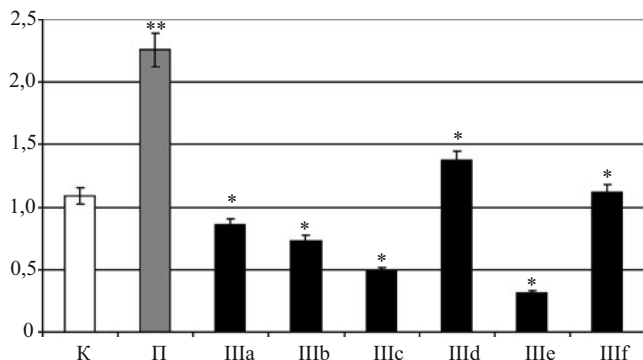


Рис. 1. Интенсивность генерации супероксидного радикала в митохондриальной фракции печени опухоленосителей (в нмоль/мин на мг белка) в условиях влияния соединений IIIa – f. К — интактные животные. П — интенсивность генерации супероксидного радикала в митохондриальной фракции печени на стадии активного роста карциномы Герена. Здесь и на рис. 2: * — достоверная разница в сравнении с опухоленосителями (группа П); ** — достоверная разница в сравнении с интактными животными (группа К).

синтезированных соединений соответствуют вычисленным значениям.

Амиды 4-арил-6-метил-2-тиоксо-1,2,3,4-тетрагидропиримидин-5-карбоновых кислот (IIIa-f). К раствору 0,02 моль ацетоацетамида (Ia – c) в 50 мл уксусной кислоты прибавляют 0,02 моль альдегида (IIa – d) и 2,28 г (0,03 моль) тиомочевины, выдерживают при 50 °С в течение 48 ч, а потом выливают в 200 мл воды. Образовавшийся осадок отфильтровывают и кристаллизуют из этанола.

Амид 4-(3-метокси-4-гидроксифенил)-6-метил-2-тиоксо-1,2,3,4-тетрагидропиримидин-5-карбоновой кислоты (IIIa). Выход 65 %, т. пл. 91 – 92 °С. ИК-спектр, см^{-1} : 1665 (C=O), 3290 – 3340 (N-H). Спектр ЯМР ^1H , δ , м.д.: 2,10 (с, 3H, CH_3), 3,69 (с, 3H, CH_3O), 5,33 (с, 1H, H^4), 6,71 – 6,83 (м, 3H_{аром.}), 7,08 – 7,12 (м, 2H, NH_2), 8,97 (уш.с., 1H, NH), 9,24 (с, 1H, OH), 9,75 (с, 1H, NH). Масс-спектр $[\text{M}+1]^+$ 293. $\text{C}_{13}\text{H}_{15}\text{N}_3\text{O}_3\text{S}$.

Амид 4-(2-метокси-5-бромфенил)-6-метил-2-тиоксо-1,2,3,4-тетрагидропиримидин-5-карбоновой кислоты (IIIb). Выход 82 %, т. пл. 116 – 117 °С. ИК-спектр, см^{-1} : 1655 (C=O), 3290 – 3345 (N-H). Спектр ЯМР ^1H , δ , м.д.: 2,07 (с, 3H, CH_3), 3,76 (с, 3H, CH_3O), 5,49 (с, 1H, H^4), 6,98 – 7,82 (м, 3H_{аром.}+NH₂), 8,95 (с, 1H, NH), 9,86 (с, 1H, NH). Масс-спектр $[\text{M}+1]^+$ 357. $\text{C}_{13}\text{H}_{14}\text{BrN}_3\text{O}_2\text{S}$.

Амид N-фенил-4-(3-бromo-4-гидрокси-5-метокси-фенил)-6-метил-2-тиоксо-1,2,3,4-тетрагидропиримидин-5-карбоновой кислоты (IIIc). Выход 60 %, т. пл. 113 – 114 °С. ИК-спектр, см^{-1} : 1665 (C=O), 3290 – 3335 (N-H). Спектр ЯМР ^1H , δ , м.д.: 2,07 (с, 3H, CH_3), 3,91 (с, 3H, CH_3O), 5,33 (с, 1H, H^4), 7,04 (д, 1H_{аром.}), 7,27 (д, 1H_{аром.}), 7,39 – 7,73 (м, 5H_{аром.}), 9,06 (с, 1H, NH), 9,37 (с, 1H, OH), 9,78 (с, 1H, NH), 9,99 (с, 1H, NH). Масс-спектр $[\text{M}+1]^+$ 448. $\text{C}_{19}\text{H}_{18}\text{BrN}_3\text{O}_3\text{S}$.

Амид N-(2-трифторметилфенил)-4-(3-метокси-4-гидроксифенил)-6-метил-2-тиоксо-1,2,3,4-тетрагидропиримидин-5-карбоновой кислоты (IIId). Выход

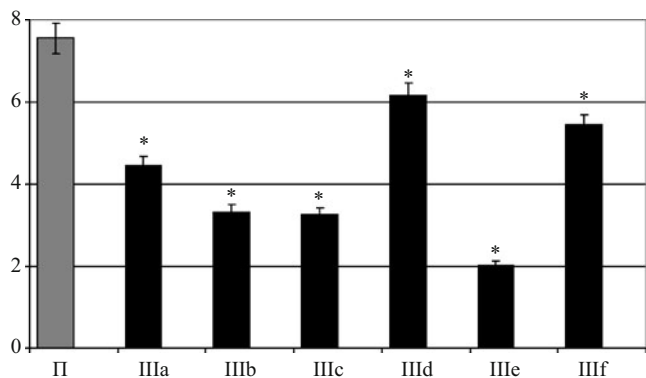


Рис. 2. Интенсивность генерации супероксидного радикала в митохондриальной фракции карциномы Герена (в нмоль/мин на мг белка) в условиях влияния соединений IIIa – f.

83 %, т. пл. 145 – 146 °С. ИК-спектр, см^{-1} : 1660 (C=O), 3265 – 3305 (N-H). Спектр ЯМР ^1H , δ , м.д.: 2,15 (с, 3H, CH_3), 3,75 (с, 3H, CH_3O), 5,28 (с, 1H, H^4), 6,76 – 6,88 (м, 3H_{аром.}), 7,27 (д, 1H_{аром.}), 7,44 (т, 1H_{аром.}), 7,62 (т, 1H_{аром.}), 7,69 (д, 1H_{аром.}), 8,99 (с, 1H, NH), 9,25 (с, 1H, OH), 9,37 (с, 1H, NH), 9,93 (с, 1H, NH). Масс-спектр $[\text{M}+1]^+$ 438. $\text{C}_{20}\text{H}_{18}\text{F}_3\text{N}_3\text{O}_3\text{S}$.

Амид N-(2-трифторметилфенил)-4-(2-метокси-5-бромфенил)-6-метил-2-тиоксо-1,2,3,4-тетрагидропиримидин-5-карбоновой кислоты (IIIe). Выход 82 %, т. пл. 104 – 105 °С. ИК-спектр, см^{-1} : 1665 (C=O), 3265 – 3305 (N-H). Спектр ЯМР ^1H , δ , м.д.: 2,11 (с, 3H, CH_3), 3,77 (с, 3H, CH_3O), 5,62 (с, 1H, H^4), 7,00 (д, 1H_{аром.}), 7,27 – 7,69 (м, 6H_{аром.}), 9,08 (с, 1H, NH), 9,44 (с, 1H, NH), 10,00 (с, 1H, NH). Масс-спектр $[\text{M}+1]^+$ 501. $\text{C}_{20}\text{H}_{17}\text{BrF}_3\text{N}_3\text{O}_2\text{S}$.

Амид N-(2-трифторметилфенил)-4-(2,4-диметокси-фенил)-6-метил-2-тиоксо-1,2,3,4-тетрагидропиримидин-5-карбоновой кислоты (IIIf). Выход 74 %, т. пл. 156 – 157 °С. ИК-спектр, см^{-1} : 1665 (C=O), 3280 – 3325 (N-H). Спектр ЯМР ^1H , δ , м.д.: 2,12 (с, 3H, CH_3), 3,66 (с, 3H, CH_3O), 3,76 (с, 3H, CH_3O), 5,56 (с, 1H, H^4), 6,57 (с, 2H_{аром.}), 7,10 (д, 1H_{аром.}), 7,29 (д, 2H_{аром.}), 7,63 – 7,67 (м, 2H_{аром.}), 8,94 (с, 1H, NH), 9,16 (с, 1H, NH), 9,91 (с, 1H, NH). Масс-спектр $[\text{M}+1]^+$ 452. $\text{C}_{21}\text{H}_{20}\text{F}_3\text{N}_3\text{O}_3\text{S}$.

Экспериментальная биологическая часть

Исследования проводили на 24 белых нелинейных крысах-самках массой 110 – 130 г, которые содержались на стандартном рационе вивария. Животных разделяли на 2 группы: интактные крысы (К), крысы с трансплантированной карциномой Герена (П).

Трансплантацию карциномы Герена осуществляли путем подкожного введения 0,5 мл 30 % суспензии раковых клеток в изотоническом растворе натрия хлорида. Штамм опухоли любезно предоставлен Институтом экспериментальной патологии, онкологии и радиобиологии им. Р. Е. Кавецкого НАН Украины (г. Киев) из Клеточного банка линий тканей человека и животных.

Эвтаназию под легким эфирным наркозом с использованием метода цервикальной дислокации проводили на 14 сут (логарифмическая стадия опухолевого роста) после имплантации опухоли.

Свежевыделенную печень и опухолевую ткань промывали охлажденным физиологическим раствором, измельчали и переносили в гомогенизатор Поттера. Все операции проводили при 0–3 °С. Среда гомогенизации содержала 250 мМ сахарозу, 1 мМ ЭДТА, 10 мМ трис HCl, pH 7,4. Ядра осаждали центрифугированием гомогената при 700 · g в течение 10 мин. Из супернатанта осаждали фракцию митохондрий при 10000 · g на протяжении 10 мин. Осадок дважды промывали средой выделения без ЭДТА [19].

Изучение влияния соединений (IIIa–f) на супероксид-генерирующую активность митохондрий проводили в экспериментах *in vitro*. Все исследуемые соединения Биджинелли растворяли в диметилсульфоксиде (ДМСО). Концентрация ДМСО в среде определения супероксида не превышала 1 % от общего объема пробы. Для исследования отбирали по 0,05 мл митохондриальной фракции, вносили исследуемые соединения Биджинелли в конечной концентрации в пробе 10⁻³ М и инкубировали 5 мин при 37 °С в среде регистрации генерации супероксид анион-радикала [10]. Генерацию супероксидного анион-радикала митохондриальной электронотранспортной цепью оценивали в тесте с нитросиним тетразолием [20]. Достоверность различий между средними значениями устанавливали с помощью *t*-критерия Стьюдента при уровне значимости *p* < 0,05.

Результаты исследований показали, что все исследуемые соединения в концентрации 10⁻³ М проявляют ингибирующее влияние на супероксид-генерирующую способность митохондрий как в печени опухоленосителей, так и в ткани карциномы Герена (рис. 1, 2). При этом наиболее выраженной активностью характеризуются пиримидинтионы (IIIa, b, c, e), содержащие в положении 4 гетероцикла замещенные 4-фенольные или 3-бромфенильные фрагменты, которые ингибируют продуцирование супероксидного анион-радикала в митохондриях печени опухоленосителей в 3–7 раз, а в ткани карциномы Герена — в 2–3 раза.

Полученные результаты коррелируют с литературными данными [10], согласно которым соединения Биджинелли в низких концентрациях способны ингибировать продуцирование супероксидного анион-радикала, а в высоких — проявляют праймирующее влияние на продуцирование АФК.

Таким образом, амиды 2-тиоксо-1,2,3,4-тетрагидропиримидин-5-карбоновой кислоты представляют собой перспективный ряд соединений для создания на их основе эффективных средств для коррекции роста опухолей.

ЛИТЕРАТУРА

1. C. O. Kappe, *Tetrahedron*, **49**, 6937–6963 (1993).
2. F. J. L. Aparicio, F. J. L. Herrera, *Carbohydr. Res.*, **69**, 243–246 (1979).
3. B. C. O'Reilly, K. S. Atwal, *Heterocycles*, **26**, 1185–1188 (1987).
4. L. E. Overman, M.-H. Rabinowitz, P. A. Renhowe, *J. Am. Chem. Soc.*, **117**, 2657–2660 (1995).
5. Y. S. Sadanandam, M. M. Shetty, P. V. Diwan, *Eur. J. Med. Chem.*, **27**, 87–92 (1992).
6. Patent EP 409233; *Chem. Abstr.*, **114**, 247302z (1991).
7. E. W. Hurst, N. Y. Ann, *Acad. Sci.*, **98**, 275–286 (1962).
8. E. W. Hurst, R. J. Hull, *Med. Chem.*, 215–229 (1965).
9. Patent Brit. 984365; *Chem. Abstr.*, **62**, 13159f (1965).
10. Ю. В. Шаталин, В. С. Шубина, А. С. Фисюк, *Цитология*, **52**(3), 242–247 (2010).
11. D. Dallinger, A. Stadler, O. C. Kappe, *Pure Appl. Chem.*, **76**(5), 1017–1024 (2004).
12. J.-P. Wan, Y. Liu, *Synthesis*, **23**, 3943–3953 (2010).
13. P. B. R. Kumar, G. Sankur, N. R. B. Baig, et al., *Eur. J. Med. Chem.*, **44**, 4192–4198 (2009).
14. D. A. Ibrahim., A. M. El-Metwally, et al., *Eur. J. Med. Chem.*, **45**, 1158–1166 (2010).
15. O. Allam, S. A. Khan, N. Siddiqui, et al., *Eur. J. Med. Chem.*, **45**, 5113–5119 (2010).
16. J. D. Akbari, P. K. Kachakadia, S. D. Tala, et al., *Phosphorus, Sulfur, Silicon, Related Elements*, **183**, 1119–1122 (2008).
17. В. Л. Гейн, И. В. Холкин, Т. М. Зашугаева и др., *Хим.-фарм. журн.*, **46**(2), 49–51 (2012); *Pharm. Chem. J.*, **46**(2), 144–116 (2012).
18. Б. Н. Лю, *Успехи совр. биол.*, **125**(6), 569–570 (2005).
19. М. М. Марченко, О. Н. Волошук, *Радиац. биол. Радиоэкология*, **52**(5), 496–502 (2012).
20. В. О. Костенко, О. І. Цебржинський, *Фізіол. журн.*, **46**(5), 56–61 (2000).

Поступила 01.12.12

SYNTHESIS AND ANTIOXIDANT ACTIVITY OF 2-THIOXO-1,2,3,4-TETRAHYDROPYRIMIDIN-5-CARBOXYLIC ACID AMIDES

O. V. Kushnir^{1*}, O. N. Voloshchuk¹, R. I. Eften'eva¹, M. M. Marchenko¹, and M. V. Vovk²

¹ Fedkovych Chernivtsy National University, 58002 Chernivtsy;

² Institute of Organic Chemistry, National Academy of Sciences of Ukraine, 02660 Kiev, Ukraine;

* e-mail: oleg.kushn@ukr.net

A series of 2-thioxo-1,2,3,4-tetrahydropyrimidin-5-carboxylic acid amides have been synthesized by condensation of acetoacetamides with arylaldehydes and thiourea. The structures of the synthesized compounds have been confirmed by IR, ¹H NMR, and mass spectrometry techniques. Some of the obtained compounds possess pronounced antioxidant activity with respect to superoxide-generating activity of mitochondria in the liver and transformed tissues of rats bearing Guerin's carcinoma.

Keywords: 2-thioxo-1,2,3,4-tetrahydropyrimidin-5-carboxylic acid amides; Biginelli reaction; condensation; superoxide anion radical; superoxide-generating activity; Guerin's carcinoma