

УДК 615.076.9 : 615.91

ИЗУЧЕНИЕ ГЕПАТОПРОТЕКТОРНОЙ АКТИВНОСТИ ПРОИЗВОДНЫХ ПИРИМИДИНА *IN VITRO*

Э.Р. Кудояров¹, Д.Д. Каримов¹,
Т.Г. Кутлина¹, Д.О. Каримов¹,
Г.Ф. Мухаммадиева¹, Н.Ю. Хуснутдинова¹,
К.В. Данилко², А.Р. Гимадиева³,
А.Б. Бакиров¹

¹ФБУН «Уфимский НИИ медицины труда и экологии человека» Минздрава России, 450106, г. Уфа, Российская Федерация

²ФГБОУ ВО «Башкирский государственный медицинский университет» Минздрава России, 450008, г. Уфа, Российская Федерация

³ФГБУН «Уфимский институт химии» РАН, 450054, г. Уфа, Российская Федерация

В статье представлены данные об экспериментальном изучении гепатопротекторной активности производных пиримидина (5-амино-6-метилурацил, 5-метиламино-6-метилурацил, 1,3,6-триметил-2,4-диоксо-1,2,3,4-тетрагидропиримидин-5-ила N-фталилвалинат, 5-пиперидинометил-6-метилурацил, 3-морфолинометил-5-нитро-6-метилурацил) при инкубации гепатоцитов мыши МН-22а, затравленных тетрахлорметаном. Для определения жизнеспособности клеток использовали МТТ-тест. Положительным контролем были клетки, затравленные только тетрахлорметаном (100 мМ, 1% ДМСО). Среди соединений, исследованных в настоящем эксперименте, наибольшей эффективностью для выживания клеток печени в условиях затравки тетрахлорметаном обладали 5-амино-6-метилурацил (400 мкМ) и 3-морфолинометил-5-нитро-6-метилурацил (50 мкМ). Повышение выживаемости клеток (относительно значений в группе положительного контроля) в условиях затравки тетрахлорметаном и лечения этими препаратами составило: 5-амино-6-метилурацил – до 27,5% ($p < 0,05$), 3-морфолинометил-5-нитро-6-метилурацил – до 22,42% ($p < 0,05$). 5-метиламино-6-метилурацил и 1,3,6-триметил-2,4-диоксо-1,2,3,4-тетрагидропиримидин-5-ила N-фталилвалинат имеют низкую токсичность, но не проявили антиоксидантных свойств. 5-пиперидинометил-6-метилурацил (400 мкМ) проявил высокую токсичность ($30,04 \pm 0,90\%$; $p < 0,05$) и выживаемость обработанных им клеток при затравке тетрахлорметаном оказалась ниже или равна значениям положительного контроля, что не позволяет применять его в качестве антиоксиданта.

Ключевые слова: пиримидин, урацил, выживаемость, антиоксидант, *in vitro*.

Введение. Химические вещества, содержащие в своей структуре пиримидиновое кольцо, часто встречаются в природе и участвуют в биологических процессах (в частности, урацил, тимин, цитозин, группа витамина В₁) [1]. Синтетические соединения, имеющие в составе пири-

мидиновое кольцо, представляют собой группу химических веществ с большим разнообразием фармакологических свойств. Заслуга в основополагающем изучении производных пиримидина и, особенно, метилурацила принадлежит Н. В. Лазареву [2]. Метилурацил ускоряет про-

Кудояров Эльдар Ренатович (Kudoyarov Eldar Renatovich), младший научный сотрудник отдела токсикологии и генетики ФБУН «Уфимский НИИ медицины труда и экологии человека», e.kudoyarov@yandex.ru

Каримов Денис Дмитриевич (Karimov Denis Dmitrievich), младший научный сотрудник отдела токсикологии и генетики ФБУН «Уфимский НИИ медицины труда и экологии человека», karriden@gmail.com

Кутлина Татьяна Георгиевна (Kutlina Tatyana Georgievna), младший научный сотрудник отдела токсикологии и генетики ФБУН «Уфимский НИИ медицины труда и экологии человека», tatyana.kutlina.92@mail.ru

Каримов Денис Олегович (Karimov Denis Olegovich), кандидат медицинских наук, заведующий отделом токсикологии и генетики ФБУН «Уфимский НИИ медицины труда и экологии человека», karimovdo@gmail.com

Мухаммадиева Гузель Фанисовна (Mukhammadieva Guzel Fanisovna), кандидат биологических наук, старший научный сотрудник отдела токсикологии и генетики ФБУН «Уфимский НИИ медицины труда и экологии человека», ufniiimt@mail.ru

Хуснутдинова Надежда Юрьевна (Khusnutdinova Nadezhda Yurevna), научный сотрудник отдела токсикологии и генетики ФБУН «Уфимский НИИ медицины труда и экологии человека», h-n-yu@yandex.ru

Данилко Ксения Владимировна (Danilko Kseniya Vladimirovna), кандидат биологических наук, доцент, руководитель лаборатории клеточных культур, старший научный сотрудник Центральной научно-исследовательской лаборатории ФГБОУ ВО БГМУ Минздрава РФ, kse-danilko@yandex.ru

Гимадиева Альфия Раисовна (Gimadieva Alfiya Raisovna), кандидат химических наук, старший научный сотрудник лаборатории фармакофорных циклических систем ФГБУН «Уфимский институт химии» РАН, alf_gim@mail.ru

Бакиров Ахат Бариевич (Bakirov Akhat Barievich), доктор медицинских наук, профессор, директор ФБУН «Уфимский НИИ медицины труда и экологии человека», fbun@uniimtech.ru

цессы клеточной регенерации, ускоряет заживление ран, стимулирует клеточные и тканевые факторы защиты, стимулирует лейко- и эритропоэз [1]. Оксиметилурацил всесторонне был изучен коллективом ученых под руководством В. А. Мышкина [3]. Производные пиримидина используют в терапии инфекционных, хирургических, неврологических, онкологических и многих других заболеваний [4-6].

Тетрахлорметан относят к веществам, часто применяемым в модельных системах для развития окислительного стресса. При поступлении тетрахлорметана (ТХМ) в организм млекопитающего в гепатоцитах происходит нарушение структуры и функций клеточных мембран, приводящее к генерации активных форм кислорода и перекисному окислению биомолекул клетки [3]. Одним из результатов интоксикации ТХМ является образование аддуктов АФК с ДНК [3,7], что может привести к возникновению мутаций [3, 8].

В лаборатории фармакофорных циклических систем Уфимского института химии РАН были разработаны и синтезированы следующие вещества, потенциально имеющие антиоксидантные свойства: 5-амино-6-метилурацил, 5-метиламино-6-метилурацил, 1,3,6-триметил-2,4-диоксо-тетрагидропиримидин-5-ила N-фталилваллилат, 5-пиперидинометил-6-метилурацил, 3-морфолинометил-5-нитро-6-метилурацил [2,9].

Цель нашего исследования: определение антиоксидантной активности вышеупомянутых веществ на культуре гепатоцитов мыши МН-22а и интерпретация полученных данных для дальнейшей характеристики исследуемых субстанций *in vivo*.

Материалы и методы исследования. Исследование антиоксидантных свойств веществ выполнено на клеточной линии МН-22а (мышь СЗНА, гепатома, монослой; «Биолот»). Культура клеток была посеяна в стерильные 96-луночные планшеты для адгезионных клеточных культур (SPL Life Sciences, Республика Корея). Для затравки клеток были сформированы экспериментальные группы: интактные клетки (отрицательный контроль); клетки, затравленные 100 мМ ТХМ (положительный контроль); клетки, затравленные испытуемым веществом в концентрации 400 мкМ; клетки, затравленные 100 мМ раствором ТХМ и обработанные испытуемым веществом в одной из 7 концентраций (12,5, 25, 50, 100, 200, 400 или 800 мкМ). На каждом микропланшете определялась выживаемость клеток в группах положительного и отрицательного контролей.

Все группы клеток инкубировали 48 часов после затравки ТХМ и добавления растворов со-

единений. Для растворения тетрахлорметана применяли диметилсульфоксид (ДМСО), который также содержался в питательной среде для культивирования клеток в каждой из экспериментальных групп (1% об.). Для измерения метаболической активности и последующего расчета выживаемости инкубированных клеток с помощью МТТ-теста по оптической плотности культуральной среды руководствовались методикой СТП14.621.21.0008.12-2015 [10]. Оптическую плотность растворов измеряли на многофункциональном микропланшетном ридере Spark 20M (Tecan, Швейцария) при длинах волн света 530 и 620 нм. Для проверки статистической достоверности различий между группами по оптической плотности применяли критерий Краскела-Уоллиса для сравнения нескольких независимых выборок и критерий Манна-Уитни для сравнения двух независимых выборок. По каждой группе были рассчитаны среднее арифметическое и стандартная ошибка среднего. Полученные значения выживаемости клеток использовали для построения графиков зависимости от концентрации исследуемых веществ. Заштрихованной областью на графиках для наглядности обозначены среднее арифметическое и ошибку среднего выживаемости клеток группы положительного контроля. Статистический анализ результатов выполнен в программе SPSS Statistics 21. Построение графиков выполнено в программе GraphPad Prism 8. Обработка рисунков произведена в программе Adobe Photoshop CS3. Для оценки гепатозащитных свойств находили разность (P) между значениями выживаемости экспериментальной группы и группы клеток, затравленной 100 мМ раствором ТХМ. Экспериментальная часть работы была выполнена в лаборатории клеточных культур Центральной научно-исследовательской лаборатории ФГБОУ ВО БГМУ Минздрава РФ.

Результаты и обсуждение. Влияние 5-амино- и 5-метиламино-6-метилурацила было проверено на клетках, культивированных на одном микропланшете. Выживаемость в группе клеток, обработанных только 400 мкМ 5-амино-6-метилурацилом составила $96,35 \pm 5,92\%$ ($p > 0,05$) относительно группы отрицательного контроля, что указывает на отсутствие токсичности соединения. Выживаемость в группе клеток, затравленных 100 мМ ТХМ составила в среднем $37,75 \pm 4,68\%$. Различия между экспериментальными группами, обработанными 5-амино-6-метилурацилом и положительным контролем являются статистически значимыми (критерий Краскала-Уоллиса $H=17,707$; $p=0,013$). Средняя выживаемость клеток, затравленных ТХМ и обработанных 400 мкМ 5-амино-6-метилурацилом была равна $65,25 \pm 9,85\%$. Выживаемость

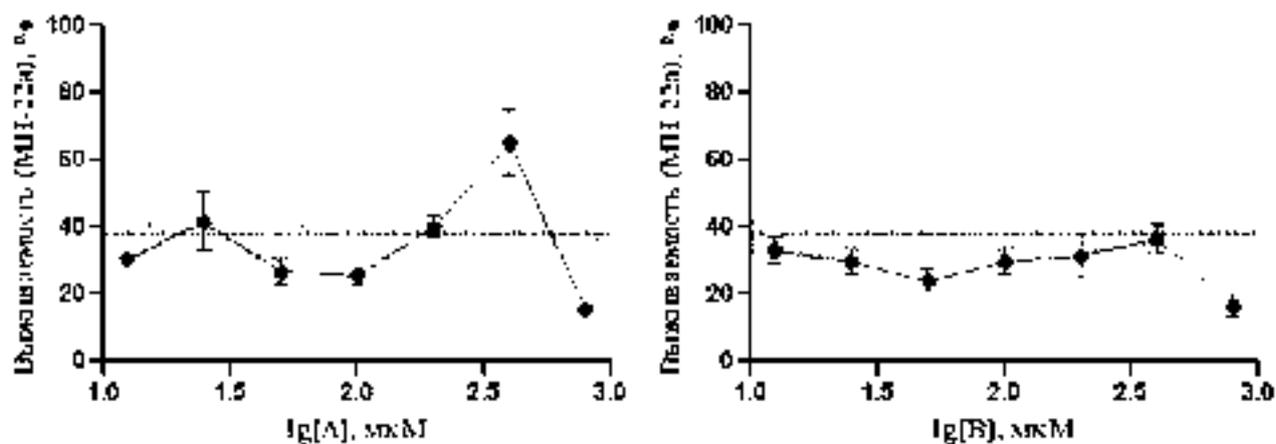


Рис. 1. Графики зависимости выживаемости от логарифма концентрации 5-амино-6-метилурацила (А) и 5-метиламино-6-метилурацила (В) при затравке тетрахлорметаном.

при упомянутой концентрации соединения явилась наивысшей среди экспериментальных групп и оказалась на 27,5% выше, чем в группе клеток, затравленных только 100 мМ ТХМ ($p < 0,05$) (рис.1).

Выживаемость в группе клеток, обработанных только 400 мкМ 5-метиламино-6-метилурацилом составила $81,45 \pm 2,19\%$, что указывает на токсичность соединения относительно группы отрицательного контроля ($p < 0,05$). Различия между экспериментальными группами, обработанными 5-метиламино-6-метилурацилом, и положительным контролем являются статистически незначимыми (критерий Крускала-Уоллиса $H=10,867$; $p=0,145$) (рис. 1). Выявленный факт указывает на неэффективность применения 5-метиламино-6-метилурацила для преодоления окислительного воздействия тетрахлорметана. Сравнение химической структуры 5-амино-6-метилурацила и 5-метиламино-6-метилурацила позволяет предположить, что причина разницы в результатах эксперимента вызваны наличием метильной группы, ковалентно связанной с аминогруппой в С5-положении. Кроме того, возможно, антиоксидантные свойства молекулы 5-амино-6-метилурацила могут быть связаны с тем, что аминогруппа является донором ионов водорода, которые реагируют с анионами, образующимися при окислительном стрессе. Важность отсутствия метильной группы, связанной с аминогруппой в С5-положении также подтверждает ранее обнаруженный факт, что при экспресс-оценке антиоксидантной активностиДФПГ-тестом [9] 5-амино-6-метилурацил проявлял более высокие антиоксидантные свойства ($IC_{50}=5$ мкг/мл; fk_7^1

¹ fk_7 – константа скорости реакции пероксидных радикалов 1,4-диоксана с производными урацила (f – стехиометрический коэффициент ингибирования) [9].

(333 К) = $(1,44 \pm 0,14) \cdot 10^5 M^{-1}c^{-1}$), по сравнению с 5-метиламино-6-метилурацилом ($IC_{50}=20$ мкг/мл; fk_7 (333 К) = $(3,8 \pm 0,4) \cdot 10^3 M^{-1}c^{-1}$).

Выживаемость в группе клеток, обработанных только 400 мкМ 5-пиперидинометил-6-метилурацилом составила $30,04 \pm 0,90\%$, что указывает на повышенную токсичность соединения ($p < 0,05$). Различия между экспериментальными группами, обработанными 5-пиперидинометил-6-метилурацилом, и положительным контролем являются статистически значимыми (критерий Крускала-Уоллиса $H=16,651$; $p=0,02$). Однако, средняя выживаемость клеток, затравленных ТХМ и инкубированных с 5-пиперидинометил-6-метилурацилом была ниже (при концентрациях 400, 800 мкМ; $p < 0,05$) или не отличалась от значений (при концентрациях 12,5, 25, 50, 100, 200 мкМ; $p > 0,05$) в группе клеток, затравленных только 100 мМ ТХМ ($51,61 \pm 8,40\%$) при попарном сравнении с применением критерия Манна-Уитни (рис.2). Из полученных результатов можно сделать вывод о том, что совместная инкубация в клеточной среде синтетического соединения (400 мкМ) с тетрахлорметаном приводит к повышению суммарной токсичности ($p < 0,05$), что констатирует неэффективность применения 5-пиперидинометил-6-метилурацила в качестве антиоксиданта.

Выживаемость в группе клеток, обработанных только 400 мкМ 3-морфолинометил-5-нитро-6-метилурацилом составила $82,00 \pm 1,12\%$, что указывает на повышенную токсичность соединения ($p < 0,05$). Различия между экспериментальными группами и положительным контролем являются статистически значимыми (критерий Крускала-Уоллиса $H=16,467$; $p=0,021$). Однако, выживаемость гепатоци-

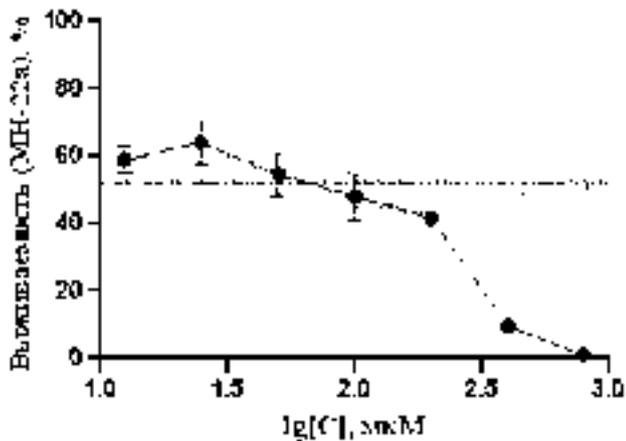


Рис. 2. График зависимости выживаемости от логарифма концентрации 5-пиперидинометил-6-метилурацила (С) при затравке тетрахлорметаном.

тов, затравленных ТХМ и инкубированных с 50 мкМ 3-морфолинометил-5-нитро-6-метилурацилом составила $56,63 \pm 2,13\%$, что на 22,42% выше аналогичного показателя в положительном контроле ($p < 0,05$) (рис.3). Полученный результат свидетельствует о наличии антиоксидантных свойств у 3-морфолинометил-5-нитро-6-метилурацила.

Еще одно из исследованных производных урацила – 1,3,6-триметил-2,4-диоксо-1,2,3,4-тетрагидропиримидин-5-ила N-фталилвалинат (соединение Е) представляет собой конъюгат производного пиримидина с аминокислотой валином. Выживаемость в группе клеток, обработанных 400 мкМ соединением Е без затравки ТХМ составила $95,26 \pm 4,07\%$, что указывает на отсутствие токсичности испытываемого вещества ($p > 0,05$).

Статистически достоверных различий между экспериментальными группами и положительным контролем нет (рис. 4) (критерий Крускала-Уоллиса $H=4,579$; $p=0,711$), что исключает необходимость дальнейшего изучения выраженности антиоксидантных свойств у соединения Е.

Заключение. Таким образом, среди соединений, исследованных в настоящем эксперименте, наибольшей эффективностью для выживания клеток печени в условиях затравки тетрахлорметаном обладали 5-амино-6-метилурацил (400 мкМ) и 3-морфолинометил-5-нитро-6-метилурацил (50 мкМ). Повышение выживаемости клеток (относительно значений в группе положительного контроля) в условиях затравки тетрахлорметаном и составило при обработке: 5-амино-6-метилурацилом – до 27,5% ($p < 0,05$), 3-морфолинометил-5-нитро-6-метилурацилом – до 22,42% ($p < 0,05$).

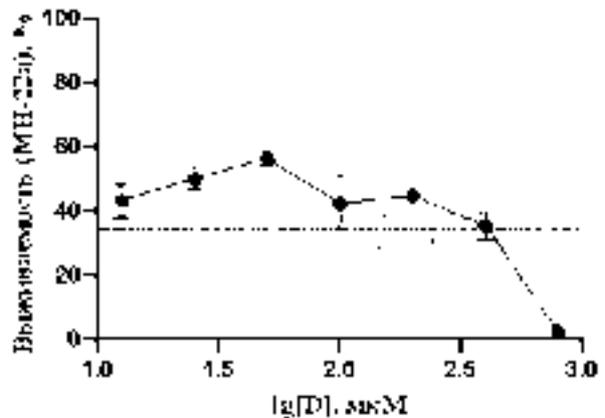


Рис. 3. График зависимости выживаемости от логарифма концентрации 3-морфолинометил-5-нитро-6-метилурацила (D) при затравке тетрахлорметаном. Выживаемость при затравке 100 мМ тетрахлорметаном составила $34,21 \pm 5,52\%$.

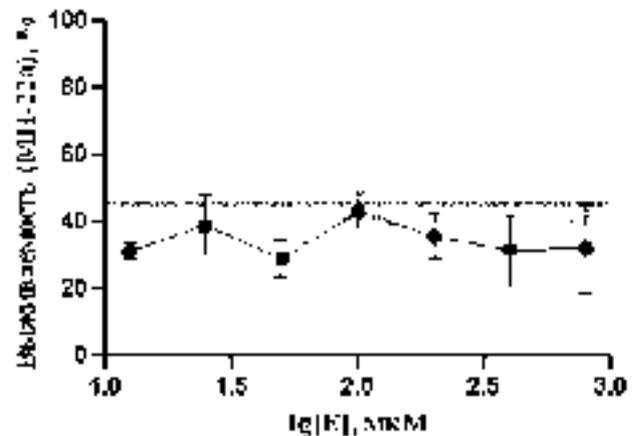


Рис. 4. График зависимости выживаемости от логарифма концентрации 1,3,6-триметил-2,4-диоксо-1,2,3,4-тетрагидропиримидин-5-ила N-фталилвалината (Е) при затравке тетрахлорметаном. Выживаемость при затравке 100 мМ тетрахлорметаном составила $45,29 \pm 5,69\%$.

5-метиламино-6-метилурацил и 1,3,6-триметил-2,4-диоксо-1,2,3,4-тетрагидропиримидин-5-ила N-фталилвалинат имеют низкую токсичность, но не проявили антиоксидантных свойств. 5-пиперидинометил-6-метилурацил (400 мкМ) проявил высокую токсичность ($30,04 \pm 0,90\%$; $p < 0,05$) и выживаемость обработанных им клеток при затравке тетрахлорметаном оказалась ниже или равна значениям положительного контроля, что констатирует неэффективность его применения в качестве антиоксиданта.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Машковский М.Д. Лекарственные средства. М.: Новая волна; 2002.
2. Гимадиева А.Р., Чернышенко Ю.Н., Абдрахманов И.Б., Мустафин А.Г. Синтез, модификации и биологическая активность урацилов. Уфа: Гилем; 2013.
3. Мышкин В.А., Ибатуллина Р.Б., Бакиров А.Б. Поражение печени химическими веществами (функционально-метаболические нарушения, фармакологическая коррекция). Уфа: Гилем; 2007.
4. Петрова И.В., Катаев В.А., Мещерякова С.А., Николаева К.В., Мунасипова Д.А., Фархутдинов Р.Р. Антиоксидантные свойства производных пиримидина. Медицинский вестник Башкортостана. 2013; 8(4):64-7.
5. Самотруева М.А., Цибизова А.А., Ясенявская А.Л., Озеров А.А., Тюренков И. Н. Фармакологическая активность производных пиримидинов. Астраханский медицинский журнал. 2067(4):44-6
6. Зимин Ю.С., Борисова Н.С., Тимербаева Г.Р., Гимадиева А.Р., Мустафин А.Г. Получение, токсичность и противовоспалительная активность комплексных соединений производных урацила с полифункциональными кислотами. Химико-фармацевтический журнал. 2016; 50(10):22-6.
7. Гривенникова В.Г., Виноградов А.Д. Генерация активных форм кислорода митохондриями. Успехи биологической химии. 2013; 53:245-96
8. de Fouw J. Environmental Health Criteria 208, Carbon Tetrachloride. Available at: <http://www.inchem.org/documents/ehc/ehc/ehc208.htm>. (Accessed 9 March 2019).
9. Гимадиева А.Р., Хазимуллина Ю.З., Белая Е.А., Зимин Ю.С., Абдрахманов И.Б., Мустафин А.Г. Экспресс-оценка антиоксидантной активности производных урацила. Биомедицинская химия. 2015; 61(6):765-9.
10. СТП-14.621.21.0008.12-20 Методика определения цитотоксичности веществ МТТ-тестом на культуре нормальных клеток человека HEK-2 Черногловка: Издательство ИФAB; 2015.

REFERENCES:

1. Mashkovsky M.D. Medicines. Moscow: New wave; 2002 (in Russian).
2. Gimadiev A.R., Chernyshenko Yu.N., Abdrakhmanov I.B., Mustafin A.G. Synthesis, modifications and biological activity of uracils. Ufa: Gilem; 2013 (in Russian).
3. Myshkin V.A., Ibatullina R.B., Bakirov A.B. Liver damage by chemicals (functional and metabolic disorders, pharmacological correction). Ufa: Gilem; 2007 (in Russian).
4. Petrova I.V., Kataev V.A., Meshcheryakova S.A., Nikolaeva K.V., Munasipova D.A., Farkhutdinov R.R. Antioxidant properties of pyrimidine derivatives. Medical Bulletin of Bashkortostan. 2013; 8(4):64-7 (in Russian).
5. Samotrueva M.A., Tsibizova A.A., Yasyavskaya A.L., Ozerov A.A., Tyurenkov I. N. Pharmacological activity of pyrimidine derivatives. Astrakhan Medical Journal. 2067(4):44-6 (in Russian).
6. Zimin Yu.S., Borisova N.S., Timerbaeva G.R., Gimadiev A.R., Mustafin A.G. Complexes of uracil derivatives with polyfunctional acids: preparation, toxicity and anti-inflammatory activity. Chemical and Pharmaceutical Journal. 2016; 50(10):226 (in Russian).
7. Grivennikova V.G., Vinogradov A.D. Generation of reactive oxygen species by mitochondria. // Advances in biological chemistry. 2013; 53:245-96 (in Russian).
8. de Fouw J. Environmental Health Criteria 208, Carbon Tetrachloride. Available at: <http://www.inchem.org/documents/ehc/ehc/ehc208.htm>. (Accessed 9 March 2019).
9. Gimadiev A.R., Khazimullina Yu.Z., Belaya E.A., Zimin Yu.S., Abdrakhmanov I.B., Mustafin A.G. Rapid assessment of antioxidant activity of uracil derivatives. Biomedical chemistry. 2015; 61(6):765-9 (in Russian).
10. STP-14.621.21.0008.12-20 Methods of determining the cytotoxicity of MTT-test substances on the culture of normal human cells HEK-2 Chernogolovka: IPAC Publ., 2015 (in Russian).

E.R. Kudoyarov¹, D.D. Karimov¹, T.G. Kutlina¹, D.O. Karimov¹, G.F. Mukhammadieva¹, N.Yu. Khusnutdinova¹, K.V. Danilko², A.R. Gimadieva³, A.B. Bakirov¹

RESEARCH OF HEPATOPROTECTIVE ACTIVITY OF PYRIMIDINE DERIVATIVES IN VITRO

¹Ufa Research Institute of Occupational Medicine and Human Ecology, 450106, Ufa, Russian Federation

²Bashkir State Medical University, 450008, Ufa, Russia Federation

³Ufa Institute of Chemistry, Ufa Branch of RAS, 450054, Ufa, Russian Federation

The article presents data on experimental study of the hepatoprotective activity of pyrimidine derivatives (5-amino-6-methyluracil, 5-methylamino-6-methyluracil, 1,3,6-trimethyl-2,4-dioxo-1,2,3,4-tetrahydropyrimidin-5-yl N-phtalyl valinate, 5-piperidinomethyl-6-methyluracil, 3-morpholinomethyl-5-nitro-6-methyluracil) by incubation of mouse hepatocytes MH-22a poisoned with carbon tetrachloride. MTT-test was used to determine cell viability. Positive control was cells treated only with carbon tetrachloride (100 mM, 1% DMSO). Among compounds studied in this experiment 5-amino-6-methyluracil (400 μM) and 3-morpholinomethyl-5-nitro-6-methyluracil (50 μM) were the most effective for the survival of liver cells under seeding conditions. The increase in cell survival (relative to the values in the positive control group) under the conditions of tetrachloromethane priming and treatment with these drugs was up to 27,5% ($p < 0,05$) for 5-amino-6-methyluracil and 22,42% ($p < 0,05$) for 3-morpholinomethyl-5-nitro-6-methyluracil. The compounds 5-methylamino-6-methyluracil and 1,3,6-trimethyl-2,4-dioxo-1,2,3,4-tetrahydropyrimidin-5-yl N-phtalyl valinate have low toxicity, but did not show antioxidant properties. The derivative 5-piperidinomethyl-6-methyluracil (400 μM) showed high toxicity ($30,04 \pm 0,90\%$; $p < 0,05$) and the survival of the cells treated with carbon tetrachloride was lower or equal to the values of positive control, which does not allow it to be used as an antioxidant.

Keywords: *pyrimidine, uracil, survival, antioxidant, in vitro.*

Материал поступил в редакцию 02.04.2019 г.