



УДК 577.181

СИНТЕЗ ПРОИЗВОДНЫХ УРАЦИЛА И ТЕОФИЛЛИНА И ИССЛЕДОВАНИЕ ИХ ВЛИЯНИЯ НА ТРАНСПОРТ ГЛЮКОЗЫ В КЛЕТКИ ПЕЧЕНИ КРЫС

© 2000 г. О. Н. Леонов, М. Л. Циренина, **Е. И. Мельник**, В. М. Девиченский[#],
Л. Ю. Крюкова, Е. А. Воронцов*, С. Л. Кузнецов*, Л. Н. Крюков*

Институт биологической медицины, 117815, Москва, ул. Академика Опарина, 4;

* Центр медико-биологических и экологических проблем РАЕН, Москва

Поступила в редакцию 16.09.99 г. Принята к печати 01.12.99 г.

Синтезирован ряд производных урацила и теофиллина. Показано, что среди полученных соединений наиболее выраженный стимулирующий эффект в отношении транспорта 2-дезоксиглюкозы в клетки печени крыс *in vitro* проявил 4-амино-1,3-диметил-5-нонаноиламиноурацил.

Ключевые слова: урацил, производные; теофиллин, производные; инсулин; транспорт глюкозы; гепатоциты.

По распространенности значительное место среди заболеваний занимает сахарный диабет [1]. Реальные пути излечения от этой тяжелой обменной патологии появляются по мере развития представлений о механизме реализации инсулинового сигнала в специфический клеточный ответ, т.е. в изменение уровня транспорта глюкозы, ее метаболизма, интенсивности гликогенолиза, гликогенеза и пр. Так, решение вопроса о вторичных посредниках инсулина [2] позволяет вплотную подойти к проблемам заместительной инсулиновой терапии, основанной на регуляции инсулинзависимых процессов без экзогенного введения инсулина. Не менее ценными оказываются подходы, позволяющие достигать увеличения чувствительности к эндогенному инсулину (при диабете 2-го типа) и снижения дозы экзогенного инсулина, необходимого организму для компенсации (при диабете 1-го типа). Отправной точкой для нашей работы послужили данные об аденозине как эндогенном модуляторе чувствительности к инсулину [3].

Объектами для настоящего исследования были выбраны производные урацила (пиримидины) и теофиллина (пурины). В качестве клеточной модели использовались гепатоциты, выделенные из печени крыс. Транспорт глюкозы в эти клетки изучался на примере ее ³H-меченого 2-дезоксиналога. Допустимость применения 2-дезоксиглю-

козы в такого рода изысканиях продемонстрирована ранее [3].

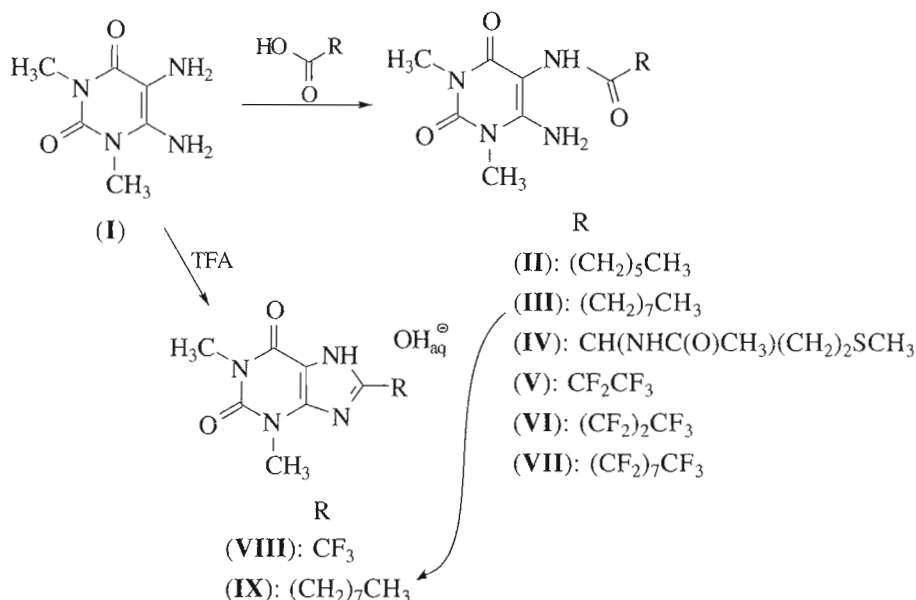
Синтез пиримидинов (II)–(VII) осуществлялся известным способом (например, см. [4]) путем ацилирования 4,5-диамино-1,3-диметилаурацила (I) соответствующими карбоновыми кислотами (схема). Пурин (IX) был получен циклизацией пиримидина (III) в водном растворе щелочи. Пиримидины (V)–(VII), содержащие перфторацильный радикал, не удалось трансформировать в пурины ни в щелочной среде, ни при использовании для циклизации соляной кислоты или оксихлорида фосфора. Исключение составлял лишь пурин (VIII), который непосредственно образовывался при реакции производного урацила (I) с TFA [5], но в данном случае не удалось выделить соответствующий пиримидин (схема). Об индивидуальности целевых соединений судили по воспроизводимым и адекватным результатам их анализов после неоднократных кристаллизаций.

Полученные вещества характеризуются довольно высокими температурами плавления и низкой растворимостью в большинстве растворителей при комнатной температуре. Полифторсодержащие пиримидины представляют собой достаточно инертные соединения, не вступающие в обычных условиях в реакции алкилирования и ацилирования.

Соединения (II)–(IX) были изучены в отношении влияния на транспорт 2-деокси-D-глюкозы в гепатоциты крыс в присутствии инсулина при концентрациях последнего 10⁻⁸–10⁻⁹ М (таблица). Указанный диапазон концентраций является критическим, т.е. влекущим за собой снижение со-

Сокращения: HEPES – N-(2-гидроксиэтил)пиперазин-N'-2-этансульфоновая кислота; BSA – бычий сывороточный альбумин.

[#] Автор для переписки (тел./факс: (095) 482-20-91).



держания глюкозы в клетке по сравнению с максимально возможным. По нашим предположениям этот же диапазон концентраций инсулина наиболее удобен для выявления позитивного эффекта тестируемых соединений, действие которых и должно проявляться в отношении либо базового глюкозного транспорта, либо транспорта глюкозы на фоне малых концентраций инсулина.

Как видно из приведенных в таблице данных, некоторые из полученных веществ практически не влияют на транспорт 2-дезоксид-глюкозы в гепатоциты крыс (соединения **(V)**–**(VII)**), другие – проявляют заметное положительное действие. Наиболее выраженный стимулирующий эффект в отношении транспорта указанного моносахарида зафиксирован для 4-амино-1,3-диметил-5-наноиламиноурацила (**(III)**).

Таким образом, полученные результаты свидетельствуют о необходимости углубленных ис-

следований по изучению влияния пиримидинов и пуринов на транспорт глюкозы в клетки.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

В работе использовались следующие реактивы: энантовая кислота, пеларгоновая кислота, TFA (Merck, ФРГ); перфторпропионовая кислота, перфтормасляная кислота (Fluka AG, Швейцария); *N*-ацетил-*DL*-метионин (Reanal, Венгрия). Остальные реактивы и растворители – отечественного производства. Растворители *o*-ксилол и бензол обезвоживали перегонкой над оксидом фосфора (P_4O_{10}).

Температуры плавления определяли на приборе Mettler FP62 (Швейцария).

Спектры ^1H - и ^{19}F -ЯМР получали на спектрометре Bruker WD-80SY (ФРГ) с рабочей частотой 80 МГц в CD_3OD (Merck, ФРГ). Приведены химические сдвиги (в шкале δ , м. д.) тех групп атомов, для которых удалось сделать отнесение сигнала. Внутренний стандарт – остаточный сигнал протонов растворителя (δ 3.30 м. д.); внешний стандарт – TFA.

Масс-спектры (**МС**) получали на приборе GC-MS M-80V Hitachi (Япония) при энергии ионизирующих электронов 70 эВ, прямом вводе образца и температуре его испарения 250°C. Приведены значения m/z для молекулярного иона и его относительная интенсивность (%).

Количественный элементный анализ веществ осуществляли на CHN-анализаторе Carlo Erba 1106 (Италия).

Биологические испытания проводили на изолированных гепатоцитах половозрелых беспородных крыс (180–220 г), которые выделяли коллагенным методом [6]. В работе были также

Влияние соединений **(II)**–**(IX)** на транспорт 2-дезоксид-глюкозы в клетки печени крыс

Соединение	Стимуляция глюкозного транспорта, %*
(II)	14
(III)	83
(IV)	13
(V)	0.93
(VI)	0.86
(VII)	0.77
(VIII)	10
(IX)	25

* Пояснение приведено в “Экспериментальной части”.

использованы: *D*-глюкоза, 2-дезоксид-*D*-глюкоза, 2-дезоксид-*D*-[1-³H]глюкоза (5 Ки/ммоль), инсулин (Sigma, США).

Радиоактивность измеряли с помощью сцинтилляционного счетчика Mark-III (США); эффективность счета 40%.

4-Амино-1,3-диметил-5-гептаноиламиноурацил (II). Смесь 1.31 г (7.70 ммоль) 4,5-диамино-1,3-диметилурацила (I) и 1.00 г (7.68 ммоль) энантиомерной кислоты в 10 мл *o*-ксилола кипятили в течение 6 ч. Растворитель удаляли при пониженном давлении, остаток перекристаллизовывали из воды и сушили в вакууме над P₄O₁₀. Выход 1.60 г (74%). Т. пл. 233–235°C. Спектр ¹H-ЯМР: 0.90 (т, 3H, CH₂CH₃), 1.30 (м, 8H, 4CH₂), 2.30 (м, 2H, CH₂), 3.26 и 3.42 (2с, 6H, 2CH₃). МС: 282 [M⁺] (12).

4-Амино-1,3-диметил-5-нонаноиламиноурацил (III). Смесь 1.07 г (6.29 ммоль) производного урацила (I) и 0.80 г (6.33 ммоль) пеларгоновой кислоты в 50 мл *o*-ксилола кипятили в течение 6 ч с водоотделителем. После охлаждения реакционной массы выпадал осадок, который отделяли фильтрованием, промывали эфиром, перекристаллизовывали из водного этанола и сушили в вакууме над P₄O₁₀. Выход 1.70 г (87%). Т. пл. 168–170°C. Спектр ¹H-ЯМР: 0.9 (т, 3H, CH₂CH₃), 1.29 (м, 12H, 6CH₂), 2.35 (м, 2H, CH₂), 3.26 и 3.42 (2с, 6H, 2CH₃). МС: 310 [M⁺] (8).

4-Амино-1,3-диметил-5-(*N*-ацетил-*DL*-метионил)аминоурацил (IV). Смесь 0.98 г (5.76 ммоль) производного урацила (I) и 1.10 г (5.75 ммоль) *N*-ацетил-*DL*-метионина в 50 мл *o*-ксилола кипятили в течение 4 ч с водоотделителем. Выпавший осадок отделяли фильтрованием, промывали эфиром, перекристаллизовывали из воды и сушили в вакууме над P₄O₁₀. Выход 1.20 г (61%). Т. пл. 230°C (с разл.). Спектр ¹H-ЯМР: 2.00 (с, 3H, CH₃), 2.60 (м, 2H, CH₂), 3.25 и 3.40 (2с, 6H, 2CH₃), 4.40 (м, 1H, CH). Найдено, %: С 45.35, Н 6.14, N 20.34. C₁₃H₂₁N₅O₄S. Вычислено, %: С 45.47, Н 6.16, N 20.39.

4-Амино-1,3-диметил-5-перфторпропаноиламиноурацил (V). Смесь 2.50 г (14.7 ммоль) производного урацила (I) и 2.41 г (14.7 ммоль) перфторпропионовой кислоты в 25 мл бензола кипятили в течение 1 ч. Растворитель упаривали в вакууме, остаток перекристаллизовывали из смеси уксусная кислота–вода, 1 : 1 и сушили в вакууме над P₄O₁₀. Выход 2.45 г (53%). Т. пл. 233–234°C. Спектр ¹H-ЯМР: 3.26 и 3.40 (2с, 6H, 2CH₃). Спектр ¹⁹F-ЯМР: –42.2 (CF₂C=O), –2.5 (CF₃). МС: 316 [M⁺] (25).

4-Амино-1,3-диметил-5-перфторбутаноиламиноурацил (VI). Смесь 1.27 г (7.46 ммоль) производного урацила (I) и 1.60 г (7.48 ммоль) перфтормасляной кислоты в 20 мл *o*-ксилола кипятили с обратным холодильником в течение 4 ч. Растворитель удаляли в вакууме, остаток перекристал-

лизовывали из водного этанола и сушили в вакууме над P₄O₁₀. Выход 1.60 г (59%). Т. пл. 218–228°C. Спектр ¹H-ЯМР: 3.25 и 3.40 (2с, 6H, 2CH₃). Спектр ¹⁹F-ЯМР: –50.2 (CF₂C=O), –43.8 (2CF₂), –4.7 (CF₃). МС: 366 [M⁺] (23). Найдено, %: С 32.38, Н 2.31, N 15.16. C₁₀H₉F₇N₄O₃. Вычислено, %: С 32.80, Н 2.48, N 15.30.

4-Амино-1,3-диметил-5-перфторнонаноиламиноурацил (VII). Смесь 1.50 г (8.81 ммоль) производного урацила (I) и 4.09 г (8.81 ммоль) перфторпеларгоновой кислоты в 25 мл *o*-ксилола кипятили в течение 4 ч с водоотделителем и охлаждали до комнатной температуры. Выпавший осадок отфильтровывали, промывали эфиром, перекристаллизовывали из смеси уксусная кислота–вода, 4 : 1 и сушили в вакууме над P₄O₁₀. Выход продукта – белого кристаллического вещества – 3.20 г (59 %). Т. пл. 240–242°C. Спектр ¹H-ЯМР: 3.25 и 3.40 (2с, 6H, 2CH₃). Спектр ¹⁹F-ЯМР: –49 (CF₂C=O), –45 (5CF₂), –42 (CF₂CF₃), –5 (CF₃). МС: 616 [M⁺] (3). Найдено, %: С 29.09, Н 1.43, N 9.24. C₁₅H₉F₁₇N₄O₃. Вычислено, %: С 29.24, Н 1.47, N 9.09.

8-Трифторметилтеофиллин (VIII). Смесь 0.30 г (1.76 ммоль) производного урацила (I) и 0.20 г (1.75 ммоль) TFA в 50 мл бензола кипятили в течение 2 ч. Растворитель удаляли в вакууме, остаток перекристаллизовывали из водного этанола и сушили в вакууме над P₄O₁₀. Выход 0.38 г (87%). Т. пл. 261–263°C (лит. 261–263 [5]).

8-Октилтеофиллин (IX). Смесь 0.50 г (1.61 ммоль) 4-амино-1,3-диметил-5-нонаноиламиноурацила (III) и 3 мл 2 н. раствора гидроксида калия кипятили в течение 1 ч. Горячий раствор нейтрализовывали 10% серной кислотой. Выпавший осадок отфильтровывали, промывали водой и сушили в вакууме над P₄O₁₀. Выход 0.39 г (83%). Т. пл. > 260°C. Спектр ¹H-ЯМР: 0.90 (т, 3H, CH₂CH₂), 1.32 м (12H, 6CH₂), 2.68 (м, 2H, CH₂), 3.40 и 3.56 (2с, 6H, 2CH₃). МС: 292 [M⁺] (36).

Определение влияния соединений (II)–(IX) на транспорт 2-дезоксид-*D*-глюкозы в изолированные гепатоциты крыс. Использовалась методика [3] с некоторой модификацией. Клеточную суспензию инкубировали 1 ч при 37°C в буферном растворе, содержащем 150 мМ NaCl, 5 мМ KCl, 1.2 мМ CaCl₂, 2.5 мМ NaH₂PO₄, 3 мМ *D*-глюкозу, 1% BSA, 10 мМ HEPES (pH 7.4). Гепатоциты отмывали центрифугированием (60g, 1 мин; дважды) с использованием того же буферного раствора, но без глюкозы (буферный раствор А). Осадок клеток ресуспендировали до концентрации 2 × 10⁵ клеток/мл в буферном растворе А и инкубировали при 37°C в течение 3 ч, после чего гепатоциты вновь ресуспендировали в тех же условиях. К полученной суспензии клеток добавляли смесь ³H-меченой и немеченой 2-дезоксид-*D*-глюкозы (0.1 мМ; 0.2 мкКи/мл), затем при той же

температуре – 1 мкл раствора изучаемого соединения (1 мг/мл) в DMSO (в контрольном опыте добавлялся чистый DMSO) и инсулин (конечная концентрация 10^{-8} – 10^{-9} М). После 30 мин инкубации клетки отделяли центрифугированием и промывали (трижды) буферным раствором А. Затем клетки обрабатывали смесью хлороформ–метанол, 2 : 1. Слои разделяли. Водно-метанольный слой переносили в сцинтилляционные флаконы и измеряли радиоактивность. Эффекты стимуляции транспорта 2-дезоксид-*D*-глюкозы в изолированные гепатоциты крыс под воздействием соединений (II)–(IX) выражали в процентах увеличения радиоактивности по сравнению с контролем (таблица).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Балаболкин М.И., Клебанова Е.М., Креминская В.М. // Сахарный диабет. 1999. № 1. С. 2–8.
2. Ruiz-Albusac J.M., Zucco J.A., Velazquez E., Alvarez J.F., Mato J.M., Blazquez E. // FEBS Lett. 1989. V. 258. P. 281–284.
3. Ciaraldi T.P. // Mol. Cellular Endocrin. 1988. V. 60. P. 31–41.
4. Lausanne G.P., Yverdon M.E. // US Patent 4,581,451. (US Cl. 544-267). 1986.
5. Ginger R.D., Samour C.M. // US Patent 3,900,474. (US Cl. 544-267). 1975.
6. Гринчишин В.П., Винарчук М.П., Осипова Л.А. // Цитология и генетика. 1981. Т. 15. № 2. С. 21–26.

Synthesis and Study of the Effect of Uracil and Theophyllin Derivatives on the Glucose Transport into Rat Hepatic Cells

O. N. Leonov*, M. L. Tsyrenina*, E. I. Melnik*†, V.M. Devichenskii*#,
L. Yu. Kryukova*, E. A. Vorontsov**, S. L. Kuznetsov**, and L. N. Kryukov**

*Institute of Biological Medicine, ul. Akademika Oparina 4, Moscow, 117815 Russia

**Center of Medical, Biological, and Ecological Problems, Russian Academy of Natural Sciences, Simferopolskii bulvar 8, Moscow, 113149 Russia

A series of uracil and theophyllin derivatives were synthesized. 4-Amino-1,3-dimethyl-5-nonanoylaminouracil displayed the most pronounced effect of the *in vitro* stimulation of the 2-deoxyglucose transport into hepatic rat cells.

Key words: glucose transport, hepatocytes, insulin, theophyllin derivatives, uracil derivatives

To whom correspondence should be addressed; phonelfax: +7 (095) 482-2091.

For the full text of English translation of this article, see *Russian Journal of Bioorganic Chemistry*, 2000, vol. 26, no. 5. It is also available (free) in PDF format through the Web Site <http://www.maik.rssi.ru/>.