

*На правах рукописи*

АСЛЯМОВА Алия Азатовна

**ЭКОТОКСИКОЛОГИЧЕСКАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА  
БЕЗОПАСНОСТИ НЕКОТОРЫХ ПРОИЗВОДНЫХ УРАЦИЛА В  
ОТНОШЕНИИ МЛЕКОПИТАЮЩИХ И ГИДРОБИОНТОВ**

03.00.16 – Экология

**АВТОРЕФЕРАТ**  
диссертации на соискание ученой степени  
кандидата биологических наук

КАЗАНЬ – 2006 Г.

Работа выполнена в Институте органической и физической химии им. А.Е. Арбузова Казанского научного центра Российской Академии наук (ИОФХ; г. Казань) и в лаборатории экологического контроля ГОУ ВПО «Казанский государственный университет им. В.И. Ульянова-Ленина»

Научный руководитель кандидат биологических наук, доцент  
Зобов Владимир Васильевич

Официальные оппоненты: доктор химических наук, профессор  
Глебов Александр Николаевич

кандидат биологических наук  
Петров Андрей Михайлович

Ведущая организация Татарский государственный  
гуманитарно-педагогический  
университет

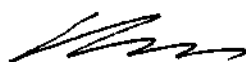
Защита состоится «14» ноября 2006 г. в 14<sup>00</sup> часов на заседании диссертационного совета Д 212.081.19 при ГОУ ВПО «Казанский государственный университет им. В.И. Ульянова-Ленина», 420008, г. Казань, ул. Кремлевская, 18

С диссертацией можно ознакомиться в научной библиотеке ГОУ ВПО «Казанский государственный университет им. В.И. Ульянова-Ленина»

Отзывы на автореферат в двух экземплярах с заверенными подписями просим присылать по адресу: 420008, г. Казань, ул. Кремлевская, 18, КГУ, отдел аспирантуры, тел./факс. (843) 238-76-01

Автореферат разослан «12» октября 2006 г.

Ученый секретарь  
Диссертационного совета,  
доктор химических наук,  
профессор



Г.А. Евтюгин

## ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

**Актуальность работы.** Поиск путей повышения экологической безопасности химических средств, разрабатываемых для использования в различных сферах потребления человека, принадлежит к числу важнейших проблем современности. Ингибиторы холинэстераз (ХЭ) составляют одну из самых обширных групп веществ, задействованных в медицине, сельском хозяйстве и др. (Голиков, Розенгарт, 1964; Бресткин и др., 1997; Pore et al., 2005). В частности, они широко применяются при ряде заболеваний (миастении, болезнь Альцгеймера и др.), требующих продления действия ацетилхолина (АХ) в синаптической щели, а также составляют ядро сельскохозяйственных пестицидов – ведущих экотоксикантов. Всем известным ингибиторам ХЭ присущ один общий и существенный недостаток – дозы ( $ЭД_{50}$ ), в которых они оказывают практически полезный для человека эффект (терапевтический или иной) практически совпадают с дозами ( $ЛД_{50}$ ), вызывающими смертельно-опасное угнетение дыхания. В результате они и «лечат» и «убивают» практически в одних и тех же дозах – отношение  $ЛД_{50}/ЭД_{50}$  не превышает 5,0. Эта весьма маленькая цифра отражает крайне низкий уровень избирательности и «фармакологической безопасности» традиционных ингибиторов ХЭ. Еще более низки уровни их «экологической безопасности» – в концентрациях ( $ЛК_{50}$ ), много меньших, чем 0,1 мкМ большинство из них смертельно-опасно для представителей зоо- и фитопланктона, находящихся в основании трофических цепей водных биоценозов (дафнии и другие представители низших гидробионтов).

Общеизвестен факт о способности ингибиторов ХЭ в условиях функциональной нагрузки (бег и др.) неизменно вызывать у животных развитие миорелаксантного эффекта или мышечной слабости (Голиков, Розенгарт, 1964; Hobbiger, 1976; Matthew et al., 1988; Glavinovic, Narahashi, 1988; Baker, Sedgwick, 1996). Это свойство может быть использовано при направленной разработке новых ингибиторов ХЭ с более высокой избирательностью действия в отношении ацетилхолинэстеразы (АХЭ; Н.Ф.З.1.1.7) локомоторных мышц, при котором достигается практически полезный эффект (фармакологическая коррекция функций синапсов локомоторных мышц) без смертельно-опасного поражения жизненно важных функций (дыхание и др.). Именно за счет более высокой избирательности действия в отношении локомоторных мышц новые ингибиторы ХЭ могут отвечать приемлемым нормам безопасности. **Актуальной**, в этой связи, является разработка более фармакологически и экологически безопасных ингибиторов АХЭ, избирательно влияющих на работу локомоторных мышц конечностей в дозах, далеко отстоящих от смертельных (парализующих

дыхание) доз, т.е. имеющих отношение  $LD_{50}/ED_{50} > 20,0$ , и токсичность  $LK_{50}(\text{дафнии}) > 20,0$  мкМ.

**Целью исследования** был анализ связи «структура-безопасность» в гомологических рядах N( $\omega$ -аммиоалкил)- и фосфорилированных N( $\omega$ -оксиалкил)- урацилов, а также изучение биологической эффективности наиболее активных представителей ряда алкиламмониевых ингибиторов холинэстераз на основе урацила в тестах экологической токсикологии.

**Задачи исследования:**

1. Определить и сопоставить токсикологические свойства алкиламмониевых урацилов со свойствами фосфорилированных урацилов на лабораторных мышах и дафниях.
2. Сопоставить особенности молекулярной структуры и характеристики безопасности представителей алкиламмониевых и фосфорилированных производных N-гетероциклов в отношении млекопитающих (мыши) и гидробионтов (дафнии, коловратки, простейшие, одноклеточные водоросли).
3. Классифицировать токсичность некоторых алкиламмониевых производных урацила в отношении лабораторных мышей и представителей гидробионтов. Выявить структурные факторы, ответственные за высокую токсичность данных соединений в отношении гидробионтов.
4. Определить безопасные для репродуктивной функции *Daphnia magna* концентрации (NOEC) 1,3-бис[5(диэтил-*o*-нитробензиламмио)пентил]-6-метилурацилдигбромида (далее соед. № 547) и прозерина в рядах 4-х последовательных поколений *Daphnia magna* (P-F<sub>1</sub>-F<sub>2</sub>-F<sub>3</sub>).
5. Определить способность соед. № 547 и его моно-производных к быстрой биодеградации и к сохранению антихолинэстеразной и миорелаксантной активности в естественных условиях среды.

**Научная новизна.** Впервые сопоставлены и выявлены особенности молекулярной структуры 18 алкиламмониевых урацилов (соединения типа № 547), обеспечивающие сочетание высоких значений их безопасности на лабораторных мышах ( $LD_{50}/ED_{50} \sim 20,0-100,0$ ) и гидробионтах ( $LK_{50} \sim 20,0-500,0$  мкМ). Определено, что концентрация 0,39 мкМ является безопасной для их репродуктивной функции (NOEC=1/60 от  $LK_{50}$ ). Показано, что антихолинэстеразный и избирательный миорелаксантный потенциал соед. № 547 снижается в результате биодеградации на сроках более 1 месяца. Показана высокая токсичность и низкая безопасность фосфорилированных производных N-гетероциклов в отношении дафний и мышей.

**Теоретическая значимость работы.** Получены новые данные, представляющие фундаментальный научный и практический интерес с точки зрения разработки ингибиторов холинэстераз нового поколения, имеющих необычно высокие для ингибиторов холинэстераз показатели

фармакологической ( $LD_{50}/ED_{50} \geq 20,0$ ) и экологической ( $LC_{50} \geq 20$  мкМ) безопасности.

**Практическая значимость работы.** Необычно высокие для ингибиторов холинэстераз характеристики безопасности позволяют рассматривать соединения типа № 547 в качестве потенциальных средств диагностики или лечения миастений, а также средств, предназначенных для временной иммобилизации диких (в заповедниках, зоопарках и др.) и домашних животных. Низкая токсичность ( $LC_{50} \geq 20,0$  мкМ) соединений типа № 547 в отношении гидробионтов, находящихся в основании трофических цепей водных биоценозов (дафнии и др.), может обеспечить повышенный уровень их экологической безопасности. Результаты проведенных исследований составляют теоретическую базу для направленной оптимизации молекулярной структуры соединений типа № 547 в сторону еще большего повышения показателей их избирательности и безопасности действия.

Отдельные разделы диссертационной работы используются при чтении специальных курсов «Экологическая фармакология» и «Экологическая токсикология» для студентов факультета географии и экологии Казанского государственного университета.

**Основные положения, выносимые на защиту.**

1. Соединение № 547 и 5 его близких аналогов из числа изученных алкиламмониевых производных урацила проявляют необычно высокие для ингибиторов холинэстераз характеристики фармакологической безопасности ( $LD_{50}/ED_{50} \geq 50,0$ ) в отношении представителей теплокровных, находящихся на вершине трофических цепей наземных биоценозов (мыши).
2. Низкая токсичность ( $LC_{50} \geq 20,0$  мкМ) некоторых алкиламмониевых производных урацила (соединения типа № 547) в отношении представителей зоопланктона и фитопланктона, находящихся в основании трофических цепей водных биоценозов (дафнии, коловратки, простейшие, одноклеточные водоросли), обеспечивает повышенный уровень их экологической безопасности.

**Личный вклад автора.** Научные положения и выводы диссертации базируются на результатах собственных исследований автора. Анализ литературных данных, проведение лабораторных экспериментов по оценке острой и хронической токсичности соединений в отношении гидробионтов и млекопитающих, выбор метода исследования биodeградации и оценка степени биodeградации соединений, статистическая обработка полученных результатов, также проведены лично автором. Соавторами статей являются научный руководитель, к.б.н., доцент В.В. Зобов, а также сотрудники лаборатории химико-биологических исследований ИОФХ, принявшие участие в обсуждении результатов работы (д.х.н., профессор В.С. Резник,

к.х.н. В.Д. Акамсин, к.х.н. И.В. Галяметдинова) и участвовавшие в выполнении ряда экспериментов (к.б.н. Л.А. Березинский, А.В. Ланцова); эксперименты по оценке остаточной антихолинэстеразной активности проведены сотрудниками кафедры аналитической химии КГУ д.х.н. Г.А. Евтюгиным, к.х.н. Е.А. Стойковой, которым автор приносит свою благодарность.

**Апробация работы.** Основные экспериментальные результаты работы доложены на II Съезде токсикологов России (Москва, 2003), II Congress of Ukrainian Toxicologists (Kyiv, 2004), XIX Всероссийском съезде физиологического общества им. И.П. Павлова (Екатеринбург, 2004), V Всероссийском научном семинаре и молодежной научной школе «Химия и медицина. Новые лекарственные средства: успехи и перспективы» (Уфа, 2005), Итоговой научной конференции Казанского научного центра РАН (Казань, 2006).

Основные результаты работы изложены в 9 научных статьях и в 6 докладах на Всероссийских и Международных конференциях и съездах.

**Структура и объем работы.** Диссертация объемом 142 страницы текста состоит из введения, обзора литературы, главы материалы и методы исследований, глав собственных исследований, заключения, выводов, списка использованных библиографических источников, включающего 139 ссылок на отечественные (73) и зарубежные (66) работы, содержит 17 таблиц, 11 рисунков.

Диссертация выполнена при поддержке грантов Президента РФ «Ведущая научная школа» НШ-1063.2003.4, Федерального агентства по науке и инновациям «Научные школы» РИ-112/001/432, МНТЦ 2245р, РФФИ (регион) № 03-04-96215-а, РФФИ № 05-03-32497-а, НИОКР Академии наук Республики Татарстан № 03-3.8-209, № 09-9.3-278 на базе лаборатории химико-биологических исследований Института органической и физической химии (ИОФХ) им. А.Е. Арбузова Казанского научного центра Российской академии наук и лаборатории экологического контроля Казанского Государственного университета.

## **КРАТКОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ**

Во **Введении** сформулированы актуальность и цель диссертационной работы, поставлены задачи исследования, изложены положения, выносимые на защиту, научная новизна и практическая значимость работы.

### **ГЛАВА 1. ОСНОВНЫЕ ПОДХОДЫ К ОЦЕНКЕ БЕЗОПАСНОСТИ БИОЛОГИЧЕСКИ АКТИВНЫХ ВЕЩЕСТВ (Обзор литературы)**

Обзор литературы посвящен рассмотрению свойств аммониевых и фосфорилированных ингибиторов ХЭ с точки зрения избирательности,

фармакологической и экологической безопасности. Проанализированы основные методические подходы к оценке экологической безопасности веществ на объектах альтернативной токсикологии. Представлены особенности биохимической активности нового класса высокоизбирательных ингибиторов АХЭ – тетраалкиламмониевых производных 6-метилурацила (Резник и др., 1998; Аникиенко и др., 2001).

## **ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ**

### **ГЛАВА 2. МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ**

В качестве опорных для скрининга новых структур, нами были избраны два критерия безопасности: (1) коэффициент безопасности  $LD_{50}/ED_{50}$ , принятый за показатель «фармакологической безопасности» соединений в отношении млекопитающих, т.е. биообъектов, находящихся на вершине трофических цепей наземных биоценозов (где  $LD_{50}$  – острая токсичность, а  $ED_{50}$  – миорелаксантная активность, оцениваемая по неспособности токсифицированных мышей выполнять тестовую побегу на третбане); (2) острая токсичность  $LK_{50}$  (дафнии), принятая за показатель «экологической безопасности» соединений в отношении биообъектов, находящихся в основании трофических цепей водных биоценозов. Кроме того, использовались следующие основные методы исследования: (4) Оценка токсичности соединений на объектах альтернативной токсикологии (включая микробиотесты Toxkit™): одноклеточные водоросли, простейшие, дафнии, коловратки. (5) Оценка хронической и специфической токсичности соед. № 547 и прозерина на 4-х последовательных поколениях *Daphnia magna*. (6) Оценка способности соед. № 547 и его моно-производных к быстрой биодеградации.

## **ГЛАВА 3 ТОКСИКОЛОГИЧЕСКАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА ПРОИЗВОДНЫХ УРАЦИЛА**

Всего было изучено 49 соединений. Соединения содержали в структуре общий урациловый фрагмент, и – либо алкиламмониевый, либо фосфонтиоалкильный фармакофор.

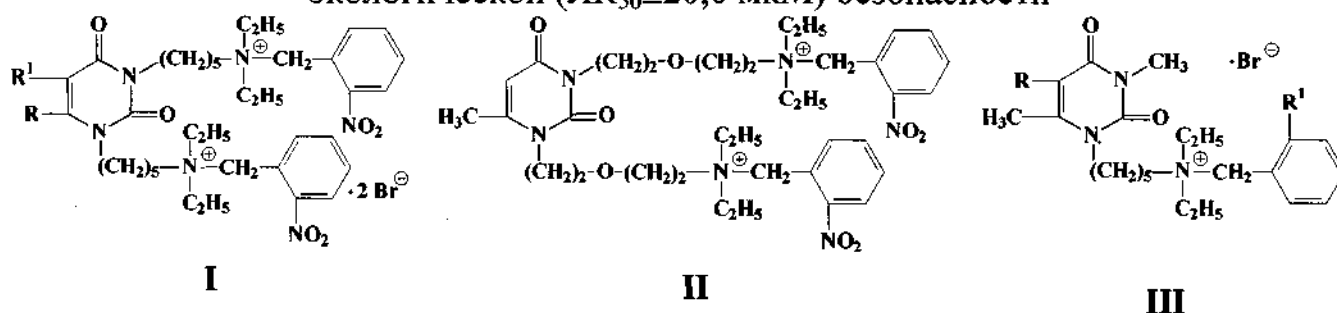
### **3.1. Алкиламмониевые урацилсодержащие ингибиторы холинэстераз**

Наилучшее сочетание фармакологической ( $LD_{50}/ED_{50} > 20,0$ ; при  $LD_{50} \approx 1,0-10,0$  мкМ) и экологической ( $LK_{50\text{дафнии}} > 20,0$  мкМ) безопасности отмечено у 18 (из 32) представителей аммониевых солей со следующими элементами молекулярной структуры: (1) метадиазиновый 2,4-диоксофрагмент (урацил, ксантин), (2) пентилен-3-окисьные или пентаметиленовые цепи между атомами азота аммонийных групп и N-гетероцикла, (3) один или два замещенных бензильных фрагмента в составе

аммониевых групп, (4) малые по объему заместители в положениях 5 (H, CH<sub>3</sub>O, NO<sub>2</sub>, CN) и 6 (H, CH<sub>3</sub>) урацилового фрагмента (см. табл. 1). Уровень фармакологической безопасности у трех бис-аммониевых (соед. 754, 743, 751) и двух моно-аммониевых (соед. И-292, 859) производных урацила достоверно ( $p < 0,05$ ) превосходит таковой у модельного соед. № 547 (табл. 1).

Таблица 1

Группа наиболее активных ( $ЭД_{50} \leq 0,10$  мкМ) бис- (I-II) и моно- (III) аммониевых урацилов, сочетающих в себе высокие показатели фармакологической ( $ЛД_{50}/ЭД_{50} \geq 20,0$ ; тест «бег на третбане») и экологической ( $ЛК_{50} \geq 20,0$  мкМ) безопасности



Лабораторные шифры соединений и особенности их структуры	Структура	Токсичность ( $ЛД_{50}$ ; мыши; мкМ, в/б)	Миорелаксантная активность ( $ЭД_{50}$ ; мыши; мкМ, в/б)	Коэффициент безопасности ( $ЛД_{50}/ЭД_{50}$ – «фармакологическая безопасность»)	$ЛК_{50}^{48ч D. magna}$ ; мкМ («экологическая безопасность»)
547 <sup>а)</sup> ; R=CH <sub>3</sub> ; R <sup>1</sup> =H	I	1,17 (1,04÷1,31)	0,03* <sup>#</sup> (0,03÷0,04)	39,00* <sup>#</sup> (34,33÷43,67)	18,71* <sup>#</sup> (15,33÷22,82)
754; R=H; R <sup>1</sup> =CH <sub>3</sub> O	I	2,06 (1,81÷2,35)	0,03* <sup>#</sup> (0,02÷0,03)	68,67* <sup>#</sup> (57,23÷86,77)	79,51* (66,81÷94,61)
743; R=H; R <sup>1</sup> =CN	I	2,30 (2,00÷2,65)	0,03* <sup>#</sup> (0,03÷0,04)	76,67* <sup>#</sup> (48,58÷104,76)	65,80 (57,12÷73,12)
751	II	6,15* <sup>#</sup> (5,30÷7,13)	0,07* <sup>#</sup> (0,06÷0,08)	87,86* <sup>#</sup> (69,06÷106,66)	291,60* <sup>#</sup> (249,23÷341,17)
И-292; R=R <sup>1</sup> =H	III	10,17* <sup>#</sup> (8,84÷11,69)	0,13* (0,11÷0,15)	78,23* <sup>#</sup> (61,40÷95,06)	503,06* <sup>#</sup> (29,97÷588,58)
859; R=Br; R <sup>1</sup> =NO <sub>2</sub>	III	26,03* <sup>#</sup> (22,63÷29,93)	0,26 (0,22÷0,30)	100,12* <sup>#</sup> (78,07÷121,93)	43,40* <sup>#</sup> (37,09÷50,78)
Прозерин		1,53 (1,34÷1,74)	0,39 <sup>#</sup> (0,34÷0,45)	3,92 <sup>#</sup> (3,11÷4,73)	2,70 <sup>#</sup> (2,21÷3,29)
BW284c51		2,12 (1,86÷2,42)	0,21* (0,18÷0,24)	10,10* (8,07÷12,13)	100,56* (82,43÷122,68)

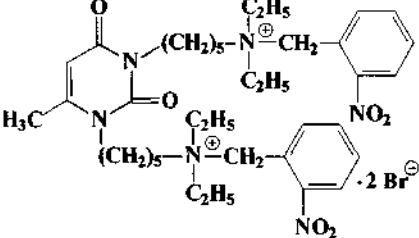
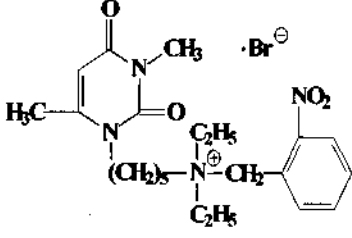
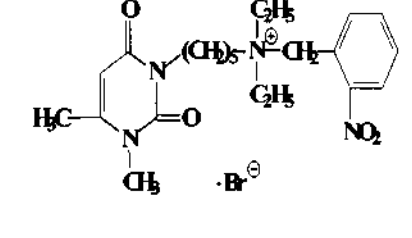


<sup>a)</sup> – селективный ингибитор АХЭ (КФ 3.1.1.7; по Резник и др., 1998; Аникиенко и др., 2001); Отличия от прозерина (\*) и BW284с51 (<sup>#</sup>) статистически достоверны ( $p < 0,05$ ).

В картине действия среднееффективных доз ( $ЭД_{50} \approx 0,03$  мкМ; мыши, внутривенно) соединений типа № 547, составляющих 1/40 от  $ЛД_{50}$ , доминировало холиномиметическое гипервозбуждение с последующей избирательной миорелаксацией локомоторных мышц. Для сравнения: миорелаксанта́ный эффект при действии BW284с51, прозерина, армина, ГД-42 и фосфорилированных урацилов реализовался только в субсмертельных дозах (1/5-1/10 от  $ЛД_{50}$ ). Смерть животных при действии летальных доз соединений типа № 547 наступала от остановки дыхания либо на пике острого антихолинэстеразного кризиса, либо позднее на фоне общей миорелаксации и адинамии.

Таблица 2

Химические структуры, антихолинэстеразная активность\* и фармакологическая безопасность ( $ЛД_{50}/ЭД_{50}$ ) соед. № 547 и его монопроизводных

 <p>соед. № 547</p>	 <p>соед. № 627</p>	 <p>соед. № 857</p>
<p>*-<math>k_0</math>АХЭ = <math>3,5 \times 10^9 \text{ M}^{-1} \cdot \text{мин}^{-1}</math>  <math>ЛД_{50}/ЭД_{50} = 39,0</math></p>	<p>*-<math>pI_{50} = 8,30</math>  <math>ЛД_{50}/ЭД_{50} = 20,1</math></p>	<p>*-<math>k_0</math>АХЭ = <math>8,0 \times 10^8 \text{ M}^{-1} \cdot \text{мин}^{-1}</math>  <math>ЛД_{50}/ЭД_{50} = 21,8</math></p>

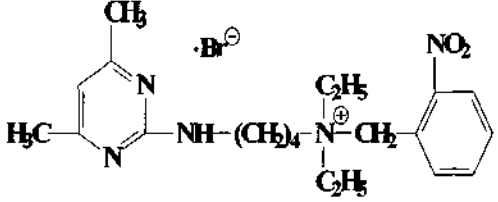
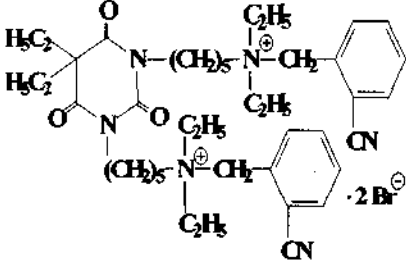
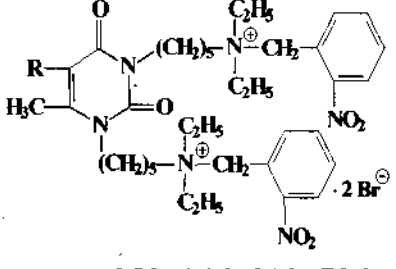
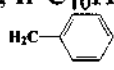
\* - Резник и др., ДАН, 1998; Аникиенко и др., ДАН, 2001

Упрощение структуры соединений типа № 547 (табл. 1, 2) до монопроизводных (табл. 1, соед. И-292, 859) привело к снижению миорелаксанта́ной активности в десятки раз, но эффективные (миорелаксанта́ные) дозы на третбане были, по-прежнему, ниже смертельных до 100 крат. По данным К.А. Аникиенко (2001) соед. 627 обратимо ингибирует АХЭ ( $pI_{50} = 8,30$ ), тогда как его изомер, соед. 857 является таким же необратимым ингибитором ( $k_0$ АХЭ =  $8,0 \times 10^8 \text{ M}^{-1} \cdot \text{мин}^{-1}$ ), как и их общий бисаммониевый аналог – соед. № 547 ( $k_0$ АХЭ =  $3,5 \times 10^9 \text{ M}^{-1} \cdot \text{мин}^{-1}$ ) (табл. 2). Иначе говоря, для реализации чрезвычайно высокого сродства к ферменту достаточно наличия в структуре лиганда лишь одной аммонийно-алкильной цепи, но обязательно присоединенной к  $N^3$ -атому урацила. Наличие второй

аммониоалкильной цепи при N<sup>1</sup>-атоме урацила (у соед. № 547) лишь незначительно увеличивает величину сродства к АХЭ (k<sup>0</sup>), но заметно увеличивает безопасность и длительность миорелаксантного действия (рост ЛД<sub>50</sub>/ЭД<sub>50</sub> с ~20,0 до ~40,0, рост длительности с 1 до 7 суток). Это указывает на неоднозначность связи между сродством к АХЭ (in vitro) и безопасностью (in vivo).

Таблица 3

Некоторые алкиламмониевые соединения с относительно низкой миорелаксантной активностью и фармакологической безопасностью (ЛД<sub>50</sub>/ЭД<sub>50</sub>)

 <p>соед. № 695</p>	 <p>соед. 716</p>	 <p>соед. 858, 846, 853, 736 R = n-C<sub>4</sub>H<sub>9</sub>, n-C<sub>10</sub>H<sub>21</sub>, n-C<sub>16</sub>H<sub>33</sub>, </p>
<p>Мыши (внутрибрюшинно): ЛД<sub>50</sub> 1,0-10,0 мкМ, ЭД<sub>50</sub> 0,5-20,0 мкМ, ЛД<sub>50</sub>/ЭД<sub>50</sub> ≤ 10,0 Дафнии: ЛК<sub>50</sub> 2,5-200,0 мкМ</p>		

В таблице 3 представлены соединения, которые лишены вышеуказанных элементов молекулярной структуры и, которые, соответственно, полностью теряют способность проявлять высокую фармакологическую безопасность. Потеря практически полезных характеристик происходит при: (1) замене урацила на циклы без 2,4-диоксо-фрагмента (соед. 695); (2) замене урацила на непланарный N-гетероцикл (соед. 716); (3) введении длинных алифатических или объемных заместителей в положение 5 урацила или в ониеовое окружение (858, 846, 853, 736).

### 3.2. Токсикологическая характеристика фосфорилированных производных урацила

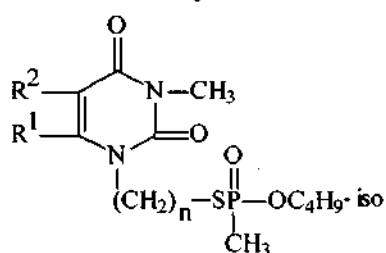
Было исследовано 17 соединений. В опытах на мышах наибольшую активность проявили соединения (с n=3 и 5), содержащие изо-C<sub>4</sub>H<sub>9</sub>O-группу при атоме фосфора, а в положении 5 пиримидинового цикла - атом Н, атом F и Cl. Значения ЛД<sub>50</sub> наиболее активных структур лежат в пределах 0,59-4,78 мкМ при низких коэффициентах безопасности (ЛД<sub>50</sub>/ЭД<sub>50</sub> не более 4,0).

По результатам опытов на дафниях введение урацилового фрагмента на определенном расстоянии от атома фосфора приводит к получению

чрезвычайно токсичных соединений, существенно превосходящих по токсичности ГД-42 и армин. Максимумы токсичности характерны для N<sup>1</sup>-монопроизводных урацила с n=5, 6, 8. Минимум токсичности характерен для производного пириимидина с объемным фосфорсодержащим заместителем в положении 2 пириимидинового цикла.

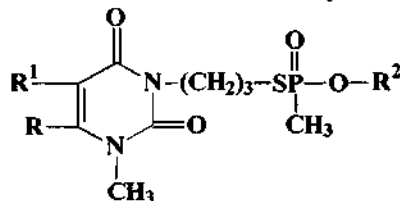
Таблица 4

Некоторые изученные фосфорилированные производные урацила с указанием диапазона значений изученных параметров



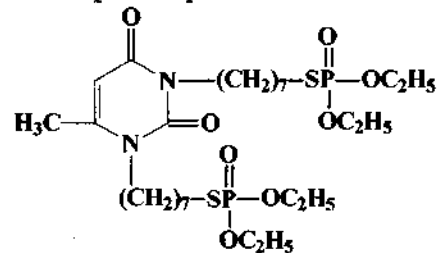
I

R<sup>1</sup> = CH<sub>3</sub>; H; R<sup>2</sup> = H; Br; Cl;  
F; n = 3-8



II

R = CH<sub>3</sub>; H; R<sup>1</sup> = H; Br; F;  
R<sup>2</sup> = цикло-C<sub>5</sub>H<sub>9</sub>; i-C<sub>4</sub>H<sub>9</sub>



III

Лабораторные шифры соединений	Структура	Диапазон значений токсичности (ЛД <sub>50</sub> ; мыши; мкМ, в/б)	Диапазон значений миорелаксантажной активности (ЭД <sub>50</sub> ; мыши; мкМ, в/б)	Диапазон значений коэффициента безопасности (ЛД <sub>50</sub> /ЭД <sub>50</sub> )	Диапазон значений ЛК <sub>50</sub> <sup>48 ч</sup> D. magna; мкМ
687; 835; 801; 676; 855; 800; 844; 678; 680	I	0,72-4,78	0,43-3,58	1,33-2,00	0,0005-0,0075
739; 817; 819	II	0,59-0,68	0,35-0,47	1,26-1,83	0,0021-0,0029
671	III	227,69 188,17÷275,50	151,79 125,45÷183,67	1,50 1,24÷1,82	0,56* 0,46÷0,68
Армин		3,11 2,66÷3,64	1,14 <sup>#</sup> 0,97÷1,33	2,73 2,33÷3,19	0,0028 <sup>#</sup> 0,0024÷0,0033
ГД-42		0,33 0,27÷0,40	0,16 0,13÷0,19	2,06 1,72÷2,48	0,78* 0,65÷0,94

Таким образом, сочетание урацилового фрагмента с тиофосфорными и фосфорными фармакофорами в ряду изученных структур оказалось не

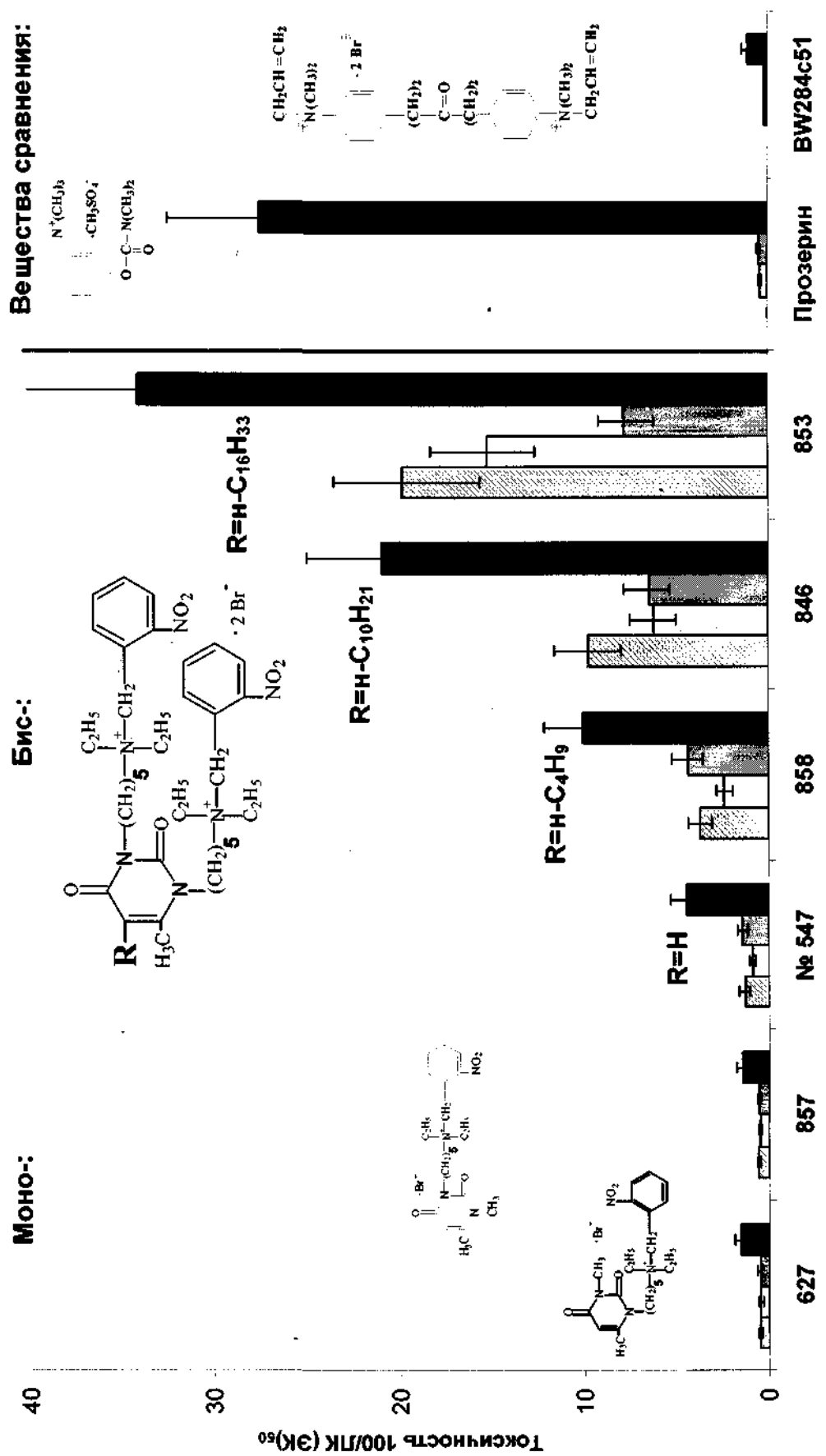
продуктивным с точки зрения получения ингибиторов ХЭ с более высокими, чем у известных ФОИ, уровнями миорелаксантажной активности и безопасности (т.е. с  $LD_{50}/ED_{50} > 10,0$  и  $LK_{50\text{дафнии}} < 10,0$  мкМ). Фармакологическая и экологическая безопасность, равно как и избирательность действия фосфорилированных урацилов и ксантинов в отношении локомоторных мышц, не связаны однозначно с наличием в их структуре нуклеотидподобного (урацилового) фрагмента.

#### **ГЛАВА 4 ЭКОЛОГО-ТОКСИКОЛОГИЧЕСКАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА НЕКОТОРЫХ АЛКИЛАММОНИЕВЫХ ПРОИЗВОДНЫХ УРАЦИЛА**

На дафниях, коловратках, простейших, одноклеточных водорослях наиболее активные алкиламмониевые производные урацила до 5-6 порядков менее токсичны, чем их фосфорилированные аналоги, и на 2 порядка менее токсичны, чем прозерин. Диапазон биоактивных концентраций соед. № 547 и его моно-производных (соед. 627, 857) соответствует уровню 18,71-252,40 мкМ. Наиболее чувствительными тест-объектами были дафнии, наименее – простейшие и водоросли. На всех без исключения тест-объектах отмечен градуальный рост токсичности в ряду аналогов соед. № 547 по мере увеличения длины алифатического радикала (R) в положении 5 урацилового фрагмента, т.е. по мере роста липофильности вещества (рис. 1).

При исследовании хронической токсичности соед. № 547 и прозерина были выявлены отдаленные токсические проявления соед. № 547 в концентрации 0,78 мкМ, проявляющиеся в снижении выживаемости дафний в последующих поколениях (рис.2). При изучении эмбриотоксичности соед. № 547 было установлено, что безопасной для репродуктивной функции дафний является концентрация 0,39 мкМ ( $1/60 LK_{50} = NOEC$  – «наибольшая недействующая концентрация»). В более высоких концентрациях соед. № 547 (0,78 мкМ) подавляло плодовитость дафний; эффект был особенно выражен

В



- ▨ Водоросли (*Selenastrum capricornutum* - Algotoxkit)
- Простейшие (*Tetrachylena thermofila* - Protoxkit, *Paramecium caudatum*)
- ▤ Колорадки (*Brachionus calyciflorus* - Rotoxkit)
- Ракообразные (*Thamnocephalus platyurus* - Тамнотохkit, *Daphnia magna*, *Heterosyllis incognuens* - Ostracodtoxkit)

Рисунок 1. Сравнительная токсичность соед. № 547 и его моно- и бис- производных на разных тест-объектах

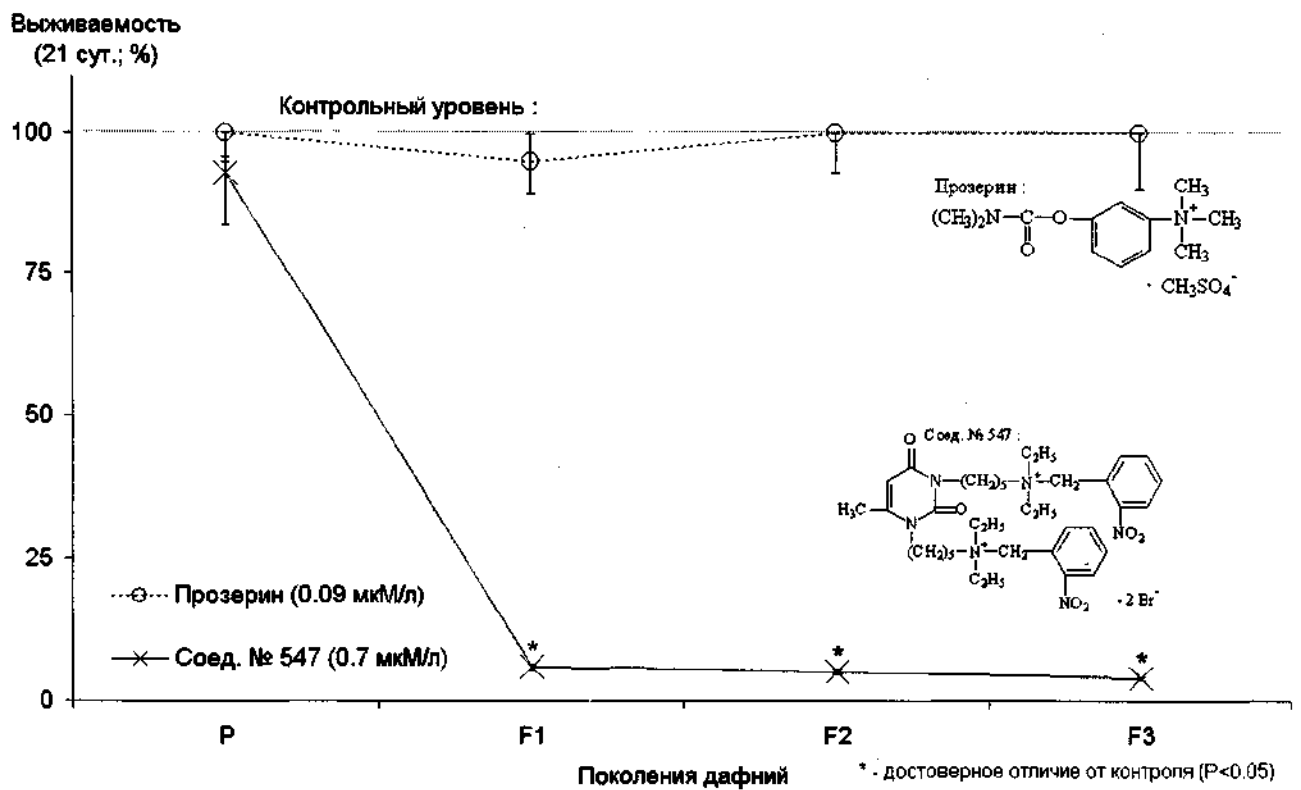


Рис. 2. Выживаемость дафний в ряду поколений P-F<sub>1</sub>-F<sub>2</sub>-F<sub>3</sub> на 21 сутки постоянного действия прозерина и соед. № 547 в концентрациях 1/30 от ЛК<sub>50</sub>.

условиях постоянной затравки всех 4-х последовательных поколений P-F<sub>1</sub>-F<sub>2</sub>-F<sub>3</sub> (рис.3.). Характерно, что прозерин также способен подавлять плодовитость дафний в условиях однократной и постоянной затравки; величина его NOEC=0,045 мкМ. Исходя из сравнительно низкой острой токсичности соединений типа № 547 на дафниях, последние не могут быть использованы для экстренной биодетекции загрязнения воды соединениями типа № 547.

Исследования, проведенные в рамках 28-дневного теста «закрытые бутылки», показали, что соед. № 547 и его моно-изомеры 857 и 627 не могут быть отнесены к классу быстро-биodeградируемых веществ (рис. 4).

Вместе с тем, установлено, что соед. № 547 постепенно теряет свой антихолинэстеразный и миорелаксantный потенциал, био-деградируя на сроках более 1 месяца (рис. 4).

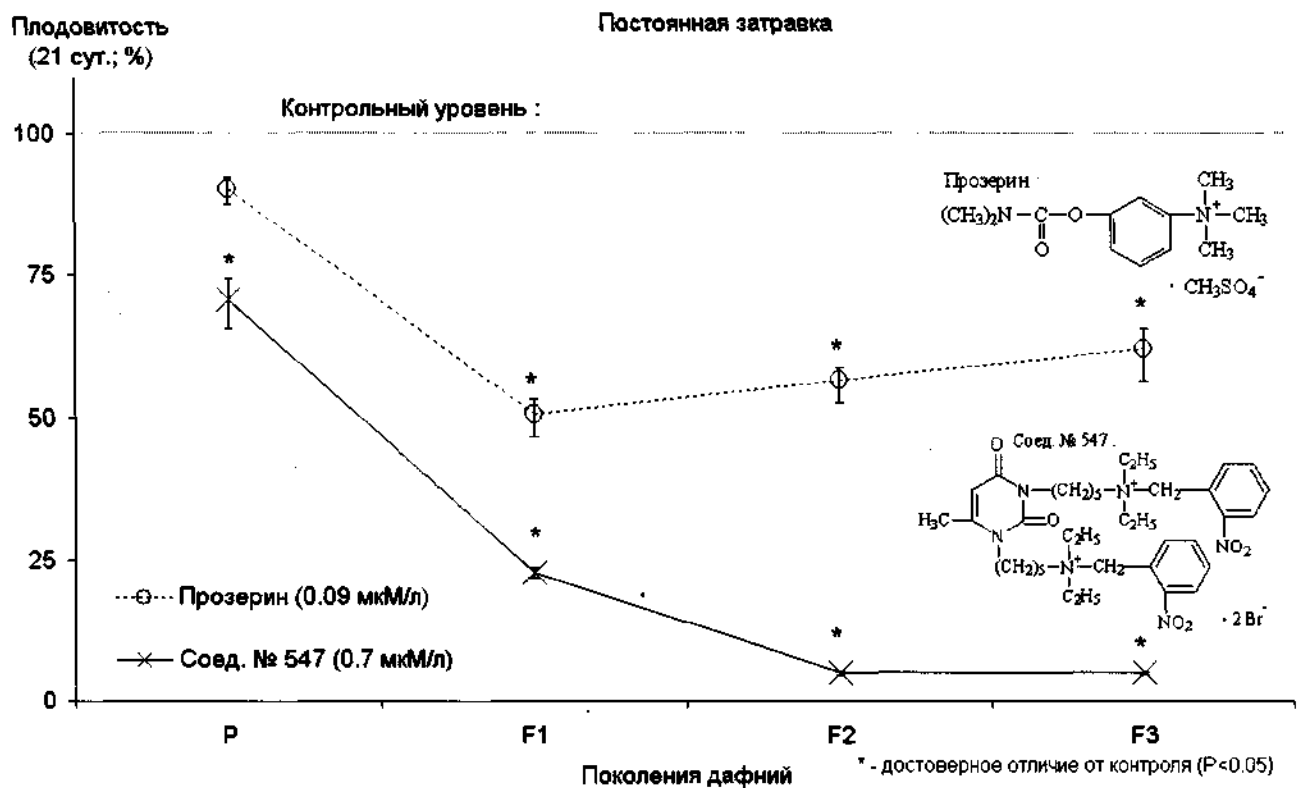
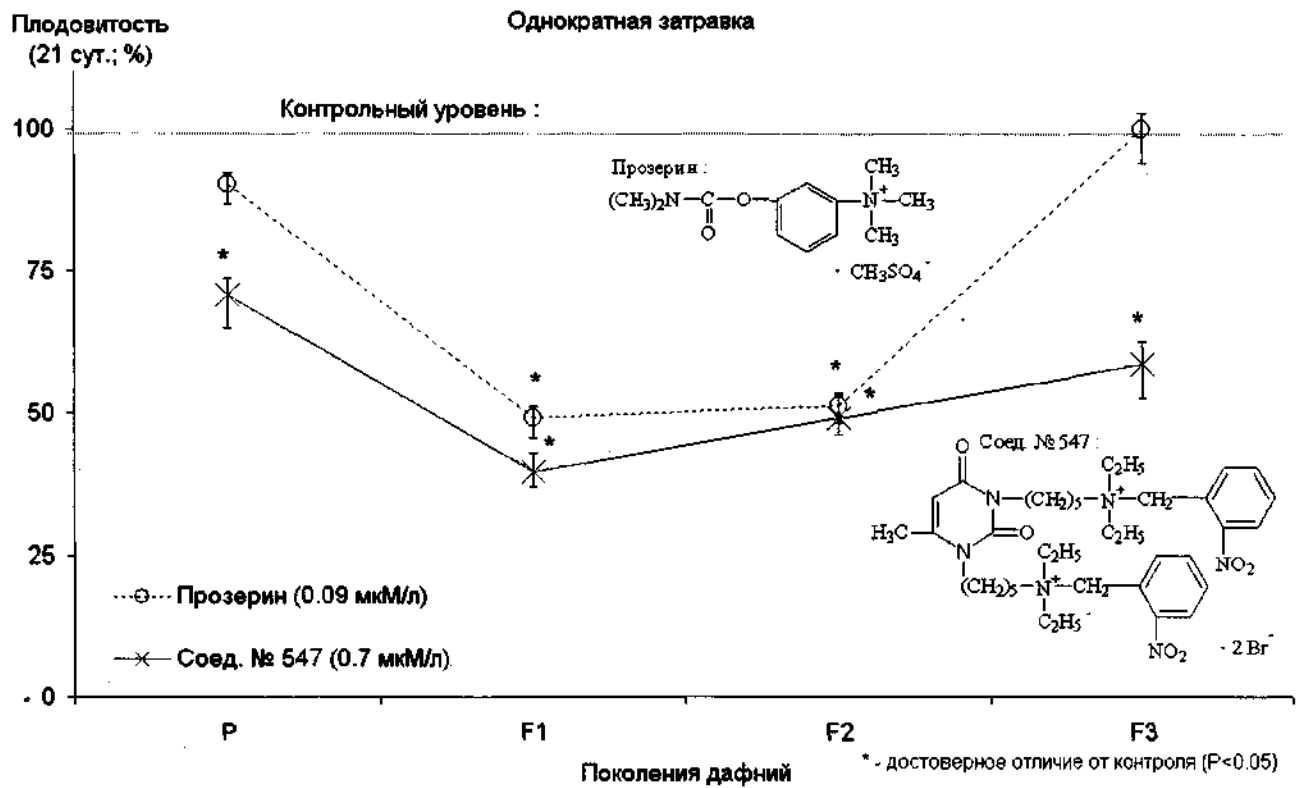


Рис. 2. Плодовитость дафний в ряду поколений P-F<sub>1</sub>-F<sub>2</sub>-F<sub>3</sub> при однократной (А) и постоянной (Б) затравке прозеринном и соед. № 547 в конц. 1/30 от ЛК<sub>50</sub>.

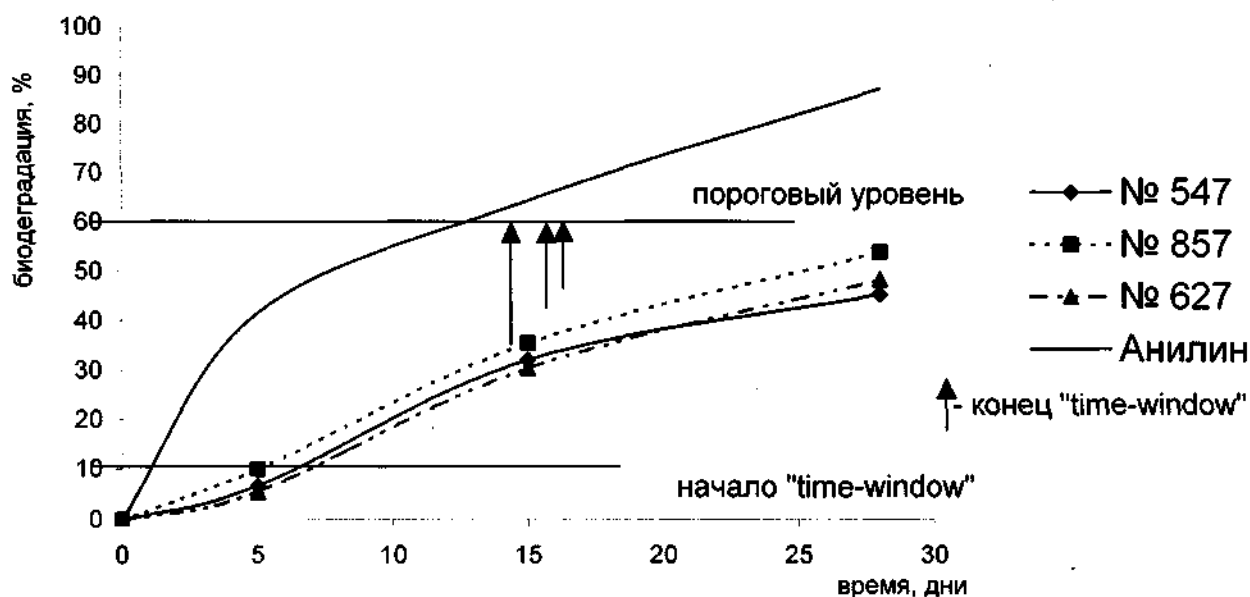


Рис. 3. Степень быстрой биодegradации соединений № 547, 857, 627 и анилина (стандартный токсикант) в тесте «закрытые бутылки» (Closed bottle test; OECD 301D).

Таким образом, соединения типа № 547 по ряду параметров имеют более высокую экологическую безопасность, чем традиционные ингибиторы ХЭ, что отвечает современным требованиям, предъявляемым к биологически активным веществам медицинского и иного назначения.

## ВЫВОДЫ

1. На основе проведенного анализа зависимостей «структура-безопасность» 32 представителей бис- и моно- аммониевых производных урацила в отношении млекопитающих и гидробионтов, выявлено 18 соединений, которые отличаются от иных антихолинэстеразных средств сочетанием высоких показателей фармакологической ( $LD_{50}/ED_{50} > 50,0$ , мыши) и экологической ( $LK_{50\text{дафнии}} > 50,0$  мкМ) безопасности. Показана высокая токсичность и низкая безопасность фосфорилированных производных N-гетероциклов в отношении как дафний, так и млекопитающих.
2. Экспериментально показано, что за наиболее высокие показатели фармакологической и экологической безопасности ( $\omega$ -аммониоалкил)-6-метилурацилдигалогенидов ответственно следующее сочетание особенностей молекулярной структуры: (1) метадиазиновый 2,4-диоксо- фрагмент (урацил, ксантин), (2) пентилен-3-окисьные или пентаметиленовые цепи между атомами азота аммонийных групп и N-гетероцикла, (3) один или два замещенных бензильных фрагмента в составе аммониевой(ых) групп, (4) малые



по объему заместители в положениях 5 (H, CH<sub>3</sub>O, NO<sub>2</sub>, CN) и 6 (H, CH<sub>3</sub>) урацилового фрагмента.

3. Проведено ранжирование алкиламмониевых и фосфорилированных производных урацила по уровню токсичности. Алкиламмониевые производные могут быть отнесены к классу высокотоксичных или умереннотоксичных веществ для млекопитающих и к классу малотоксичных или практически нетоксичных веществ для гидробионтов (одноклеточные водоросли, простейшие, колдоватки, дафнии). Повышение токсичности отдельных соединений в отношении гидробионтов сопряжено с ростом длины алифатического радикала в положении 5 пиримидинового цикла.
4. Определена безопасная для репродуктивной функции *Daphnia magna* концентрация 1,3-бис[5(диэтил-*o*-нитробензиламмонии)-6-метилурацилдибромида (соед. № 547), составляющая 0,39 мкМ (NOEC=1/60 от ЛК<sub>50</sub>). NOEC прозерина (1/60 от ЛК<sub>50</sub>) составляет 0,045 мкМ.
5. Произведена оценка степени биodeградации 1,3-бис[5(диэтил-*o*-нитробензиламмонии)-6-метилурацилдибромида (соед. № 547) и его монопроизводных изомеров (соединения 627, 857) к биodeградации в водной среде в лабораторных условиях. Соединения нельзя отнести к категории «быстробиodeградируемых» веществ, однако, существует тенденция к деградации на сроках более 28 дней с потерей антихолинэстеразного и миорелаксантаного потенциала.

#### Список работ, опубликованных по теме диссертации:

1. Аслямова, А.А. Синтез и миорелаксантаная активность 1,3-бис-(5-аммониопентил)-6-метилурацилдибромидов / В.В. Зобов, К.А. Петров, А.А. Аслямова, Л.А. Березинский, В.С. Резник, В.Д. Акамсин, И.В. Галяметдинова, Р.Х. Гиниятуллин // Хим.-фарм. ж. -2005. –Т. 39, № 6. –С. 12-14.
2. Аслямова, А.А. Синтез и биологическая активность некоторых моно- и бис- $\omega$ -аммониоалкилурацилбромидов / В.В. Зобов, А.А. Аслямова, Л.А. Березинский, В.С. Резник, В.Д. Акамсин, И.В. Галяметдинова, Р.Х. Гиниятуллин, А.А. Нафикова, Ш.К. Латыпов // Хим.-фарм. ж. - 2005. –Т. 39, № 5. –С. 15-19.
3. Аслямова, А.А. Синтез и миорелаксантаная активность 1,3-бис-( $\omega$ -аммониопентил)-6-метилурацилдигалогенидов / В.В. Зобов, К.А. Петров, А.А. Аслямова, Л.А. Березинский, В.С. Резник, В.Д. Акамсин, И.В. Галяметдинова, Р.Х. Гиниятуллин // Хим.-фарм. ж. - 2005. –Т. 39, № 4. – С. 13-15.
4. Аслямова, А.А. Отсроченные последствия интоксикации дафний селективным и неселективным ингибитором ацетилхолинэстеразы / В.В. Зобов, Л.А. Березинский, А.А. Аслямова, В.С. Резник // Бюлл. exper. биол. и мед. - 2005. –Т. 139, № 1. –С. 77-78

5. Аслямова, А.А. Избирательная блокада локомоторных мышц урацилсодержащими тетраалкиламмониевыми ингибиторами ацетилхолинэстеразы / В.В. Зобов, К.А. Петров, А.А. Аслямова, Л.А. Березинский, В.Д. Акамсин, И.В. Галяметдинова, В.С. Резник // ДАН. – 2005. - Т. 401, № 1. - С. 120-123.
6. Аслямова, А.А. Синтез и биологическая активность некоторых  $\alpha, \omega$ -бис(аммонио)алканов, содержащих оксопиримидиниловые радикалы / В.В. Зобов, А.А. Аслямова, Л.А. Березинский, В.С. Резник, В.Д. Акамсин, И.В. Галяметдинова, А.А. Нафикова // Хим.-фарм. журн. – 2004. -Т. 38, № 10, - С. 20-23.
7. Аслямова, А.А. Фосфорилированные и тетраалкиламмониевые производные урацила: безопасность и избирательность миорелаксантного действия / В.В. Зобов, К.А. Петров, А.А. Аслямова, Л.А. Березинский, В.С. Резник // Современные проблемы токсикологии. -2004, -№ 3, -С. 25-33.
8. Аслямова, А.А. Характеристика токсичности и безопасности некоторых  $\alpha, \omega$ -бис(аммонио)алканов, содержащих гетероциклические и ароматические радикалы / В.В. Зобов, В.С. Резник, А.А. Аслямова, Л.А. Березинский, В.Д. Акамсин // Токсикологический вестник. -2004, -№ 4, -С. 18-22.
9. Аслямова, А.А. Сравнительная эффективность урацилсодержащих ингибиторов ацетилхолинэстеразы на представителях батареи микробиотестов ТОХКІТ / Л.А. Березинский, А.А. Аслямова, В.В. Зобов // Российский физиологический журн. им. И.М. Сеченова. -2004. –Т. 90, № 8. –С. 158.
10. Аслямова, А.А. Микробиотесты в оценке параметров экотоксичности новых тетраалкиламмониевых ингибиторов холинэстераз / А.А. Аслямова, Л.А. Березинский, В.В. Зобов // Abstracts of the II Congress of Ukrainian Toxicologists, october 12-14, 2004, Kyiv, Ukraine 2004, p. 188-189.
11. Аслямова, А.А. Сравнительная эффективность урацилсодержащих ингибиторов ацетилхолинэстеразы на представителях батареи микробиотестов ТОХКІТ / Л.А. Березинский, А.А. Аслямова, В.В. Зобов // XIX съезд физиологического общества им. И.П. Павлова. 19-24 сентября 2004. Екатеринбург. Тезисы докладов. Часть 2. –С. 158 (Рос. физиол. журн. им. И.М. Сеченова. -2004. –Т. 90, -№ 8).
12. Аслямова, А.А. Отдаленные последствия интоксикации дафний новым селективным ингибитором ацетилхолинэстеразы и прозеринном / В.В. Зобов, А.А. Аслямова, Л.А. Березинский // Тезисы докл. 2-й съезда токсикологов России. –Москва. 10-13 ноября 2003. –с. 459-460.
13. Аслямова, А.А. Комплексный подход к оценке опасности синтезируемых соединений на примере нового класса ингибиторов АХЭ млекопитающих / А.А. Аслямова, Л.А. Березинский, В.В. Зобов // Химия и медицина. Новые лекарственные средства: успехи и перспективы: V Всероссийского научного

семинара и молодежной научной школы, 5-8 сентября 2005 г.: тезисы докл. - Уфа: изд. Гилем, 2005. – С. 181-183.

14. Аслямова, А.А. Тетраалкиламмониевые и фосфорилированные производные N-гетероциклов - ранжирование токсичности на мышах и *Daphnia magna* S. / Л.А. Березинский, А.А. Аслямова, В.В. Зобов // Abstracts of the II Congress of Ukrainian Toxicologists, october 12-14, 2004, Kyiv, Ukraine 2004, p. 76-77.