

А. К. Брель, И. Н. Тюренков, С. В. Лисина, С. С. Попов, Д. В. Верхоляк,
Ю. Н. Будаева, Е. В. Волотова, Н. В. Атапина, Д. В. Куркин

АЦЕТОКСИБЕНЗОИЛГЛИЦИЛГЛИЦИНЫ КАК ПОТЕНЦИАЛЬНЫЕ ЦЕРЕБРОПРОТЕКТОРНЫЕ ПРЕПАРАТЫ

ФГБОУ ВО "Волгоградский государственный медицинский университет" Минздрава РФ, Россия, 400131, Волгоград, площадь Павших Борцов, 1.

Осуществлен синтез 3,4,5-триметокси-, 2-, 3-, 4-ацетоксибензоилглицилглицинов и их водорастворимых калиевых и литиевых солей. Экспериментально изучены церебропротекторные свойства водорастворимых калиевых и литиевых солей ацетоксибензоилглицилглицинов. Выявлено, что наиболее выраженными церебропротекторными свойствами при ишемии головного мозга обладает литиевая соль 2-ацетоксибензоилглицилглицин.

Ключевые слова: амиды карбоновых кислот; производные гидроксibenзойных кислот; церебропротекторные препараты; синтез.

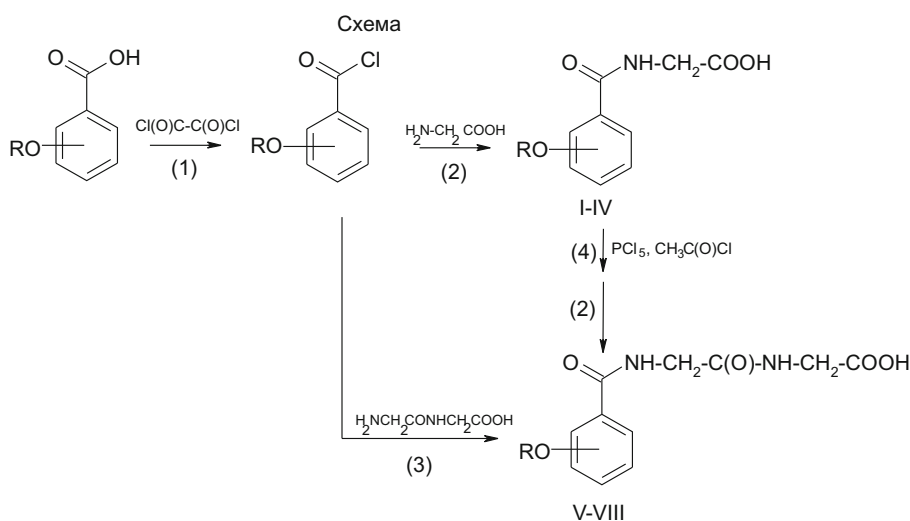
Амиды по разнообразию биологической активности занимают одно из первых мест среди других классов органических соединений. В ряду амидов карбоновых кислот найдены вещества с различными видами активности [1], но особый интерес вызывают производные гидроксibenзойных кислот, поскольку среди соединений этой группы найдено множество биологически активных соединений, представляющих ценность для химии, фармации и медицины. Активные исследования в области химии таких соединений несомненно актуальны, и потенциал производных гидроксibenзойных кислот, как биологически активных веществ, раскрыт далеко не полностью.

Одним из путей создания потенциальных лекарственных средств, а также путей повышения эффективности уже существующих, является химическая модификация молекул соединений, обнаруживших ценные фармакологические свойства. Этот путь позволяет не только изменить структуры молекул веществ, но и изменить их активность, уменьшить отрицательные свойства и токсичность, что придает совершенно новую направленность терапевтическому действию, а повышение их растворимости в воде предполагает значительное упрощение изучения их биологической

активности *in vivo* и *in vitro*. Такими активными фрагментами в структурах, в частности, могут быть остатки аминокислот.

Целью нашей работы был синтез и исследование биологической активности амидов гидроксibenзойных кислот. Для обеспечения максимального разнообразия структур и выявления зависимости структура — церебропротективная активность нами спланирован и проведен синтез систематических рядов амидов О-ацетилированных производных 2-, 3-, 4-гидроксibenзойных кислот и 3,4,5-триметоксибензойной кислоты на основе глицина и глицилглицина. Для повышения растворимости синтезированных соединений и изучения влияния катиона щелочного металла на биологическую активность были получены калиевые и литиевые соли.

Синтез целевых соединений проводился 2 путями (схема). Согласно первому пути, гидроксibenзойную кислоту обрабатывают хлористым оксалилом с получением хлорангидрида кислоты (1), затем хлорангидрид кислоты конденсируют с аминокислотой с получением амида (2), для получения диамида стадии повторяют. Однако, несмотря на сообщения об успешности такого пути синтеза N-ацилпептидов, который проте-



RO=2-OAc (I), 3-OAc (II), 4-OAc (III), 3,4,5-OMe (IV), 2-OAc (V), 3-OAc (VI), 4-OAc (VII), 3,4,5-OMe (VIII)

кает через стадию циклизации N-ацил- α -аминокислот в кислой среде с образованием производного оксазолинона-5 без его выделения [2], в случае гидроксibenзоилглицина не приводило к удовлетворительным результатам. При необходимости выделения гидроксibenзоилхлорида целесообразно его получать с использованием пятихлористого фосфора в присутствии ацетилхлорида [3] (4). Другой путь — после проведения стадии (1), гидроксibenзоилхлорид конденсируют с дипептидом (3).

Экспериментальная химическая часть

В работе использовались методы органического синтеза, физические и физико-химические методы анализа органических соединений (^1H ЯМР, хромато-масс-спектрометрия, хроматография в тонком слое сорбента, элементный анализ).

Температуры плавления соединений определяли в стеклянных капиллярах на приборе MelTemp 3.0 фирмы Laboratory Devices (США), скорость нагрева 10 и 1 °С/мин. Чистоту и индивидуальность соединений подтверждали методом тонкослойной хроматографии на пластинах “Silufol UV-254”, подвижная фаза этилацетат — гексан, 3:1, проявление — в парах йода и УФ-светом. Спектры ^1H ЯМР производных регистрировали в ДМСО- d_6 на спектрометре Bruker DRX500, внутренний стандарт ГМДС. Содержание металла в синтезированных соединениях определяли на спектрофотометре Shimadzu AA-670. Для интерпретации спектров использовали лицензионный программный продукт фирмы Advanced Chemistry Development Inc. под коммерческим названием ACD/HNMR Predictor Pro v.3.

Все растворители и реагенты получены из коммерческих источников и использовались без очистки. Температуры плавления, выходы и спектральные данные приведены в табл. 1.

2-Ацетоксибензоилглицилглицин (V). К 2,37 г (10 ммоль) N-(2-ацетоксибензоил)глицина (I), 7,85 г (100 ммоль) ацетилхлорида и 2,71 г (13 ммоль) порошкообразного крупнозернистого пятихлористого фосфора, реакционную смесь перемешивают при комнатной температуре в течение 1 ч. Выпавшие кристаллы 2-ацетоксибензоилхлорида промывают петролейным эфиром и сушат над фосфорным ангидридом. Затем к 0,9 г (12 ммоль) глицина и 30 мл 6 н. NaOH по

каплям приливают 1,2 г (6 ммоль) хлорангидрида в диметилформамиде (ДМФА) в течение 1,5 ч при охлаждении. Затем полученную реакционную смесь перемешивают еще 2,5 ч, контролируя pH среды (pH > 7). Полученную смесь выливают на лед и подкисляют хлороводородной кислотой до pH = 3, выпавшие кристаллы отфильтровывают, промывают водой, сушат и перекристаллизовывают из изопропанола. Выход 2,62 г (89 %); R_f 0,34 (этилацетат — гексан, 3:1).

Общая методика синтеза гидроксibenзоилглицилглицинов (VI – VIII). К 20 ммоль глицилглицина и 50 мл 6 н. NaOH приливают по каплям 10 ммоль гидроксibenзоилхлорида (II – IV) [4] в ДМФА в течение 1,5 ч при охлаждении. Затем полученную реакционную смесь перемешивают еще 2,5 ч, контролируя pH среды (pH > 7). Полученную смесь выливают в лед и подкисляют хлороводородной кислотой до pH = 3, выпавшие кристаллы отфильтровывают, промывают водой, сушат и перекристаллизовывают из изопропанола.

3-Ацетоксибензоилглицилглицин (VI). Выход 2,23 г (76 %); R_f 0,32 (этилацетат — гексан 3:1).

4-Ацетоксибензоилглицилглицин (VII). Выход 2,26 г (77 %); R_f 0,26 (этилацетат — гексан, 3:1).

3,4,5-Триметоксибензоилглицилглицин (VIII). Выход 2,64 г (81 %); R_f 0,38 (этилацетат — гексан, 3:1).

Общий метод получения калиевых солей. В реакторе смешивают 10 ммоль этилата калия, 50 г толуола или бензола и 10 ммоль соответствующего гидроксibenзоилглицилглицина и перемешивают 30 мин при температуре бани 100 °С с защитой от влаги и углекислого газа. После охлаждения продукт отделяют фильтрованием, промывают 10 % спиртовым раствором KOH и сушат в сушильном шкафу до постоянной массы. Выход калиевых солей 95 – 98 %.

Общий метод получения литиевых солей [4]. Смешивают 10 ммоль гидроксида лития, 50 г бензола и 10 ммоль соответствующего гидроксibenзоилглицилглицина. Реакционную смесь перемешивают в течение 60 – 90 мин при температуре 80 – 82 °С. Температурный режим обусловлен температурой кипения бензола. Выход литиевых солей 95 – 98 %.

Экспериментальная биологическая часть

Эксперименты проведены на 82 половозрелых беспородных крысах-самцах массой 180 – 200 г, 3,5 –

Таблица 1

Характеристики некоторых гидроксibenзоилглицилглицинов

Соединение	Выход, %	$T_{пл}$, °С	Спектры ПМР (ДМСО- d_6), δ , м.д.
V	89	321 – 323	13,01 с (ОН-), 9,44 с и 7,18 с (2Н, -NH-), 7,78 – 7,73 м, 7,51 – 7,44 м, 7,33 – 7,36 м, 7,26 – 7,20 м (4Н, C_6H_4), 4,02 с и 3,69 с (4Н, - CH_2 -), 2,26 с (3Н, - CH_3)
VI	76	276 – 278	13,01 с (ОН-), 7,74 с и 7,34 с (2Н, -NH-), 7,80 – 7,77 м, 7,59 – 7,57 м, 7,51 – 7,46 м, 7,24 – 7,20 м (4Н, C_6H_4), 4,02 с и 3,84 с (4Н, - CH_2 -), 2,26 с (3Н, - CH_3)
VII	77	298 – 300	13,01 с (ОН-), 8,14 с и 7,28 с (2Н, -NH-), 7,79 д, 7,19 д (4Н, C_6H_4), 3,96 с и 3,69 с (4Н, - CH_2 -), 2,26 с (3Н, - CH_3)
VIII	81	284 – 286	13,01 с (ОН-), 7,94 с и 7,18 с (2Н, -NH-), 7,03 д (2Н, C_6H_4), 3,99 с и 3,92 с (4Н, - CH_2 -), 3,79 с (6Н, - OCH_3) 3,69 с (3Н, - OCH_3)

4-месячного возраста. Все животные доставлены из питомника лабораторных животных “Рапполово” РАМН (Ленинградская обл.). Содержание животных соответствовало правилам лабораторной практики при проведении доклинических исследований в РФ (ГОСТ 3 51000.3-96 и 51000.4-96) и Приказу Министерства здравоохранения и социального развития Российской Федерации от 23 августа 2010 г. № 708-н “Об утверждении правил лабораторной практики” (GLP) с соблюдением Международных рекомендаций Европейской конвенции по защите позвоночных животных, используемых при экспериментальных исследованиях (1997 г.) [5].

Животных распределили на следующие группы: 1 – ложнооперированные (ЛО), 2 – контроль-ишемия (животные с окклюзией общих сонных артерий (ОСА), получавшие физиологический раствор); 3 – 9 – животные с окклюзией ОСА, которым за 30 мин до и через 3 ч после операции внутривенно вводили соединения литиевые и калиевые соли соединений V, VII, VIII в дозах 10 мг/кг, фенибут в дозе 50 мг/кг.

Для моделирования недостаточности мозгового кровообращения (НМК) использовалась одномоментная необратимая билатеральная окклюзия ОСА [6]. Регистрация выживаемости и выраженности неврологического дефицита осуществляли на 6, 12, 24, 48 и 72 ч после операции. Неврологический статус животных определяли по шкале McGraw в модификации И. В. Ганнушкиной [7]. При наличии у животных нескольких симптомов неврологического дефицита тяжесть состояния определялась как сумма соответствующих баллов. Дополнительно для оценки степени неврологических нарушений через 72 ч после моделирования НМК исследовали поведение выживших животных и состояние их когнитивных функций, для чего использовали стандартные тесты: открытое поле (ОП), условная реакция пассивного избегания (УРПИ) и экстраполяционное избегание (ТЭИ).

Обработку данных проводили с помощью пакета программ Microsoft Excel и GraphPad Prism. Достоверность показателей в сравниваемых группах оценивали с помощью критерия Манна — Уитни. Статистически значимыми считали эффекты при $p < 0,05$.

Результаты и их обсуждение

Суммарные данные о динамике выживаемости животных после билатеральной необратимой окклюзии ОСА представлены в табл. 2.

Необратимая двусторонняя окклюзия ОСА приводила к гибели значительной части животных контрольной группы. Летальные исходы отмечались уже через 6 ч после ОСА, а к концу 3 сут выжило всего 37,5 % животных, тогда как в группе ЛО не было зафиксировано ни одного летального случая. Выживаемость после окклюзии ОСА животных, получавших литивую соль соединения V или калиевую соль соединения VII, была выше, чем в контрольной группе и группе животных, получавших препарат сравнения фенибут, и составила 62,5 %.

Количество выживших животных, которым вводили калиевую соль соединения V или литиевые соли соединений VII и VIII, было сопоставимо с таковым в группе животных, получавших препарат сравнения фенибут. Введение крысам калиевой соли соединения VIII не влияло на их выживаемость после окклюзии ОСА.

У животных группы контроль-ишемия (негативный контроль) через 72 ч после моделирования НМК неврологический дефицит по шкале McGraw составил $(6,9 \pm 1)$ (табл. 3). Также по результатам тестов ОП, ТЭИ, УРПИ у животных группы контроль-ишемия через 72 ч после моделирования НМК отмечен выраженный поведенческий и когнитивный дефицит по сравнению с группой ЛО животных, что проявлялось в снижении двигательной, ориентировочно-исследовательской активности в тесте ОП и угасанием памятного следа в тестах УРПИ и ТЭИ (табл. 3).

Наименьший неврологический дефицит по шкале McGraw наблюдался у животных, предварительно получавших литивую соль соединения V и калиевую соль соединения VII, а наибольшее его значение было у животных, которым вводили калиевую соль соединения VIII.

Через 3 сут после окклюзии ОСА практически у всех животных, получавших исследуемые соединения (за исключением калиевой соли соединения VIII), двигательная и ориентировочно-исследовательская активность в тесте ОП была выше по сравнению с животными контрольной группы, о чем свидетельствовало

Таблица 2

Выживаемость животных после окклюзии ОСА, получавших исследуемые соединения

№	Группа животных	N	Выживаемость, %				
			6 ч	12 ч	24 ч	48 ч	72 ч
1	Ложнооперированные	8	100	100	100	100	100
2	Контроль-ишемия	16	87,5	75	62,5	50	37,5
3	V	8	87,5	62,5	62,5	62,5	62,5
4	K ⁺	8	87,5	75	50	50	50
5	VII	8	87,5	50	50	50	50
6	K ⁺	8	87,5	62,5	62,5	62,5	62,5
7	VIII	8	100	87,5	87,5	62,5	50
8	K ⁺	8	100	50	37,5	37,5	37,5
9	Фенибут	10	90	80	70	60	50

Примечание: N — количество животных в группе.

Неврологический дефицит и показатели в тестах ОП, УРПИ, ТЭИ через 72 ч после окклюзии ОСА

№	Группа		Неврологический дефицит по шкале McGraw, балл	ОП		УРПИ	ТЭИ
	соединение	катион		ДА	ОИА	ЛПТО, с	ЛПП, с
1	ЛО		1,3 ± 0,1	21,1 ± 1,2	10,8 ± 1	180	11,1 ± 2,4
2	Контроль-ишемия		6,9 ± 1*	9,2 ± 1*	5 ± 0,9*	112,2 ± 24,2*	68,8 ± 23,3*
3	V	Li+	4,5 ± 1,6 [#]	14,8 ± 1,3 [#]	6,8 ± 1,1	158,4 ± 21,6	44,8 ± 13,9
4		K+	6 ± 1,5	16,3 ± 1,4 [#]	10,5 ± 1,5 [#]	159,8 ± 20,3	69,5 ± 39
5	VII	Li+	5,8 ± 1,6	14,5 ± 1,7 [#]	8 ± 0,9 [#]	151,5 ± 28,5	41,3 ± 2,3
6		K+	4,6 ± 1,6 [#]	17,8 ± 1,9 [#]	7 ± 0,8	147 ± 20,6	59,6 ± 31,1
7	VIII	Li+	5,9 ± 1,6	14,3 ± 0,5 [#]	8 ± 0,9 [#]	146,5 ± 33,5	54 ± 42
8		K+	6,8 ± 1,6	13,3 ± 1,9	6 ± 1,2	125 ± 55	62,3 ± 7,8
9	Фенибут	–	5,1 ± 1,1	14,2 ± 1,4 [#]	8,1 ± 0,8 [#]	148 ± 24	55 ± 14

Примечание: * различия достоверны по сравнению с ЛО ($p < 0,05$); [#] различия достоверны по сравнению с контрольной группой ($p < 0,05$). ДА — двигательная активность (количество пересеченных квадратов животными в тесте ОП; ОИА — ориентировочно-исследовательская активность (количество суммированных актов стоек и заглядываний в норки); ЛПТО — латентный период захода в темный отсек в УРПИ, с; ЛПП — время (с) решения экстраполяционной задачи в ТЭИ.

большее количество пересеченных квадратов, заглядываний в норки и стоек (табл. 3).

Однако введение не всех исследуемых соединений способствовало устранению нарушений памяти у животных, вызванных окклюзией ОСА. Так, если в тесте УРПИ практически у всех животных (за исключением крыс, получавших калиевую соль соединения VIII) лучше сохранялся памятный след, чем у животных контрольной группы, то в условиях аверсивной среды (в тесте ТЭИ) только животные, получавшие литиевые соли соединений V, VII, VIII, смогли выполнить задачу экстраполяции быстрее, чем животные контрольной группы. При этом у животных, которым вводили литиевую соль соединения V, был отмечен наименьший когнитивный дефицит, о чем свидетельствовал более длительный период латентного захода в темный отсек в тесте УРПИ и более короткий период решения экстраполяционного избавления от аверсивной среды (времени подныривания) в тесте ТЭИ.

Таким образом, проведенное исследование церебропротекторной активности калиевых и литиевых солей амидов гидроксibenзойных кислот при ишемии головного мозга свидетельствует о перспективности поиска в этом ряду веществ для профилактики и лечение острых и хронических НМК, а по совокупности показателей — выживаемости животных, выраженности неврологических нарушений (неврологического, двигательного и когнитивного дефицита) у животных,

получавших исследуемые соединения, наиболее выраженными церебропротекторными свойствами обладает литиевая соль соединения V (2-ацетоксибензоилглицилин), и оно является перспективным для дальнейшей разработки в качестве лекарственного препарата для лечения и профилактики НМК.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (проект № 15-43-02445/15).

ЛИТЕРАТУРА

1. А. К. Брель, С. В. Лисина, Ю. Н. Будаева и др., *Ж. общей химии*, **85**(9), 1561 – 1563 (2015).
2. C. F. Hoynig, M. G. McKenna, and D. L. Walters, *Communications*, **3**, 191 – 193 (1982).
3. O. Igglessi-Markopoulou and C. Sandris, *J. Heterocyclic Chem.*, **19**(4), 883 – 890 (1982); DOI: 10.1002 / jhet.5570190434.
4. Патент РФ 2570646 (2015).
5. Приказ Министерства здравоохранения и социального развития Российской Федерации от 23 августа 2010 г. № 708-н “Об утверждении правил лабораторной практики”, Москва (2010).
6. Р. С. Мирзоян, А. С. Саратиков, М. Б. Плотноков и др., *Методические рекомендации по доклиническому изучению лекарственных средств для лечения нарушений мозгового кровообращения и мигрени*, Ч. 1, Гриф и К, Москва (2012), сс. 453 – 477.
7. И. В. Ганнушкина, *Ж. невропатол. и психиатрии*, **1**, 14 – 18 (1996).

Поступила 25.07.17

ACETOXYBENZOYL GLYCYLGLYCINES AS POTENTIAL CEREBROPROTECTIVE DRUGS

A. K. Brel*, I. N. Tyurenkov, S. V. Lisina, S. S. Popov, D. V. Verkholiyak, Yu. N. Budaeva, E. V. Volotova, N. V. Atapina, and D. V. Kurkin

Volgograd State Medical University, Volgograd, 400131 Russia;

*e-mail: fibfuv@mail.ru

A series of 3,4,5-trimethoxy 2-, 3-, and 4-acetoxybenzoyl glycyglycines and their soluble potassium and lithium salts have been synthesized. Soluble potassium and lithium salts of acetoxybenzoyl glycyglycines were experimentally studied for their possible cerebroprotective properties. The most pronounced cerebroprotective activity with respect to cerebral ischemia was observed for lithium salts of 2-acetoxybenzoyl glycyglycine.

Keywords: carboxylic acid amides; hydroxybenzoic acids derivatives; acetoxybenzoyl glycyglycines; cerebroprotective drugs; synthesis.