



УДК 547.853+547.388.3

6-МЕТИЛУРАЦИЛ В СИНТЕЗЕ МОНО- И ДИГИДРАЗОНОВ: СИНТЕЗ, ЦИТОТОКСИЧНОСТЬ И АНТИОКСИДАНТНАЯ АКТИВНОСТЬ

© 2025 г. И. Б. Черникова^{*, #}, Р. Ю. Хисамутдинова^{*}, Н. С. Макара^{*}, Э. Р. Саяхова^{*}, Д. В. Ишметова^{**}, В. А. Вахитов^{**}

^{*} Уфимский институт химии УФИЦ РАН, Россия, 450054 Уфа, просп. Октября, 71

^{**} Институт биохимии и генетики УФИЦ РАН, Россия, 450054 Уфа, просп. Октября, 71

Поступила в редакцию 10.03.2025 г.

После доработки 22.03.2025 г.

Принята к публикации 23.03.2025 г.

6-Метилурацил – важное соединение, активно участвующее в процессах клеточной регенерации. Его способность стимулировать рост и размножение клеток – ключевой фактор в процессе заживления тканей. Метилурацил ускоряет процесс восстановления кожи, что делает его применение незаменимым в дерматологии и хирургии для лечения ран, язв и ожогов. Гидразиды карбоновых кислот также представляют интерес благодаря уникальным координационно-химическим свойствам и находят применение в различных отраслях. В медицине гидразиды проявляют широкий спектр активности: они обладают противотуберкулезным, противовирусным и антибактериальным действием. Некоторые гетероциклические гидразоны проявили себя в качестве ингибиторов основной протеазы SARS-CoV-2. Это подчеркивает важность изучения структурных и функциональных особенностей данных соединений. Синтез гидразонов с фрагментом 6-метилурацила представляет собой многообещающее направление в области фармацевтической химии и медицины, открывающее новые возможности для разработки инновационных лекарственных средств. В данной работе осуществлен синтез дигидразонов на основе дигидразидов карбоновых кислот (адипиновой, азелаиновой и себаценовой) с фрагментами 6-метилурацила. С помощью онлайн-версии экспертной системы OCHEM произведена оценка спектра биологической активности *in silico*, включая цитотоксичность, антиоксидантную активность, острую токсичность и гематотоксичность полученных соединений и препаратов сравнения. Исследования биологической активности показали, что полученные моно- и дигидразоны не обладают цитотоксическим действием по отношению к изученным линиям опухолевых клеток (HepG2, A549, MCF-7, HCT-116) и условно-нормальной клеточной линии HEK 293. При этом установлена умеренная избирательная цитотоксичность 6-метил-5-[(2-фенилгидразон)метил]-пиримидин-2,4(1*H*,3*H*)-диона в отношении колоректальной карциномы человека (клеточная линия HCT-116, IC₅₀ = 71.75 ± 8.29) и условно-нормальной клеточной линии HEK 293 (IC₅₀ = 19.35 ± 2.12). Антиоксидантную активность моно- и дигидразонов изучили с использованием методов восстановления Fe³⁺, катион-радикала ABTS и стабильного радикала DPPH в условиях *in vitro*. Выявлено соединение-лидер (3-(2-((6-метил-2,4-диоксо-1,2,3,4-тетрагидропиримидин-5-ил)метил)гидразинил)бензойная кислота), сравнимое по антиоксидантной активности с аскорбиновой кислотой, для углубленного изучения.

Ключевые слова: 6-метилурацил, гидразоны, антиоксидантная активность, цитотоксическая активность *in vitro*

DOI: 10.7868/S1998286025060035

Сокращения: EC₅₀ – эффективная концентрация, при которой происходит 50%-ное восстановление радикалов DPPH, ABTS или восстановление Fe(III) до Fe(II) от их общего содержания в реакционной смеси; 5-FU – 5-фторурацил; IC₅₀ – концентрация вещества, при которой наблюдается 50%-ное ингибирование жизнеспособности клеток; АОА – антиоксидантная активность; QSAR – количественное соотношение “структура–активность” (quantitative structure activity relationship).

Автор для связи: (эл. почта: inna.b.chernikova@yandex.ru).

ВВЕДЕНИЕ

Существует значительный интерес к разработке новых соединений, обладающих противосудорожной, антидепрессивной, обезболивающей, противовоспалительной, антитромбоцитарной, противомаларийной, антимикробной, антимикобактериальной, противоопухолевой, сосудорасширяющей, противовирусной и антиоксидантной активностью. Гидразоны, содержащие азометинную группу $-N=CH_2-$, представляют собой важный класс соединений для разработки новых лекарственных препаратов.

Доказано, что гидразоны обладают антимикробной, противосудорожной, обезболивающей, противовоспалительной, антитромбоцитарной, противотуберкулезной и противоопухолевой активностью [1–4]. Например, изоникотиноилгидразоны – противотуберкулезные препараты [5], [(5-нитро-2-фурил)метилен]гидразид 4-гидроксibenзойной кислоты (нифуроксазид) – кишечный антисептик [6], 4-фторбензойной кислоты [(5-нитро-2-фурил)метилен]гидразид обладает антибактериальной активностью как против *Staphylococcus aureus* ATCC 29213, так и против *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv [7, 8]. Для производных гидразона, содержащих мочевиноамидные фраг-

менты, произведена оценка их ингибирующей активности в отношении ферментов моноаминоксидазы (MAO-A и MAO-B) [9].

Цель настоящей работы – проведение исследований, направленных на синтез и оценку новых гидразонов, в качестве вклада в разработку потенциальных новых лекарственных средств для лечения различных социально значимых заболеваний. В настоящей работе объектами исследования выбраны моно- и дигидразоны с фрагментом 6-метилурацила.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Ранее сообщалось о синтезе моногидразонов с фрагментом 6-метилурацила (I–VII) [10] и 1,3,6-триметилурацила (VIII–XI) [11] (схема 1).

В данной работе впервые осуществлен синтез дигидразонов с двумя фрагментами 6-метилурацила. Для этого выбраны коммерчески доступные дигидразиды на основе адипиновой (C_6), азелаиновой (C_9) и себациновой (C_{10}) кислот. Дигидразоны были получены путем конденсации 6-метил-5-формулурацила (2 экв.) и соответствующего дигидразида при кипячении в EtOH/ H_2O (1 : 1) в течение 1 ч. Выходы целевых соединений (XII–XIV) составили 87–92% (схема 2). Сле-

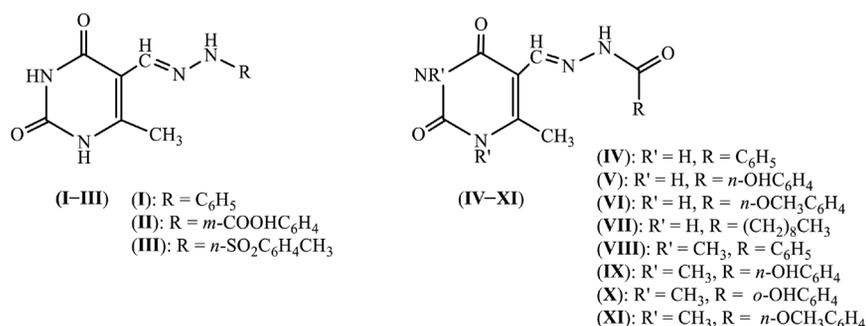


Схема 1. Гидразоны с фрагментом 6-метилурацила (I–VII) и его *N,N*-диметильного аналога (VIII–XI).

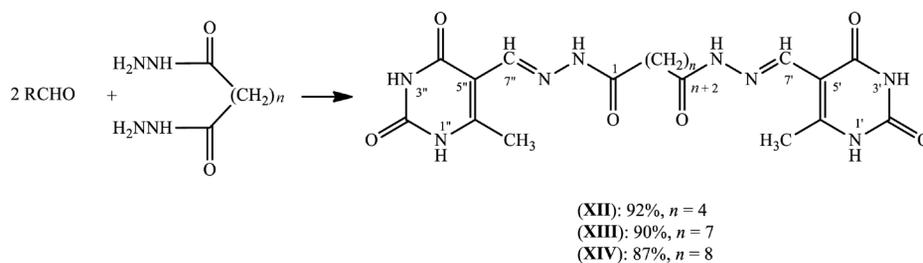


Схема 2. Синтез дигидразонов (XII–XIV).

дует отметить, что в аналогичных условиях с использованием дигидразидов щавелевой, малоновой и янтарной кислот образуются продукты, идентификация которых затруднена из-за их низкой растворимости. В спектрах ^1H -ЯМР соединений (XII–XIV) отмечено наличие двух сигналов групп NH, относящихся к фрагменту $\text{NHN}=\text{CH}-$, а также два сигнала наблюдались и для азометинового протона. Данный факт может быть объяснен тем, что, несмотря на симметричность молекул, связи $\text{CH}=\text{N}$ удалены друг от друга, и их можно считать независимыми и ожидать два набора сигналов для протонов и углеродов в спектрах ^1H - и ^{13}C -ЯМР соответственно.

Расчеты вероятной биологической активности методом QSAR (quantitative structure activity relationship). QSAR-метод количественных соотношений “структура–активность” представ-

ляют собой мощный инструмент для предсказания биологической активности молекул на основе их химической структуры, что значительно сокращает время и затраты на экспериментальные исследования [12], и позволяют анализировать большие объемы данных [13, 14]. Для проведения скрининга структур (I–XIV) *in silico* использовали онлайн-версию экспертной системы OCHEM (<https://ochem.eu/>), которая позволяет оценить возможный спектр биологической активности. В результате были рассчитаны вероятные цитотоксическая и антиоксидантная активности, гематотоксичность, а также вероятность острой токсичности при пероральном введении мышам как для исследуемых гидразонов, так и для препаратов сравнения (табл. 1). В качестве препаратов сравнения были выбраны противоопухолевый препарат из группы антиметаболитов, антагонистов пири-

Таблица 1. Результаты расчетов методом QSAR биологической активности и токсичности гидразонов (I–XIV) и препаратов сравнения

Соединение	Цитотоксическая активность IC_{50} – 432 484, мкМ	Вероятная острая токсичность при пероральном введении мышам LD_{50} ASNN, мг/кг	Вероятная гематотоксичность – 389 812, %	Антиоксидантная активность IC_{50} – 445 890, мкг/мл
(I)	4.34	754	Отрицательно, 79%	31.32
(II)	2.37	1091	Положительно, 77%	25.28
(III)	3.48	1353	Положительно, 77%	27.12
(IV)	4.36	741	Отрицательно, 77%	33.42
(V)	3.56	1931	Отрицательно, 64%	23.76
(VI)	3.03	2900	Положительно, 79%	26.58
(VII)	4.86	1385	Положительно, 66%	38.14
(VIII)	1.84	868	Отрицательно, 63%	22.26
(IX)	2.39	1675	Отрицательно, 66%	18.67
(X)	1.93	1289	Отрицательно, 82%	21.68
(XI)	1.82	4875	Положительно, 76%	19.47
(XII)	2.42	717	Положительно, 66%	41.85
(XIII)	2.46	555	Положительно, 64%	62.50
(XIV)	1.62	714	Положительно, 64%	59.18
5-FU	9.55	729	Положительно, 69%	17.59
Аскорбиновая кислота	13.8	7158	Отрицательно, 89%	7.83
Тролокс	19.45	548	Положительно, 82%	16.05

мидинов 5-фторурацил (5-FU) и соединения, проявляющие выраженные антиоксидантные свойства: аскорбиновая кислота (витамин С) и тролокс – водорастворимый аналог витамина Е.

Исследуемые соединения (I–XIV) проявляли вероятную высокую цитотоксичность, однако при этом была отмечена умеренная вероятность токсичности в сравнении с 5-FU, который выступает более агрессивным противоопухолевым средством. Эти результаты могут указывать на потенциал гидразонов как менее токсичных альтернатив в терапии, что делает их интересными для дальнейших исследований *in vitro*. Средняя антиоксидантная активность соединений (I–XIV) действительно ниже, чем у аскорбиновой кислоты и тролокса, однако это может быть преимуществом в связи с их более длительным действием и стабильностью. Благодаря сочетанию двух фармакологических фрагментов в своей структуре, синтезированные гидразоны (I–XIV) могут обеспечивать более целенаправленное воздействие на специфические клеточные мишени, что открывает возможности для разработки новых терапевтических средств с минимальными побочными эффектами.

Таким образом, прогнозы вероятных гематотоксичности, острой токсичности при пероральном введении мышам, антиоксидантной и цитотоксической активности позволяют сделать заключение о высокой вероятной цитотоксичности в сочетании с общей низкой токсичностью синтезированных соединений.

Цитотоксичность гидразонов (I–XI). В результате оценки жизнеспособности клеток на фоне действия гидразонов (I–XI) в диапазоне концентраций 1–100 мкМ было установлено наличие цитотоксической активности у соединения (I) в отношении клеточной линии НЕК 293 ($IC_{50} = 19.35 \pm 2.12$, табл. 2). Также соединение (I) проявляет незначительное токсическое действие в отношении опухолевой клеточной линии НСТ-116 ($IC_{50} = 71.75 \pm 8.29$), в то время как остальные опухолевые клеточные линии не чувствительны к данному соединению. Однако выявленная цитотоксическая активность соединения (I) значительно ниже в сравнении с 5-фторурацилом (табл. 2). Показано, что соединения (II–XI) не проявляют цитотоксических свойств по отношению ко всем исследованным опухолевым и условно-нормальной клеточной линии.

Таблица 2. Цитотоксическая активность соединений (I–XI) на разных линиях клеток в сравнении с 5-фторурацилом (5-FU)

Соединение	M, г/моль	IC ₅₀ , мкМ				
		НЕК 293	НСТ-116	HepG2	MCF-7	A549
(I)	244.25	19.35 ± 2.12	71.75 ± 8.29*	>100	>100	>100
(II)	288.26	>100	>100	>100	>100	>100
(III)	322.34	>100	>100	>100	>100	>100
(IV)	272.26	>100	>100	>100	>100	>100
(V)	288.26	>100	>100	>100	>100	>100
(VI)	302.29	>100	>100	>100	>100	>100
(VII)	322.40	>100	>100	>100	>100	>100
(VIII)	300.31	>100	>100	>100	>100	>100
(IX)	316.31	>100	>100	>100	>100	>100
(X)	316.31	>100	>100	>100	>100	>100
(XI)	330.34	>100	>100	>100	>100	>100
5-FU	130.08	6.32 ± 0.71	1.91 ± 0.95*	3.86 ± 0.70*	1.00 ± 0.04*	0.98 ± 0.13*

Примечание: эксперименты проводили в одной биологической повторности. Данные представлены в виде среднего арифметического ± SD.

* Растворимость в DMSO (100%) при 20°C.

Антиоксидантная активность. Антиоксиданты осуществляют защитную функцию, перенося атомы водорода или электроны на свободные радикалы, тем самым предотвращая их избыточное образование в организме. Поскольку любые заболевания возникают при нарушении соотношений в организме прооксидантных факторов и факторов защиты в сторону увеличения накопления свободных радикалов, то весьма актуально наличие антиоксидантных свойств у биологически активных соединений с потенциальной фармакологической активностью. Антиоксидантные свойства веществ определяют с использованием методов *in vitro*, в которых окислители при восстановлении или соединения-индикаторы меняют окраску. К таким общепринятым методам относят методы восстановления радикалов DPPH и ABTS или восстановление Fe(III) до Fe(II).

Метод FRAP (ferric reducing antioxidant power). Данный метод изучения антиоксидантной активности был выбран, поскольку исследуемые соединения не содержат SH-группы и устойчивы в кислой среде. Для всех соединений была показана

линейная зависимость роста оптической плотности с увеличением концентрации. Соединение (II) проявило наибольшую активность среди изучаемых гидразонов, увеличивая содержание Fe^{2+} в реакционной смеси. На рис. 1а показана линейная зависимость увеличения оптической плотности и АОА при повышении концентрации соединения (II) от 10 до 100 мкг/мл, с дальнейшим снижением активности при увеличении концентрации до 200 мкг/мл. Подобная зависимость показана и для аскорбиновой кислоты (рис. 1б). Эффективная концентрация (EC_{50}) соединения (II) составила 15.49 ± 0.71 мкг/мл, что было в 1.7 раза меньше по сравнению с активностью аскорбиновой кислоты ($EC_{50} = 9.05 \pm 2.63$ мкг/мл). Соединения (III), (VII), (X), (XII) и (XIII) железовосстанавливающую активность не проявили (табл. 3).

Метод восстановления радикала ABTS (2,2'-азино-бис-(3-этилбензотиазолин-6-сульфоная кислота). Соединения (II), (IV–VI) и (IX) показали линейную зависимость снижения оптической плотности раствора, содержащего $ABTS^+$, при повышении концентраций от 1 до 500 мкг/мл.

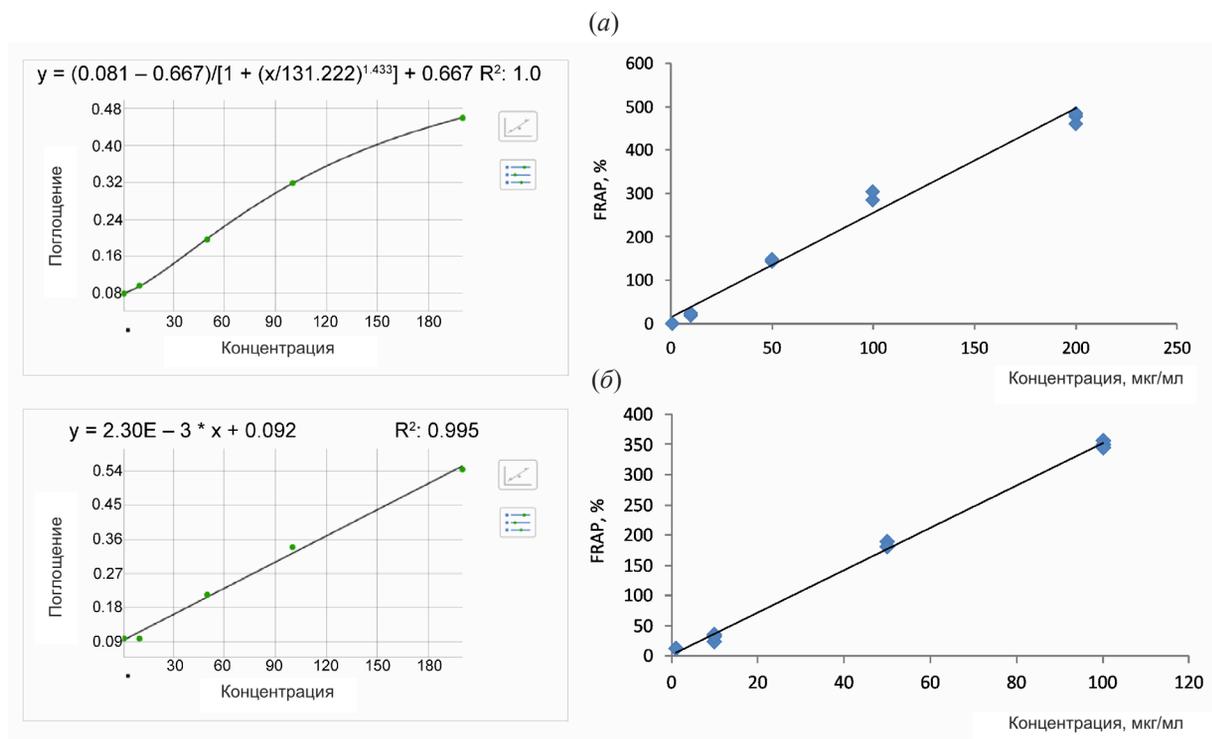


Рис. 1. Графики зависимости изменения оптической плотности раствора (увеличение образования комплекса с Fe^{2+}) и увеличения антиоксидантной активности от концентрации соединения (II) (а) и аскорбиновой кислоты (б) в методе FRAP.

Таблица 3. Антиоксидантная активность гидразонов (I–XIV) на моделях *in vitro*

Соединение	EC ₅₀ , мкг/мл		
	FRAP	ABTS	DPPH
(II)	15.49 ± 0.71	423.37 ± 1.78	255.40 ± 0.74
(III)	–	–	–
(IV)	64.63 ± 1.04	658.99 ± 20.37	–
(V)	119.69 ± 12.84	830.17 ± 15.64	–
(VI)	32.23 ± 0.71	725.30 ± 14.06	–
(VII)	–	–	–
(VIII)	165.55 ± 3.08	–	–
(IX)	20.65 ± 0.18	936.80 ± 19.26	–
(X)	–	–	–
(XI)	88.84 ± 1.01	–	–
(XII)	–	2142.29 ± 38.54	–
(XIII)	–	–	–
(XIV)	608.88 ± 28.22	–	–
Аскорбиновая кислота	9.05 ± 2.63	409.80 ± 9.72	66.36 ± 3.32
Тролокс	–	559.91 ± 3.19	104.46 ± 7.61

Примечание: полужирным шрифтом выделены данные по соединению-лидеру (II).

На рис. 2а показан пример линейной зависимости снижения концентрации катион-радикала АВТС при увеличении концентрации соединения (II) в растворе. Соединение (XII) проявило незначительную АОА в отношении АВТС⁺ (табл. 3). Среди всех изученных гидразонов соединение (II) проявило наибольшую восстанавливающую активность, в 1.3 раза большую, чем у тролокса, и почти на уровне АОА аскорбиновой кислоты, со значениями $EC_{50} = 423.37 \pm 1.78$, 559.91 ± 3.19 и 409.80 ± 9.72 мкг/мл соответственно.

Метод восстановления стабильного радикала DPPH (1,1-дифенил-2-пикрилгидразила). Данный метод широко используется для определения антиоксидантной активности природных веществ. Гидрофобность радикала DPPH ограничивает

область применения метода возможностью определения только жирорастворимых антиоксидантов.

Среди изученных гидразонов соединение (II) проявило восстанавливающие свойства в отношении стабильного радикала DPPH, уменьшая его содержание в реакционной смеси дозозависимо в концентрации от 1 до 100 мкг/мл, с последующим снижением активности (рис. 3а). Аналогичные данные были получены для аскорбиновой кислоты и тролокса (рис. 3б, в). Гидразоны (III–XIV) на данной модели АОА не проявили. Соединение (II) проявило АОА ($EC_{50} = 255.40 \pm 0.74$ мкг/мл), в 3.8 и 2.2 раза уступающую АОА аскорбиновой кислоты ($EC_{50} = 66.36 \pm 3.32$ мкг/мл) и тролокса ($EC_{50} = 104.46 \pm 7.61$ мкг/мл) (табл. 3, рис. 3).

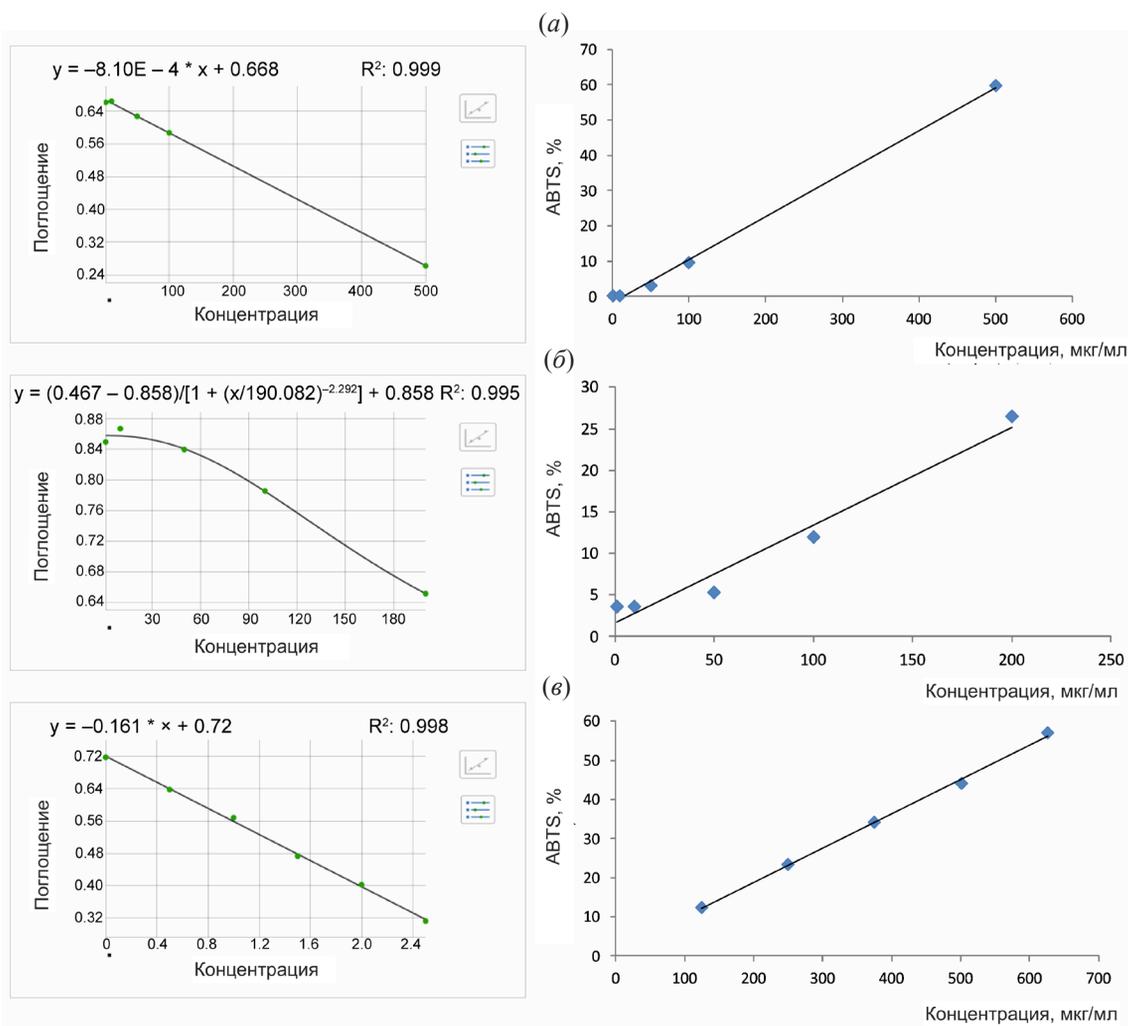


Рис. 2. Графики зависимости снижения оптической плотности раствора (уменьшения концентрации катиона АВТС) и увеличения антиоксидантной активности от концентрации соединения (II) (а), аскорбиновой кислоты (б) и тролокса (в) в методе восстановления катиона АВТС.

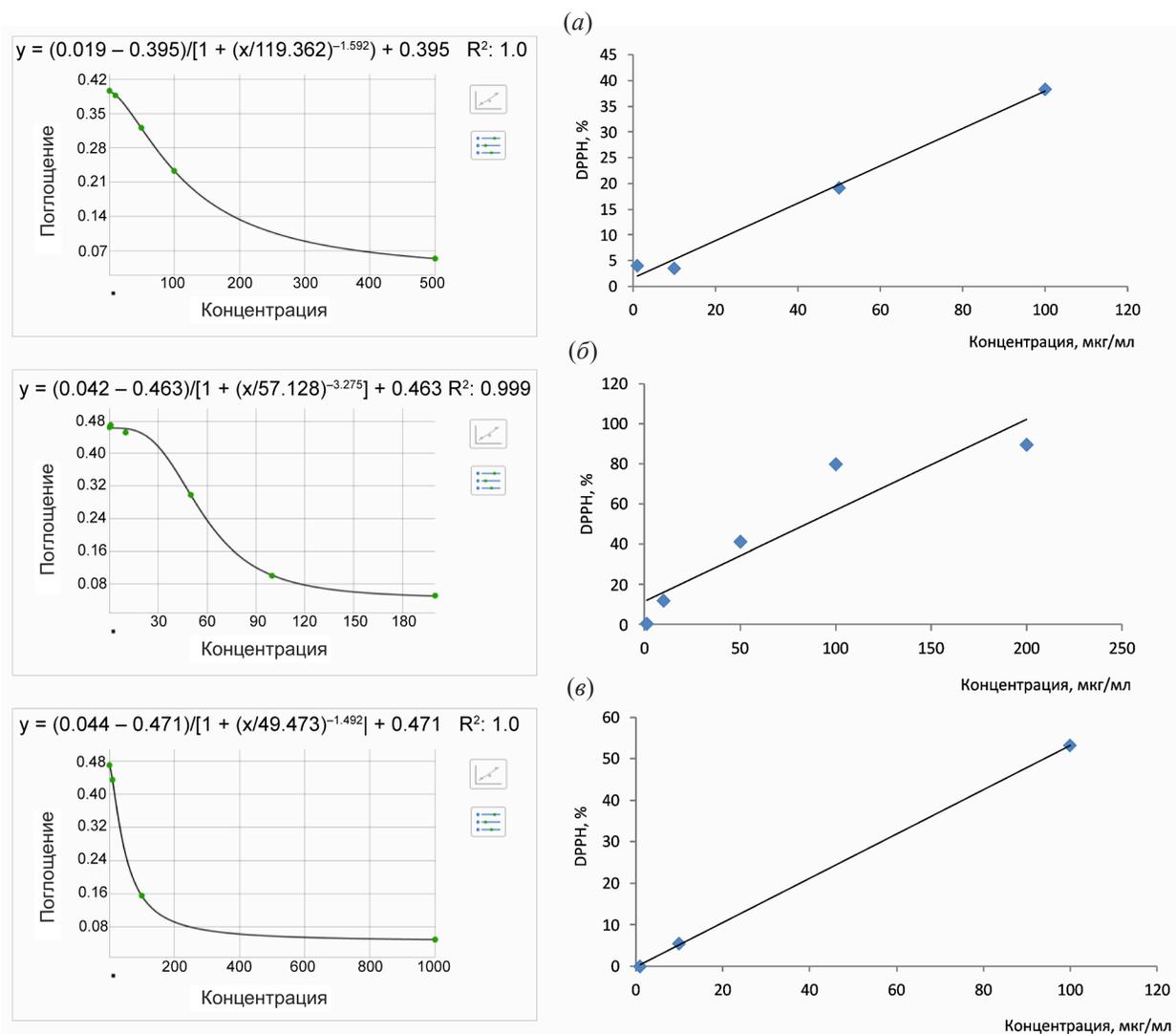


Рис. 3. Графики зависимости: снижения оптической плотности раствора (уменьшения концентрации стабильного радикала DPPH) и увеличения антиоксидантной активности (%) от концентрации соединения (II) (а), аскорбиновой кислоты (б) и тролокса (в) в методе восстановления стабильного радикала DPPH.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Расчетная часть. При проведении QSAR-анализа использовали онлайн-версию экспертной системы OCHEM (<https://ochem.eu/>) и модели Cytotoxic activity $IC_{50} = 432\ 484$ (точность тренировочной выборки $82\% \pm 2.0$; точность тестовой выборки $87\% \pm 4.0$), Consensus mouse oral ASNN (точность тренировочной выборки $72\% \pm 2.0$; точность тестовой выборки $74\% \pm 3.0$), Nematotoxicity – 389 812 (точность тренировочной выборки $79\% \pm 1.0$; точность тестовой выборки $83\% \pm 1.0$), Antioxidant activity $IC_{50} = 445\ 890$ (точ-

ность тренировочной выборки $78\% \pm 2.0$; точность тестовой выборки $77\% \pm 4.0$).

Химическая часть. Спектры 1H - и ^{13}C -ЯМР регистрировали на импульсном спектрометре Avance III 500 МГц (Bruker, Германия) с рабочей частотой 500.13 МГц для 1H , 125.47 МГц для ^{13}C и 50.68 МГц (^{15}N , для соединений (XII), (XIII)) с использованием 5-мм датчика с Z-градиентом PABBO при постоянной температуре образца 298K в $DMSO-d_6$. Химические сдвиги в спектрах 1H - и ^{13}C -ЯМР приведены в м.д. относительно сигнала растворителя (δ_H 2.50 и δ_C 39.52 м.д.). Химические сдвиги для ядер ^{15}N получали из F_1 -проекции

{ ^1H , ^{15}N } НМВС-спектров, значения приведены в аммиачной шкале. Элементный анализ выполняли на приборе EURO-3000 (Nekatech, Германия).

Соединения (I–VII) и (VIII–XI) были получены нами по ранее опубликованным методикам [10, 11].

Синтез соединений (XII–XIV) (общая методика). Смесь 0.33 г (2.15 ммоль) 6-метил-5-формилурацила и соответствующего дигидразида (1 ммоль) перемешивали в 4 мл раствора $\text{H}_2\text{O} : \text{EtOH} = 1 : 1$. Реакционная масса была гетерогенной, желтого цвета. Кипятили с обратным холодильником в течение 1 ч. Выпавший осадок отфильтровывали, последовательно промывали этанолом, водой и ацетоном, после чего высушивали.

№1,№6-Бис((6-метил-2,4-диоксо-1,2,3,4-тетрагидропиримидин-5-ил)метил)гександигидразид (XII). Порошок белого цвета, выход 0.40 г (92%). Спектр ^1H -ЯМР: 1.54–1.58 м (4H, H3, H4); 2.40–2.43 м (4H, H2, H5); 2.45 с (6H, 2 CH_3); 8.00 с и 8.20 с (2H, H7', H7''); 10.90 с и 11.11 с (2H, 2 NH); 11.27 уш.с (4H, H1', H3', H1'', H3''). Спектр ^{13}C -ЯМР: 19.13 и 19.17 (2 CH_3); 24.4 и 24.6 (C3, C4); 32.5 (C2, C5); 103.8 и 104.0 (C5', C5''); 139.2 и 142.4 (C7', C7''); 150.57 и 150.62 (C2', C2''); 153.17 и 153.23 (C6', C6''); 163.96 и 164.02 (C4', C4''); 174.3 (C1, C6). Спектр ^{15}N -ЯМР: 142.8 (N1', N1''); 152.3 (N3', N3''); 177.5 и 181.3 (2 NH); 318.8 (2 $\text{CH}=\text{N}$). Найдено (%): C, 48.41; H, 4.94; N, 25.14. $\text{C}_{18}\text{H}_{22}\text{N}_8\text{O}_6$. Вычислено (%): C, 48.43; H, 4.97; N, 25.10.

№1,№9-Бис((6-метил-2,4-диоксо-1,2,3,4-тетрагидропиримидин-5-ил)метил)нонандигидразид (XIII). Порошок белого цвета, выход 0.43 г (90%). Спектр ^1H -ЯМР: 1.24–1.28 м (4H, H4, H6); 1.50–1.55 м (2H, H5); 2.37 с (3H) и 2.42 с (3H, CH_3); 2.45–2.51 м (8H, H2, H3, H7, H8); 8.02 с и 8.18 с (2H, H7', H7''); 10.97 с и 11.12 (2H, 2 NH); 11.22 уш.с (2H, H1', H1''); 11.30 уш.с (2H, H3', H3''). Спектр ^{13}C -ЯМР: 18.86 и 19.08 (2 CH_3); 24.7 и 25.5 (C3, C7); 29.0 и 29.1 (C4, C6); 29.3 (C5); 32.6 и 34.5 (C2, C8); 103.8 и 104.0 (C5', C5''); 139.1 и 142.4 (C7', C7''); 150.56 и 150.62 (C2', C2''); 153.2 и 153.9 (C6', C6''); 163.96 и 164.03 (C4', C4''); 174.5 (C1, C9). Спектр ^{15}N -ЯМР: 142.8 (N1', N1''); 152.3 (N3', N3''); 177.3 и 181.1 (2 NH); 319.0 (2 $\text{CH}=\text{N}$). Найдено (%): C, 51.61; H, 5.76; N, 22.97.

$\text{C}_{21}\text{H}_{28}\text{N}_8\text{O}_6$. Вычислено (%): C, 51.63; H, 5.78; N, 22.94.

№1,№10-Бис((6-метил-2,4-диоксо-1,2,3,4-тетрагидропиримидин-5-ил)метил)декандигидразид (XIV). Порошок светло-желтого цвета, выход 0.44 г (87%). Спектр ^1H -ЯМР: 1.16–1.23 м (8H, H4, H5, H6, H7); 1.42–1.53 м (4H, H3, H8); 2.35 с и 2.38 с (6H, 2 CH_3); 2.40–2.44 м (4H, H2, H9); 7.94 с и 8.04 с (2H, H7', H7''); 10.92 с и 11.12 (2H, 2 NH); 11.26 уш.с (4H, H1', H3', H1'', H3''). Спектр ^{13}C -ЯМР: 18.8 и 19.0 (2 CH_3); 24.7 и 24.8 (C3, C8); 28.8 и 28.9 (C5, C6); 29.1 и 29.2 (C4, C7); 32.7 и 34.5 (C2, C9); 103.8 и 104.1 (C5', C5''); 139.2 и 142.4 (C7', C7''); 150.56 и 150.61 (C2', C2''); 153.2 и 154.0 (C6', C6''); 163.96 и 164.02 (C4', C4''); 173.9 и 174.6 (C1, C9). Найдено (%): C, 52.56; H, 6.00; N, 22.34. $\text{C}_{22}\text{H}_{30}\text{N}_8\text{O}_6$. Вычислено (%): C, 52.58; H, 6.02; N, 22.30.

Оценка цитотоксичности *in vitro*. Цитотоксические свойства синтезированных гидразонов (I–XI) определяли *in vitro* с помощью витального флуоресцентного красителя PrestoBlue® согласно протоколу изготовителя (Invitrogen, США). В экспериментах использовали клетки условно-нормальной линии НЕК 293 (клетки эмбриональной почки человека) и линии опухолевого происхождения: HepG2 (гепатоцеллюлярная карцинома человека), A549 (аденокарцинома легкого человека), MCF-7 (аденокарцинома протоков молочной железы человека), HCT-116 (колоректальная карцинома человека). Все клеточные линии получены из Российской коллекции клеточных культур (Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург). Клетки линии НЕК 293 (25×10^3 клеток на лунку), HepG2 (18×10^3 клеток на лунку), MCF-7 (6×10^3 клеток на лунку), A549 (5×10^3 клеток на лунку), HCT-116 (8×10^3 клеток на лунку) высаживали в 96-луночные планшеты в 100 мкл среды DMEM (Биолот, Россия) в присутствии 10% эмбриональной телячьей сыворотки (Invitrogen, США), 2 mM L-глутамин и 50 мкг/мл гентамицина сульфата. Через 24 ч к клеткам вносили исследуемые соединения в концентрациях 1, 10 и 100 мкМ (в 0.1%-ном DMSO). Цитотоксические свойства соединений оценивали после 48-ч инкубации (37°C, 5% CO_2) клеток с соединениями. Флуоресценцию детектировали с использованием мультипланшетного анализатора 2300 EnSpire® Multimode Plate Readers (Perkin Elmer, США). Расчет величины IC_{50} (концентрация

вещества, при которой наблюдается 50%-ное ингибирование жизнеспособности клеток) осуществляли с помощью программы GraphPad Prizm 5.0 (GraphPad Software Inc., США). Данные, полученные в трех независимых экспериментах, выражали в виде среднего арифметического значения (M) \pm стандартная ошибка среднего (\pm SEM).

Статистический анализ данных проводили с помощью стандартного пакета программ Statistica 6.1 (StatSoft. Inc., США). Для выявления значимости различий значений IC_{50} соединений между линией нормального и опухолевого происхождения применяли дисперсионный анализ (ANOVA) с использованием критерия Даннета ($p < 0.05$).

Антиоксидантная активность *in vitro*. Соединения (II–XIV) растворяли в DMSO и 98%-ном EtOH в концентрациях 1, 10, 50, 100, 200 и 500 мкг/мл. В качестве препаратов сравнения использовали аскорбиновую кислоту (ЧДА, ООО “Компонент-Реактив”, Россия) [15] и тролокс (6-гидрокси-2,5,7,8-тетраметилхроман-2-карбоновая кислота, 97%, Macklin, Китай) [16]. Оптическую плотность реакционных смесей измеряли на микропланшетном спектрофотометре FlexA-200HT (Alsheng, Китай).

Метод FRAP (ferric reducing antioxidant power). На модели *in vitro* оценивали способность соединений восстанавливать Fe(III) в гексацианоферрате калия ($K_3[Fe(CN)_6]$) до Fe(II): $K_4[Fe(CN)_6]$ с последующей реакцией с хлоридом Fe(III) с образованием окрашенного комплекса $Fe_4[Fe(CN)_6]_3$ (берлинская лазурь), имеющим максимум поглощения при 700 нм [17].

Растворы разных концентраций по 100 мкл добавляли в пробирки, содержащие 250 мкл фосфатного буфера (pH 6.6) и 250 мкл 1%-ного раствора $K_3[Fe(CN)_6]$. Реакционную смесь инкубировали при 50°C в течение 20–30 мин. Реакцию останавливали внесением 250 мкл 10%-ного раствора CCl_3COOH . Затем смесь центрифугировали для осаждения выпавшего осадка в течение 10 мин при 1500 об/мин. К 250 мкл надосадочной жидкости добавляли 250 мкл дистиллированной воды и 50 мкл 0.1%-ного раствора $FeCl_3$. Контрольным раствором служила реакционная смесь, содержащая 100 мкл DMSO или дистиллированной воды. Оптическую плотность растворов измеряли в трех повторах при длине волны 700 нм [17]. Значение результатов выражали в эффективной

концентрации анализируемых соединений EC_{50} (мкг/мл), при которой соединения восстанавливали половину содержащегося в реакционной смеси Fe(III) до Fe(II) относительно контрольного раствора.

Антиоксидантную активность (АОА) изучаемых образцов рассчитывали по формуле:

$$АОА (\%) = (A_{оп} - A_{конт}) / A_{конт} \times 100,$$

где $A_{конт}$ – оптическая плотность отрицательного контроля реакционной смеси с растворителем, $A_{оп}$ – оптическая плотность опытного соединения или положительного контроля с реакционной смесью.

Метод восстановления радикала ABTS (ABTS radical scavenging activity). Способность соединений восстанавливать катион-радикал 2,2'-азинобис-(3-этилбензотиазолин-6-сульфоновой кислоты ($ABTS^+$) была изучена по методу, описанному в работе [18]. Для приготовления раствора катиона ABTS к 7 мМ водному раствору ABTS (Leap Chem Co, Ltd., Китай) добавляли 2.45 мМ раствор персульфата калия ($K_2S_2O_8$, Ч, ГОСТ 4146-74) в соотношении 1 : 0.5 и оставляли на 6–10 ч в темноте при комнатной температуре до развития темно-синего окрашивания. Для получения рабочей смеси раствор катиона ABTS разбавляли фосфатным буфером (pH 7.4) до получения оптической плотности 0.70 ± 0.02 при 734 нм. К 10 мкл изучаемых образцов в различных концентрациях добавляли 1 мл рабочего раствора $ABTS^+$. В качестве отрицательного контроля 1 мл раствор $ABTS^+$ смешивали с 10 мкл 98%-ного EtOH или фосфатного буфера. В качестве положительных контролей использовали тролокс и аскорбиновую кислоту.

Антиоксидантную активность (АОА) изучаемых образцов рассчитывали по формуле:

$$АОА (\%) = (A_{конт} - A_{оп}) / A_{конт} \times 100,$$

где $A_{конт}$ – оптическая плотность отрицательного контроля раствора $ABTS^+$ с EtOH или фосфатным буфером, $A_{оп}$ – оптическая плотность опытного соединения или положительного контроля с раствором $ABTS^+$.

Метод восстановления радикала DPPH. Способность соединений восстанавливать стабильный свободный радикал 1,1-дифенил-2-пикрилгидразила (DPPH, TCI, Япония) изучали по методу [19] с некоторыми изменениями. Для этого к 10 мкл изучаемых образцов в различных концентрациях до-

бавляли 200 мкл раствора DPPH (25 мкг/мл в этаноле). В качестве отрицательного контроля раствор DPPH смешивали с 10 мкл 98%-ного EtOH. Тролокс и аскорбиновую кислоту использовали в качестве положительных контролей. Смесь перемешивали и инкубировали 30 мин при комнатной температуре. Оптическую плотность раствора измеряли при длине волны 517 нм.

Антиоксидантную активность (АОА) изучаемых образцов рассчитывали по формуле:

$$\text{АОА (\%)} = (A_{\text{конт}} - A_{\text{оп}}) / A_{\text{конт}} \times 100,$$

где $A_{\text{конт}}$ – оптическая плотность отрицательного контроля раствора DPPH с EtOH, $A_{\text{оп}}$ – оптическая плотность опытного соединения или положительного контроля с раствором DPPH.

Статистика. Для каждой концентрации образцов соединений проводили три параллельных анализа. Результаты представлены как среднее (M) и средняя ошибка среднего (\pm SEM). АОА соединений выражали в виде их эффективной концентрации (EC_{50} , мкг/мл), при которой происходит 50%-ное восстановление радикалов DPPH, ABTS⁺ или восстановление Fe(III) до Fe(II) от их общего содержания в реакционной смеси. EC_{50} рассчитывали методом регрессионного анализа с помощью программы Microsoft Excel, где на графике по оси абсцисс расположена концентрация тестируемых соединений, а по оси ординат – антиоксидантная активность (%).

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Синтезированы и охарактеризованы цитотоксические свойства гидразонов (I–XI), среди них обнаружено соединение (I), проявляющее умеренное избирательное цитотоксическое действие в отношении колоректальной карциномы человека (HCT-116) и условно-нормальной клеточной линии НЕК 293. Изучение антиоксидантной активности полученных соединений (II–XIV) с использованием методов восстановления Fe^{3+} , катион-радикала ABTS и стабильного радикала DPPH в условиях *in vitro* позволило выявить соединение-лидер (II), сравнимое по активности с аскорбиновой кислотой. Антиоксидантную активность соединения (II) в случае использования методов восстановления с применением катион-радикала ABTS и стабильного радикала DPPH можно объяснить наличием в его структуре COOH-группы с подвижным атомом водорода, т.к. восстановление

этих радикалов идет по механизму НАТ (hydrogen atom transfer).

Соединение (II) с выраженными антиоксидантными свойствами может быть дополнительно изучено на способность ингибировать гидроксильный и супероксидный радикал, перекись водорода, свободнорадикальные формы липидов, а также влиять на ферменты антиоксидантной защиты организма в условиях патологий (экспериментальный гепатит, воспаление, деструкции слизистой оболочки желудка).

БЛАГОДАРНОСТИ

Исследование цитотоксичности *in vitro* проводились на базе Института биохимии и генетики Уфимского федерального исследовательского центра РАН.

ФОНДОВАЯ ПОДДЕРЖКА

Работа выполнена в рамках государственного задания Министерства образования и науки Российской Федерации по теме № 125020601629-0 и в соответствии с планом научно-исследовательских работ Института биохимии и генетики Уфимского федерального исследовательского центра РАН по теме № 122041400169-2.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Настоящая статья не содержит описания исследований с участием людей или использованием животных в качестве объектов.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

ВКЛАД АВТОРОВ

Концептуализация, написание статьи, администрирование проекта – ИБЧ; написание статьи, анализ данных – РЮХ, НСМ, ЭРС, ДВИ, ВАВ.

Все авторы дали одобрение на окончательный вариант рукописи.

ДОСТУПНОСТЬ ДАННЫХ

Данные, подтверждающие выводы настоящего исследования, можно получить у корреспондирующего автора по обоснованному запросу.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. De Oliveira Carneiro Brum J., França C.C.T., La Plante S.R., Villar J.D.F. // Mini Rev. Med. Chem. 2020. V. 20. P. 342–368.
<https://doi.org/10.2174/1389557519666191014142448>

2. *Mistry S., Singh A.K.* // *Futur. J. Pharm. Sci.* 2022. V. 8. P. 7.
<https://doi.org/10.1186/s43094-021-00391-4>
3. *Jabeen M.* // *Turkish Chem. Soc. Sec. A: Chemistry.* 2022. V. 9. P. 663–698.
<https://doi.org/10.18596/jotcsa.1020357>
4. *Verma S., Lal S., Narang R., Sudhakar K.* // *Chem. Med. Chem.* 2023. V. 18. P. e202200571.
<https://doi.org/10.1002/cmcd.202200571>
5. *Sah P.P.T., People S.A.* // *J. Am. Pharm. Assoc.* 1954. V. 43. P. 513–524.
<https://doi.org/10.1002/jps.3030430902>
6. *Althagafy H.S., Abd El-Aziz M.K., Ibrahim I.M., Abd-alhameed E.K., Hassanein E.H.M.* // *Eur. J. Pharm.* 2023. V. 951. P. 175776.
<https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2023.175776>
7. *Rollas S., Gülerman N., Erdeniz H.* // *Farmaco.* 2002. V. 57. P. 171–174.
[https://doi.org/10.1016/s0014-827x\(01\)01192-2](https://doi.org/10.1016/s0014-827x(01)01192-2)
8. *Rollas S., Küçükgülzel Ş.G.* // *Molecules.* 2007. V. 12. P. 1910–1939.
<https://doi.org/10.3390/12081910>
9. *Tok F., Sağlık B. N., Özkay Y., Ilgın S., Kaplancıklı Z.A., Koçyiğit-Kaymakçioğlu B.* // *Bioorg. Chem.* 2021. V. 114. P. 105038.
<https://doi.org/10.1016/j.bioorg.2021.105038>
10. *Черникова И.Б., Беляева Э.Р., Лобов А.Н.* // *Изв. АН. Сер. хим.* 2023. Т. 72. С. 1815–1820.
11. *Chernikova I.B., Belyaeva E.R.* // *Russ. J. Gen. Chem.* 2024. V. 94. P. 337–340.
<https://doi.org/10.1134/S1070363224020099>
12. *Bonachera F., Parent B., Barbosa F., Froloff N., Horvath D.* // *J. Chem. Inf. Model.* 2006. V. 46. P. 2457–2477.
<https://doi.org/10.1021/ci600241>
13. *Лосенкова С.О., Погребняк А.В., Морозов Ю.А., Степанова Э.Ф.* // *Фармация и фармакология.* 2014. Т. 2. С. 105–113.
[https://doi.org/10.19163/2307-9266-2014-2-6\(7\)-105-113](https://doi.org/10.19163/2307-9266-2014-2-6(7)-105-113)
14. *Debnath A.K.* // *Mini Rev. Med. Chem.* 2001. V. 1. P. 187–195.
<https://doi.org/10.2174/1389557013407061>
15. *Njus D., Kelley P.M., Tu Y.-J., Schlegel H.B.* // *Free Radic. Bio. Med.* 2020. V. 159. P. 37–43.
<https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2020.07.013>
16. *Papagiouvannis G., Theodosis-Nobelos P., Rekkas E.A.* // *Molecules.* 2024. V. 29. P. 3763.
<https://doi.org/10.3390/molecules29163763>
17. *Adjimani J.P., Asare P.* // *Toxicol Rep.* 2015. V. 2. P. 721–728.
<https://doi.org/10.1016/j.toxrep.2015.04.005>
18. *Re R., Pellegrini N., Proteggente A., Pannala A., Yang M., Rice-Evans C.* // *Free Radic. Bio. Med.* 1999. V. 26. P. 1231–1237.
[https://doi.org/10.1016/s0891-5849\(98\)00315-3](https://doi.org/10.1016/s0891-5849(98)00315-3)
19. *Wu Z., Tan B., Liu Y., Dunn J., Martorell Guerola P., Tortajada M., Cao Zh., Ji P.* // *Molecules.* 2019. V. 24. P. 2825.
<https://doi.org/10.3390/molecules24152825>

Mono- and Dihydrazones with a 6-Methyluracil Fragment: Synthesis, Cytotoxicity, and Antioxidant Activity

I. B. Chernikova^{*, #}, R. Yu. Khisamutdinova^{*}, N. S. Makara^{*}, E. R. Sayakhova^{*},
D. V. Ishmetova^{**}, and V. A. Vakhitov^{**}

[#] E-mail: inna.b.chernikova@yandex.ru

^{*} Ufa Institute of Chemistry, UFIC RAS, prosp. Oktyabrya 71, Ufa, 450054 Russia

^{**} Institute of Biochemistry and Genetics, UFIC RAS, prosp. Oktyabrya 71, Ufa, 450054 Russia

6-Methyluracil is an important compound that plays an active role in cell regeneration processes. Its ability to stimulate cell growth and replication is a key factor in the tissue healing process. Methyluracil accelerates the skin repair process, which makes its use indispensable in dermatology and surgery for the treatment of wounds, ulcers and burns. Carboxylic acid hydrazides are also of interest due to their unique coordination-chemical properties and are used in various industries. In medicine, hydrazides exhibit a wide range of activity: they have anti-tuberculosis, antiviral and antibacterial effects. Some heterocyclic hydrazones have been shown to be inhibitors of the main protease of SARS-CoV-2. This highlights the importance of studying the structural and functional features of these compounds. The synthesis of hydrazones with a 6-methyluracil fragment is a promising area in the field of pharmaceutical chemistry and medicine, opening up new opportunities for the development of innovative drugs. In this work, dihydrazones were synthesized based on dihydrazides of carboxylic acids (adipic, azelaic, and sebacic) with fragments of 6-methyluracil. Using the online version of the OCHEM expert system, an *in silico* assessment of the spectrum of biological activity was performed, including cytotoxicity, antioxidant activity, acute toxicity and hematotoxicity of the obtained compounds and comparison drugs. Studies of biological activity have shown that the obtained mono- and dihydrazones do not have cytotoxic effects on the studied tumor cell lines (HepG2, A549, MCF-7, HCT-116) and the conditionally normal HEK 293 cell line. Moderate selective cytotoxicity of 6-methyl-5-[(2-phenylhydrazone) methyl]pyrimidine-2,4(1*H*,3*H*)-dione has been established in relation to human colorectal carcinoma (HCT-116 cell line, $IC_{50} = 71.75 \pm 8.29$) and the conditionally normal HEK 293 cell line ($IC_{50} = 19.35 \pm 2.12$). The antioxidant activity of mono- and dihydrazones was studied using methods of reduction of Fe^{3+} , cation radical ABTS and stable radical DPPH *in vitro*. A leader compound has been identified (3-(2-((6-methyl-2,4-dioxo-1,2,3,4-tetrahydropyrimidine-5-yl)methylene)hydrazinyl)-benzoic acid), comparable in antioxidant activity to ascorbic acid, for in-depth study.

Keywords: 6-methyluracil, hydrazones, antioxidant activity, cytotoxic activity *in vitro*