

2. Khadhri A. Screening of Bioactive Compounds of Medicinal Mushrooms Collected on Tunisian Territory / A. Khadhri, C. Aouadhi, S. Aschi-Smiti // International Journal of Medicinal Mushrooms. 2017;19(2):127–135.
3. Li Z. Chaga Medicinal Mushroom, *Inonotus obliquus* (Agaricomycetes) Polysaccharides Suppress Tacrine-induced Apoptosis by ROS-scavenging and Mitochondrial Pathway in HepG2 Cells / Li Z, Mei J, Jiang L, Geng C, Li Q, Yao X, Cao J // International Journal of Medicinal Mushrooms. 2019;21(6):583–593.
4. Predecka M. Stimulation of the activity of a novel tannase produced in white-rot fungi *Phellinus pini*, *Fomes fomentarius*, and *Tyromyces pubescens* by medium supplementation/ Predecka M, Jaszek M, Graż M, Głuszek N, Małysz K, Nowak A, Żuchowski J, Małecka-Massalska T // Biotechnology and Applied Biochemistry. 2016;63(5):652–658.
5. Тарун Е. И. Антиоксидантная активность гексагидрохинолонов / Е.И. Тарун, А.В. Данькова, А.Н. Пырко // Журнал Белорусского государственного университета. Экология. 2019;2: 77–83.

СИНТЕЗ 8-БРОМАДЕНОЗИНА ПРИ РАЗЛИЧНЫХ ЗНАЧЕНИЯХ PH SYNTHESIS OF 8-BROMOADENOSINE AT DIFFERENT PH VALUES

М. А. Ханчевский, В. Н. Лесик, Е. И. Квасюк
M. A. Khancheuski, V. N. Lesik, E. I. Kvasyuk

*Белорусский государственный университет, МГЭИ им. А.Д. Сахарова БГУ,
г. Минск, Республика Беларусь
maks.khanchevskiy@bk.ru
Belarusian State University, ISEI BSU, Minsk, Republic of Belarus*

В работе описаны методы получения 8-бромаденозина, который является важным промежуточным соединением в синтезе аналогов пуриновых нуклеозидов и нуклеотидов, обладающих широким спектром биологической активности. Изучено влияние значения pH среды на выход 8-бромаденозина. Показано, что значение pH 4,3 является оптимальным для получения 8-бромаденозина реакцией бромирования аденозина раствором брома в воде.

This article shows methods for the preparation of 8-bromoadenosine which is an important intermediate in the syntheses of analogs of purines nucleosides and nucleotides with a broad spectrum of biological activity. The influence of the pH values of the medium on the yield of 8-bromoadenosine was studied. It was showed that pH 4.3 is optimal for the preparation of 8-bromoadenosine by reaction of adenosine with a solution of bromine in water.

Ключевые слова: галогензамещенные нуклеозиды, синтез, pH, бромирование, 8-бромаденозин.

Keywords: halogenated nucleosides, synthesis, pH, bromination, 8-bromoadenosine.

<https://doi.org/10.46646/SAKH-2021-2-132-135>

Изменение в структуре гетероциклического основания или углеводного фрагмента природных нуклеозидов и нуклеотидов приводят к соединениям, получившим названия антиметаболиты. Большое число таких соединений обладает широким спектром биологической активности и нашло практическое применение в медицине в качестве противоопухолевых и противовирусных препаратов [1]. К антиметаболитам, представляющим компоненты нуклеиновых кислот, относятся соединения, содержащие атомы галогена в гетероциклических основаниях или в углеводных фрагментах. Такие галогенсодержащие пуриновые и пиримидиновые гетероциклические основания, нуклеозиды и нуклеотиды могут использоваться непосредственно в качестве лекарственных препаратов или промежуточных соединений в синтезе разнообразных антиметаболитов. Например, 8-хлораденозин (1) (Рис. 1), его 5'-моно- и 3',5'-циклофосфаты обладают сильным цитотоксическим действием в отношении опухоли молочной железы, лейкозов, прямой кишки и легких. Интересно, что все три соединения в клетках превращаются в 8-хлораденозин-5'-трифосфат, который и является активным соединением. Повышение уровня 8-хлораденозин-5'-трифосфата вызывает снижение эндогенного пула аденозинтрифосфата, что приводит к ингибированию синтеза РНК [2].

Особый интерес к 8-галогенпроизводным пуриновых нуклеозидов и нуклеотидов обусловлен тем, что атом галогена в положении С-8 пуринового гетероциклического основания легко вступает в реакцию взаимодействия с нуклеофильными реагентами, что позволяет получать пуриновые антиметаболиты, содержащие в своей структуре фрагменты нуклеофильных агентов, относящихся к различным классам органических соединений. Таким образом были синтезированы пуриновые нуклеозиды и нуклеотиды, содержащие в своём составе в положении С8 пуринового гетероциклического основания синтетические и природные аминокислоты, различные гетероциклы, флуоресцентные зонды для их использования в молекулярной биологии, серу-содержащие остатки и т.д. Полученный нуклеофильным замещением 8-аминоаденозин (2) (Рис. 1), в настоящее время привлекает повышенный

интерес исследователей благодаря своей способности превращаться в клетках в 8-аминоаденозин-5'-трифосфат, который оказался эффективным ингибитором транскрипции [3]. Одним из возможных механизмов ингибирования транскрипции является его внедрение в состав мРНК вместо природного аденозинтрифосфата.

Способность к нуклеофильному замещению галогена в положении С-8 пуринов позволила взаимодействием 8-бромаденозина (3) (Рис. 1) с L-цистеином в физиологических условиях осуществить синтез 8-S-L-цистеиниладенозина (4) [4]. Это предполагает вероятность протекания аналогичной реакции с цистеин-содержащими пептидами и белками, в результате чего можно проводить направленную модификацию пептидных или белковых молекул, что приведет к соединениям-гибридам, обладающим особыми структурными, химическими и биологическими свойствами.

Атом галогена в положении С-8 пуринового гетероциклического основания может вступать также в реакции внутримолекулярного нуклеофильного замещения, приводящие к образованию С8-О2'- (5) и С8-О3'- (6) циклических пуриновых арабинофуранозидов или ксилофуранозидов (Рис. 1), соответственно [5]. Такие соединения обладают жесткой фиксированной конформацией и представляют интерес для изучения их химических свойств и биологической активности.

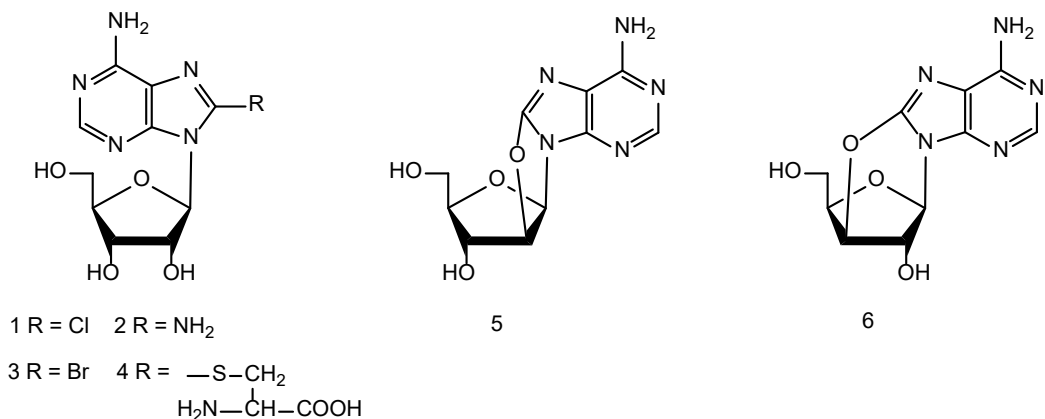


Рис. 1 – Структурные формулы 8-замещенных производных аденозина

Бром производные пуринов служат исходными соединениями и для получения их С8 йодсодержащих аналогов, получение которых прямым йодированием затруднено или вовсе невозможно. Использование радиоактивно меченых бромлирующих реагентов позволяет синтезировать радиоактивно меченые антиметаболиты, использующиеся в медицине в целях диагностики.

Учитывая возможность получения на основе 8-бромаденозина многообразных производных с потенциальной биологической активностью, реакция бромирования пуриновых (а также и пиримидиновых) нуклеозидов и нуклеотидов довольно интенсивно исследована. В зависимости от строения исходного нуклеозида, наличия в нем функциональных групп в гетероциклическом основании и блокирующих групп в углеводном фрагменте, для введения атома брома в положение С8 гетероциклического основания использовались разнообразные реагенты. Наибольшее распространение получили реагенты на основе раствора брома в таких растворителях как вода, четыреххлористый углерод, диметилформамид, смесь уксусной кислоты и пиридина, смесь раствора натрия уксуснокислого и диоксана, а также различные буферные растворы на основе солей фосфорной или уксусной кислот. В качестве доноров брома использовались также N-бромсукцинимид, смесь мета-хлорпербензойной и бромистоводородной кислот, смесь церий аммоний нитрата и лития бромистого в уксусной кислоте или ацетонитриле, смесь калия бромистого и персульфата калия в воде, натриевая соль монобромизоциануровой кислоты в воде и другие реагенты.

Так как атом галогена в положении С8 пуринового гетероциклического основания обладает высокой лабильностью, то реакция бромирования пуриновых производных часто протекает с образованием побочных продуктов неустойчивой структуры. В этой связи целью исследования являлось изучение влияния значения pH среды на выход и чистоту 8-бромаденозина при взаимодействии аденозина с водным раствором брома в воде и натрий ацетатном буфере.

Контроль за протеканием реакции и содержанием исходного аденозина и его 8-бромпроизводного проводился с помощью тонкослойной хроматографии (ТСХ) на пластинках «Kieselgel 60 F₂₅₄» фирмы «Merck» (Германия) в системе растворителей: хлороформ / метанол (4:1 об / об). Визуализация соединений на пластинках ТСХ осуществлялась просмотром их в ультрафиолетовом свете. В качестве дополнительного метода детектирования пятен продуктов на пластинках ТСХ использовали опрыскивание пластинок раствором нафторезорцина в присутствии серной кислоты. Последующее прогревание пластинок в сушильном шкафу при 80–90°C позволяло наблюдать окрашенные в коричневый цвет пятна продуктов, в которых присутствует углеводный фрагмент. Детектирование продуктов реакции с помощью растворов нафторезорцина в присутствии таких сильных неорганических кислот как серная или фосфорная позволяет наблюдать пятна только тех продуктов, которые содержат в своем составе углеводный фрагмент. Использование двух принципиально различных методов детектирования

продуктов на пластинках ТСХ позволяет определять не видимые в ультрафиолетовом свете побочные продукты реакции.

Синтез 8-бромаденозина проводили при комнатной температуре согласно приведенной ниже схеме реакции (Рис. 2).

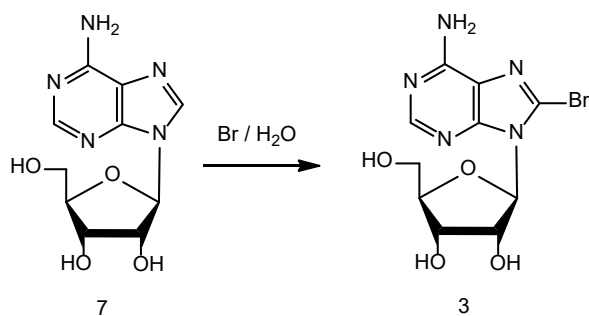


Рис. 2 – Схема синтеза 8-бромаденозина (3) из аденозина 7

К раствору аденозина 7 в воде или в соответствующем буферном растворе при интенсивном перемешивании с помощью магнитной мешалки порциями в течение 20–30 минут добавляли полученный предварительно раствор брома в воде. Каждая следующая порция раствора брома в воде добавлялась после обесцвечивания предыдущей добавленной порции раствора брома. Обесцвечивание раствора брома позволяет визуально следить за скоростью реакции. После добавления последней порции реагента реакционную смесь перемешивали в течение 3–4 часов, осуществляя контроль за полнотой протекания реакции с помощью тонкослойной хроматографии. Затем реакционную смесь оставляли на ночь при комнатной температуре. Выпавший кристаллический осадок 8-бромаденозина (3) отфильтровывали на фильтре Шотта и промывали охлажденной до 0–4°C дистиллированной водой с небольшой добавкой раствора натрия бисульфита и этиловым спиртом. Осадок сушили при комнатной температуре на воздухе и далее в вакууме до постоянного веса. Полученный осадок, содержащий по данным ТСХ, следовые количества исходного аденозина, перекристаллизовывали из горячей дистиллированной воды с небольшой добавкой раствора натрия бисульфита, который необходим для удаления остаточных следов брома и обесцвечивания раствора. Для полноты кристаллизации продукта раствор выдерживали в холодильнике в течение 16–20 часов. Образовавшийся мелкокристаллический тяжелый осадок отфильтровывали, промывали на фильтре охлажденной дистиллированной водой, этиловым спиртом и высушивали при комнатной температуре на воздухе и далее в вакууме до постоянного веса. Конечный выход 8-бромаденозина, не содержащего следов исходного соединения и побочных продуктов составлял 34–70%. Синтезированный 8-бромаденозин по всем параметрам совпадал с заводским образцом сравнения. Выход продуктов реакции в зависимости от значения pH среды представлен в таблице 1.

Пример 1. Синтез 8-бромаденозина (3) в натрий ацетатном буфере с pH 4,3.

Аденозин 7 (1 г, 3,74 ммоль) растворяли при нагревании в 50 мл натрий ацетатного буфера с pH 4,3 и затем охлаждали до комнатной температуры. К полученному раствору при интенсивном перемешивании с помощью магнитной мешалки порциями в течение 20–30 минут добавляли свежеприготовленный раствор брома (0,72 г, 4,50 ммоль, 0,23 мл) в 20 мл воды. Полученную реакционную смесь перемешивали при комнатной температуре 3–4 часа, в течение которых в реакционной смеси выпадал осадок продукта. Реакционную смесь оставляли на ночь в холодильнике, осадок отфильтровывали, промывали на фильтре ледяной водой (3×2 мл) и этиловым спиртом (2×3 мл). Осадок 8-бромаденозина (3) сушили до постоянного веса при комнатной температуре, а затем в вакууме. Получали 1,0 г (77 %) 8-бромаденозина в виде кристаллического порошка малинового цвета. Осадок перекристаллизовывали из кипящей дистиллированной воды с добавкой раствора натрия бисульфита для получения бесцветного раствора. Раствор выдерживали в холодильнике в течение 18–20 часов, отфильтровывали, промывали на фильтре холодной дистиллированной водой (2×2 мл) и этиловым спиртом (2×3 мл). Полученный тяжелый мелкокристаллический порошок продукта сушили при комнатной температуре на воздухе, а затем в вакууме до постоянного веса. Получали 0,9 г (90 %) 8-бромаденозина. Суммарный выход продукта составлял 70 %. UV (pH 1): $\lambda_{max} = 264 \text{ nm}$.

Пример 2. Синтез 8-бромаденозина (3) в натрий ацетатном буфере с pH 4,7 и pH 5,3.

Синтез 8-бромаденозина (3) осуществляли по методике, описанной в примере 1. Выход продукта реакции составлял 0,6 г (47 %) до перекристаллизации и 0,5 г (42 %) после перекристаллизации в случае системы с pH 4,7. При pH 5,3 выход продуктов составлял 0,56 г (43 %) и 0,3 г (39 %) до и после перекристаллизации, соответственно.

Пример 3. Синтез 8-бромаденозина (3) воде с pH 7

Аденозин 7 (1 г, 3,74 ммоль) растворяли при нагревании в 50 мл воды с pH 7, раствор охлаждали и порциями добавляли к нему свежеприготовленный раствор брома (0,72 г, 4,50 ммоль, 0,23 мл) в 20 мл воды. Реакционную смесь перемешивали при комнатной температуре с помощью магнитной мешалки в течение 3–4 часов. Затем

через окрашенный раствор продували воздух в течение 1–2 часов для удаления из раствора остатков брома. Реакционную смесь нейтрализовали раствором натрия бикарбоната с последующим добавлением раствора натрия бисульфита. Образовавшуюся суспензию выдерживали в холодильнике в течение 18–20 часов, и отфильтровывали выпавший осадок. Дальнейшее выделение 8-бромаденозина проводили так, как описано в примере 1. Выход 8-бромаденозина составлял 0,49 г (38 %) до и 0,15 г (34 %) после перекристаллизации, соответственно.

Таблица 1 – Выход 8-бромаденозина (3) в зависимости от pH реакционной среды

№	pH	Выход продукта до перекристаллизации, г / %	Суммарный выход продукта после перекристаллизации, г / %
1	4.3	1 / 90	0.9 / 70
2	4.7	0.6 / 47	0.5 / 42
3	5.3	0.56 / 43	0.3 / 39
4	7	0.49 / 38	0.15 / 34

Таким образом, в результате выполненного исследования было установлено, что использование натрия ацетатного буфера с pH 4,3 является оптимальным для получения 8-бромаденозина реакцией бромирования аденозина с помощью раствора брома в воде.

ЛИТЕРАТУРА

1. *Shelton J.* Metabolism, biochemical actions, and chemical synthesis of anticancer nucleosides, nucleotides, and base analogs / Shelton J [et al.] // *Chemical Reviews*. 2016;116:14379–14455.
2. *Gandi V.* 8-Chloro-cAMP and 8-chloro-adenosine act by the same mechanism in multiple myeloma cells // *Gandi V* [et al.] // *Cancer Research*. 2001;61:5474–5479.
3. *Frey JA.* 8-Amino-adenosine inhibits multiple mechanisms of transcription / Frey JA, Gandi V // *Molecular Cancer Therapeutics*. 2010;9:1:236–245.
4. *Suzuki T.* Formation of 8-S-L-cysteinyladenosine from 8-bromoadenosine and cysteine / Suzuki T [et al.] // *Chem. Pharm. Bull.* 2018;66:2:184–187.
5. *Mieczkowski A.* Preparation of cyclonucleosides / Mieczkowski A, Roy V, Agrofoglio LA // *Chemical Reviews*. – 2010;110:1828–1856.

МЕТОДИЧЕСКИЕ ПОДХОДЫ К ПОЛУЧЕНИЮ ПЕРВИЧНЫХ КУЛЬТУР АЛЬВЕОЛЯРНЫХ ЭПИТЕЛИАЛЬНЫХ КЛЕТОК METHODOLOGICAL APPROACHES FOR ALVEOLAR EPITHELIAL CELL PRIMARY CULTURES OBTAINING

А. А. Царик, М. А. Кохнюк, П. В. Альховик, М. Ю. Юркевич
A. A. Tsarik, M. A. Kokhnyuk, P. V. Alkhovik, M. Yu. Yurkevich

Белорусский государственный университет, МГЭИ им. А. Д. Сахарова БГУ,
г. Минск, Республика Беларусь
marja4567@gmail.com
Belarusian State University, ISEI BSU, Minsk, Republic of Belarus

Проведена оценка эффективности использования различных протеолитических ферментов для дезагрегации ткани легких и представлен оптимизированный метод выделения альвеолярных эпителиоцитов, включающий механическую дезагрегацию ткани с последующей обработкой полученных эксплантов 0,25% раствором трипсина в сочетании с фильтрованием клеточной суспензии через поры диаметром 100 мкм и 50 мкм. Полученные культуры клеток характеризовались высокой жизнеспособностью (более 91%) и морфологической гетерогенностью. Наряду с активно делящимися округлыми клетками, визуализировались дифференцированные альвеолярные эпителиоциты с кубовидной или полигональной морфологией, характеризующиеся высокой секреторной активностью.

Evaluation of various proteolytic enzymes efficiency for disaggregation of lung tissue is carried out and an optimized method for alveolar epithelial cells isolation is presented. This method includes mechanical disaggregation of tissue followed by processing of explanations with 0.25% trypsin solution in combination with filtration of the cell suspension through pores with a diameter of 100 µm and 50 µm. The obtained cell cultures were characterized by high viability (more than 91%) and morphological heterogeneity. Along with actively dividing rounded cells,