

УДК 615.03:547.99

<https://doi.org/10.30895/2312-7821-2023-11-2-341>

Оригинальная статья | Original article



Производные тиурониевых солей на основе вицинальных диаминов как потенциальные нейропротекторы

Н.А. Лозинская^{1,2,✉}, А.А. Морозов¹, Д.Р. Базанов¹, Е.Р. Милаева^{1,2}, Д.А. Арешидзе³,
П.Н. Шевцов², Л.Н. Петрова², Е.Ф. Шевцова²

¹ Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова»
Ленинские горы, д. 1, стр. 3, Москва, 119991, Российская Федерация

² Институт физиологически активных веществ Федерального государственного бюджетного учреждения науки «Федеральный исследовательский центр проблем химической физики и медицинской химии Российской академии наук» (ИФВ РАН),
Северный проезд, д. 1, Московская область, г. Черноголовка, 142432, Российская Федерация

³ Научно-исследовательский институт морфологии человека имени академика А.П. Авцына
Федерального государственного бюджетного научного учреждения
«Российский научный центр хирургии имени академика Б.В. Петровского»,
ул. Цюрупы, д. 3, Москва, 117418, Российская Федерация

✉ Контактное лицо: Лозинская Наталья Александровна natalylozinskaya@mail.ru

РЕЗЮМЕ

Применяемые в клинической практике лекарственные средства для лечения нейродегенеративных заболеваний, в частности болезни Альцгеймера, в основном обладают компенсаторным усиливающим нейротрансмиттерный сигнал механизмом действия. Поиск новых препаратов, сочетающих когнитивно-стимулирующий, нейропротекторный и болезнь-специфический эффекты благодаря мультитаргетному механизму действия, в частности включающему предотвращение глутамат-индуцированного захвата кальция нейронами и стабилизацию микротрубочек, представляется актуальной задачей.

Цель работы: поиск потенциальных лекарственных средств с нейропротекторным и корректирующим таупатию потенциалом в ряду новых тиурониевых солей на основе вицинальных диаминов.

Материалы и методы: изучена способность тиурониевых солей, новых производных тиомочевин, блокировать глутамат-индуцированный захват $^{45}\text{Ca}^{2+}$ синапсосомами мозга крыс линии Wistar. Проведена оценка влияния новых соединений на полимеризацию препарата тубулина и микротубулоассоциированных белков из мозга мышей линии C57bl в присутствии гуанозинтрифосфата по специфическому изменению светопоглощения при 355 нм, вызванному образованием микротрубочек (внутриклеточных структур, входящих в состав цитоскелета). Структуру образовавшихся микротрубочек анализировали после негативного контрастирования с помощью просвечивающей электронной микроскопии. Определение IC_{50} новых соединений и статистическую обработку результатов проводили с помощью стандартных программ (Excel и PRIZM GraphPad 6.02).

Результаты: разработан алгоритм скрининга ряда новых производных тиурониевых солей на основе вицинальных диаминов и проведено изучение их биологической активности в тестах по влиянию на глутамат-индуцированный захват кальция синапсосомами и на процессы сборки микротрубочек. Выявлены соединения, способные подавлять глутамат-индуцированный захват кальция синапсосомами, то есть обладающие нейропротекторным потенциалом. Для ряда новых соединений обнаружена способность стимулировать процессы ГТФ-зависимой сборки микротрубочек. Обнаружено соединение – гидробромид изопропил-*N'*-[2-(бензоиламино)-1,2-дифенилэтил]-*N*-этилимидитиокарбамата, – в присутствии которого наблюдается образование микротрубочек нормальной структуры, что делает его перспективной основой для дальнейшей структурной оптимизации.

© Н.А. Лозинская, А.А. Морозов, Д.Р. Базанов, Е.Р. Милаева, Д.А. Арешидзе, П.Н. Шевцов, Л.Н. Петрова, Е.Ф. Шевцова, 2023

Выводы: результаты проведенного исследования позволяют сделать вывод о перспективности химической модификации тиурониевых солей для создания эффективных нейропротекторов и стабилизаторов микротрубочек.

Ключевые слова: тиурониевые соли; вицинальные диамины; микротрубочки; эксайтотоксичность; нейропротекция; таупатия; болезнь Альцгеймера; доклинические исследования

Для цитирования: Лозинская Н.А., Морозов А.А., Базанов Д.Р., Милаева Е.Р., Арешидзе Д.А., Шевцов П.Н., Петрова Л.Н., Шевцова Е.Ф. Производные тиурониевых солей на основе вицинальных диаминов как потенциальные нейропротекторы. *Безопасность и риск фармакотерапии*. 2023;11(2):165–175. <https://doi.org/10.30895/2312-7821-2023-11-2-341>

Thiouronium Salt Derivatives Based on Vicinal Diamines as Potential Neuroprotectors

N.A. Lozinskaya^{1,2,✉}, A.A. Morozov¹, D.R. Bazanov¹, E.R. Milaeva^{1,2}, D.A. Areshidze³, P.N. Shevtsov², L.N. Petrova², E.F. Shevtsova²

¹ M.V. Lomonosov Moscow State University
1/3 Leninskie Gory, Moscow 119991, Russian Federation

² Institute of Physiologically Active Compounds at Federal Research Center of Problems of Chemical Physics and Medicinal Chemistry, Russian Academy of Sciences (IPAC RAS)
1 Severny Dr., Chernogolovka, Moscow Region 142432, Russian Federation

³ Avtsyn Research Institute of Human Morphology of Federal State Budgetary Scientific Institution “Petrovsky National Research Centre of Surgery”
3 Tsyurupa St., Moscow 117418, Russian Federation

✉ Corresponding author: **Natalia A. Lozinskaya** natalylozinskaya@mail.ru

ABSTRACT

Most of the medicinal products that are currently approved and used in clinical practice for neurodegenerative diseases, in particular Alzheimer's disease, have a compensatory mechanism of action that enhances neurotransmitter signalling. It is an urgent need to develop new medicinal products combining cognitive-enhancing, neuroprotective, and disease-specific effects resulting from a multi-target mechanism of action including, in particular, prevention of glutamate-induced neuronal calcium uptake and stabilisation of microtubules.

The aim of this study was to search for potentially neuroprotective and tauopathy-alleviating medicines amongst new thiouronium salt derivatives based on vicinal diamines.

Materials and methods. The study investigated the ability of thiouronium salts to block glutamate-induced $^{45}\text{Ca}^{2+}$ uptake by synaptosomes prepared from the brain of Wistar rats. The authors evaluated effects of these new compounds on polymerisation of a preparation of C57bl mouse brain tubulin and microtubule-associated proteins. The evaluation was carried out in the presence of guanosine triphosphate (GTP) and based on specific absorbance changes at 355 nm due to formation of microtubules. The authors analysed the structure of these microtubules, using negative staining followed by transmission electron microscopy. The IC_{50} determination and the statistical analysis were performed using standard software (Excel and PRISM 6.02).

Results. The authors developed a screening algorithm for a number of new thiouronium salt derivatives based on vicinal diamines and studied biological activity of these derivatives by the effects on glutamate-induced calcium uptake by synaptosomes and on microtubule assembly processes. The authors identified compounds suppressing glutamate-induced calcium uptake by synaptosomes, i.e. compounds with neuroprotective potential. In addition, a number of new compounds were able to stimulate GTP-dependent microtubule assembly processes. The authors observed formation of microtubules with a normal structure in the presence of isopropyl-*N'*-[2-(benzoylamino)-1,2-diphenylethyl]-*N*-ethylimidothiocarbamate hydrobromide and considered the compound a promising scaffold for further optimisation.

Conclusions. Chemical modification of thiouronium salts is a promising direction for developing effective neuroprotectors and microtubule stabilisers.

Key words: thiouronium salts; thiourea; vicinal diamines; microtubules; excitotoxicity; neuroprotection; tauopathy; Alzheimer's disease; preclinical studies

For citation: Lozinskaya N.A., Morozov A.A., Bazanov D.R., Milaeva E.R., Areshidze D.A., Shevtsov P.N., Petrova L.N., Shevtsova E.F. Thiouronium salt derivatives based on vicinal diamines as potential neuroprotectors. *Safety and Risk of Pharmacotherapy*. 2023;11(2):165–175. <https://doi.org/10.30895/2312-7821-2023-11-2-341>

Введение

Ряд нейродегенеративных патологий, таких как мозговая ишемия, болезнь Альцгеймера, боковой амиотрофический склероз, сопровождается избыточной выработкой эндогенного глутамата в пресинаптических окончаниях, что оказывает токсическое действие на нейроны. Механизм эксайтотоксичности, которую определяют как нарушение функционирования и гибель нейронов в результате пролонгированного или избыточного воздействия возбуждающих аминокислот, в частности глутамата, в значительной степени связан с нарушением гомеостаза кальция внутри нейронов, приводящего к развитию ряда патологических процессов в нервной клетке [1]. Поиск ингибиторов глутамат-стимулированного входа кальция в нейроны может рассматриваться как перспективный подход к разработке новых нейропротекторов.

В последнее время значительное внимание уделяется разработке так называемых «болезнь-модифицирующих» препаратов как перспективных лекарственных средств, в том числе при тяжелых неврологических заболеваниях [2]. Одним из таких направлений является создание стабилизаторов микротрубочек — внутриклеточных структур, входящих в состав цитоскелета, — способных компенсировать возрастающую при таупатии деполимеризацию микротрубочек. Агрегаты гиперфосфорилированного тау-белка являются основным компонентом характерных для болезни Альцгеймера нейрофибриллярных пучков. Компенсация лекарственными препаратами утраченной в результате патологического гиперфосфорилирования и агрегации способности тау-белка стабилизировать структуру микротрубочек может обеспечить нормализацию аксонального транспорта в нейронах, способствовать росту аксонов [3].

Тиуриониевые и изотиуриониевые соли (производные тиомочевин) представляют интерес как фармакологически активные соединения благодаря уникальной структуре, определяющей, с одной стороны, растворимость в воде за счет

полярной солевой структуры, а с другой — обеспечивающей биологическую активность за счет липофильных фармакофорных заместителей. Благодаря высокой вариативности структурных модификаций тиуриониевые соли проявляют широкий спектр биологической активности [4]. Среди них можно выделить ингибиторы NO-синтазы [5, 6], соединения, обладающие антимикробным [6, 7], противоопухолевым действием [8–11], ингибиторы H₂- и H₃-гистаминных рецепторов [12, 13]. Производные тиомочевин способны образовывать стабильные комплексы с ионами различных металлов. Со способностью производных тиомочевин к комплексообразованию с щелочноземельными металлами, вероятно, связано их влияние на натрий-кальциевый обмен в клетках [14, 15]. Для ряда производных тетразамещенных тиуриониевых солей была показана способность ингибировать активность NMDA-подтипа глутаматных рецепторов и одновременно активировать AMPA-подтип глутаматных рецепторов, что может обуславливать когнитивно-стимулирующие свойства таких соединений [16].

Цель работы — поиск потенциальных лекарственных средств с нейропротекторным и таупатия-корректирующим потенциалом в ряду новых производных тиуриониевых солей на основе вицинальных диаминов.

Материалы и методы

Синтез тиуриониевых солей на основе производных вицинальных диаминов. Производные тиуриониевых солей были синтезированы в четыре стадии в соответствии со схемой, представленной на рисунке 1. Реакцией бензальдегида с ацетатом аммония с последующим кислотным гидролизом был получен N-(2-амино-1,2-дифенилэтил)бензамид в соответствии с методикой, описанной в работе [17]. Далее реакцией с этил- и фенилизотионами, выбранными в качестве модельных, синтезированы тиомочевинны, которые были проалкилированы с образованием тиуриониевых солей¹. Соединения, исследованные в работе, представлены в таблице 1.

¹ Лозинская НА. Синтетический дизайн в реакции ароматических альдегидов с аммиаком: дис. ... канд. хим. наук. М.; 2003.

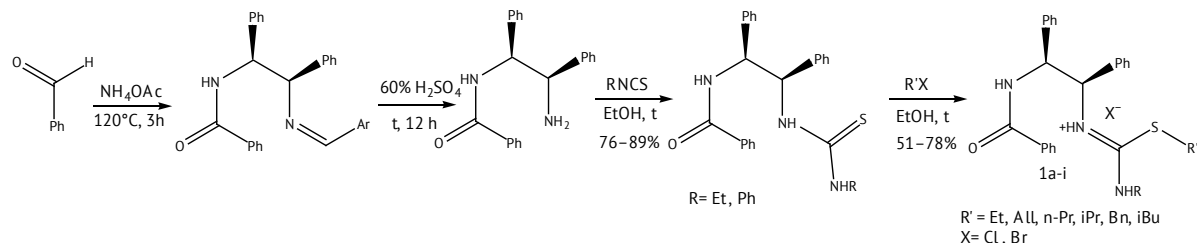


Рис. 1. Синтез новых производных тиурониевых солей на основе вицинальных диаминов. Ar — арил; Ph — фенил; Et — этил; All — аллил; Bn — бензил; nPr — n-пропил; iBu — изобутил; iPr — изопропил

Fig. 1. Synthesis of new thiuronium salt derivatives based on vicinal diamines. Ar, aryl; Ph, phenyl; Et, ethyl; All, allyl; Bn, benzyl; nPr, n-propyl; iBu, isobutyl; iPr, isopropyl

Таблица 1. Производные тиурониевых солей, исследованные в работе

Table 1. Thiuronium salt derivatives studied

Название соединения <i>Name of the compound</i>	Код соединения <i>Code of the compound</i>	Заместители <i>Substituents</i>
Этил-N'-[2-(бензоиламино)-1,2-дифенилэтил]-N-этилимидотиокарбамат гидробромид <i>Ethyl-N'-[2-(benzoylamino)-1,2-diphenylethyl]-N-ethylimidothiocarbamate hydrobromide</i>	1a	Ar = Ph, R = Et, R' = Et, X = Br
Аллил-N'-[2-(бензоиламино)-1,2-дифенилэтил]-N-этилимидотиокарбамат гидробромид <i>Allyl-N'-[2-(benzoylamino)-1,2-diphenylethyl]-N-ethylimidothiocarbamate hydrobromide</i>	1b	Ar = Ph, R = Et, R' = All, X = Br
Бензил-N'-[2-(бензоиламино)-1,2-дифенилэтил]-N-этилимидотиокарбамат гидрохлорид <i>Benzyl-N'-[2-(benzoylamino)-1,2-diphenylethyl]-N-ethylimidothiocarbamate hydrochloride</i>	1c	Ar = Ph, R = Et, R' = Bn, X = Cl
n-Пропил-N'-[2-(бензоиламино)-1,2-дифенилэтил]-N-этилимидотиокарбамат гидробромид <i>n-Propyl-N'-[2-(benzoylamino)-1,2-diphenylethyl]-N-ethylimidothiocarbamate hydrobromide</i>	1d	Ar = Ph, R = Et, R' = nPr, X = Br
Изобутил-N'-[2-(бензоиламино)-1,2-дифенилэтил]-N-этилимидотиокарбамат гидробромид <i>Isobutyl-N'-[2-(benzoylamino)-1,2-diphenylethyl]-N-ethylimidothiocarbamate hydrobromide</i>	1e	Ar = Ph, R = Et, R' = iBu, X = Br
Изопропил-N'-[2-(бензоиламино)-1,2-дифенилэтил]-N-этилимидотиокарбамат гидробромид <i>Isopropyl-N'-[2-(benzoylamino)-1,2-diphenylethyl]-N-ethylimidothiocarbamate hydrobromide</i>	1f	Ar = Ph, R = Et, R' = iPr, X = Br
Пропил-N'-[2-(бензоиламино)-1,2-дифенилэтил]-N-фенилимидотиокарбамат гидробромид <i>Propyl-N'-[2-(benzoylamino)-1,2-diphenylethyl]-N-phenylimidothiocarbamate hydrobromide</i>	1g	Ar = Ph, R = Ph, R' = nPr, X = Br
Этил-N'-[2-(бензоиламино)-1,2-дифенилэтил]-N-фенилимидотиокарбамат гидробромид <i>Ethyl-N'-[2-(benzoylamino)-1,2-diphenylethyl]-N-phenylimidothiocarbamate hydrobromide</i>	1h	Ar = Ph, R = Ph, R' = Et, X = Br
Изопропил-N'-[2-(бензоиламино)-1,2-дифенилэтил]-N-фенилимидотиокарбамат гидробромид <i>Isopropyl-N'-[2-(benzoylamino)-1,2-diphenylethyl]-N-phenylimidothiocarbamate hydrobromide</i>	1i	Ar = Ph, R = Ph, R' = iPr, X = Br

Примечание. Ar — арил; Ph — фенил; Et — этил; All — аллил; Bn — бензил; nPr — n-пропил; iBu — изобутил; iPr — изопропил.

Note. Ar, aryl; Ph, phenyl; Et, ethyl; All, allyl; Bn, benzyl; nPr, n-propyl; iBu, isobutyl; iPr, isopropyl.

Лабораторные животные. В эксперименте были использованы 9–10-дневные новорожденные крысы линии Wistar и 2–3-месячные мыши линии C57bl, полученные из питомника филиала «Столбовая» ФГБУН «Научный центр биомедицинских технологий ФМБА». Используемые в исследовании манипуляции

с животными были одобрены на заседании биоэтической комиссии ИФАВ РАН, протокол заседания от 29.11.2019 № 41.

Животных содержали в стандартных условиях в соответствии с Директивой 2010/63/EU Европейского парламента и совета Европейского союза от 22.09.2010 по охране животных,

используемых в научных целях, и в соответствии с санитарно-эпидемиологическими правилами СП 2.2.1.3218-14.

Изучение влияния производных тиурониевых солей на глутамат-индуцируемый захват кальция синапсами. Р2-фракцию синапсом выделяли из мозга 9–10-дневных новорожденных крыс линии Wistar по стандартной методике Хайоша [18]. Первичный скрининг влияния соединений на индуцированную 200 мкМ глутаминовой кислотой стимуляцию глутаматных рецепторов и последующий захват радиоизотопа кальция $^{45}\text{Ca}^{2+}$ синапсами проводили при стандартной концентрации тестируемого вещества 100 мкМ согласно описанному ранее методу [19].

Для соединений, которые при концентрации 100 мкМ ингибировали захват $^{45}\text{Ca}^{2+}$ в синапсомы коры мозга более чем на 50%, была изучена концентрационная зависимость их влияния на глутамат-индуцированный захват $^{45}\text{Ca}^{2+}$ синапсами и определена IC_{50} — концентрация вещества, при которой происходит 50%-ингибирование глутамат-индуцированного захвата $^{45}\text{Ca}^{2+}$. Расчет IC_{50} проводили с помощью программы Prism 6.02 (GraphPad, США).

Оценка влияния соединений на полимеризацию тубулина и микротубулоассоциированных белков (МАБ) и структуру полученных микротрубочек. Кору мозга мышей линии C57bl выделяли на холоде сразу после цервикальной трансекции. Свежий мозг помещали на лед, очищали от оболочек и кровеносных сосудов и промывали охлажденным буфером «А»: 50 мМ Tris-HCl, (pH = 6,9), 2 мМ EGTA (этиленгликоль-бис (β-амино-этиловый эфир)-N,N,N',N'-тетрауксусная кислота). Выделенную мозговую ткань гомогенизировали в том же буфере с использованием гомогенизатора Potter S (Sartorius, Германия). Полученный гомогенат центрифугировали при 10000 g в течение 30 мин на центрифуге Avanti 25 (Beckman Coulter, США), ротор JA-14 для осаждения неразрушенных клеток. Полученный осадок отбрасывали, а супернатант центрифугировали повторно при 100000 g в течение 60 мин при температуре 4 °C на ультрацентрифуге Optima MAX XP (Beckman Coulter, США), ротор TLA-120.

Полученный супернатант, представляющий собой цитозольную фракцию, обогащенную тубулином и микротубулоассоциированными белками (Тб+МАБ), использовали для дальнейшей очистки путем проведения цикла сборки-разборки микротрубочек. Для этого суперна-

тант разбавляли буфером «А» до концентрации белка 30 мг/мл и полученный белковый раствор разбавляли в 2 раза буфером «Б»: 50 мМ Tris-HCl (pH = 6,9), 0,2 мМ GTP (гуанозинтрифосфат), 4 мМ MgCl_2 . Далее эту фракцию помещали в термостат при температуре 37 °C на 6 ч для формирования микротрубочек. После окончания срока инкубации супернатант центрифугировали на ультрацентрифуге Optima MAX XP (Beckman), ротор TLA-120, 100000 g, при температуре 28 °C в течение 1 ч для осаждения сформировавшихся микротрубочек. После центрифугирования супернатант отбрасывали, а осадок ресуспендировали в холодном буфере «А», объем которого в 10 раз меньше, чем объем экстракта при инкубации в термостате. Полученную взвесь инкубировали при температуре 0 °C в течение 30–60 мин для деполимеризации полученных микротрубочек. Суспензию, содержащую недеполимеризовавшиеся микротрубочки, растворенные тубулин и МАБ, центрифугировали на ультрацентрифуге Optima MAX XP (Beckman), ротор TLA-120, 100000 g в течение 60 мин при 2–4 °C. Осадок, содержащий недеполимеризовавшиеся микротрубочки, отбрасывали, в супернатанте грубого препарата тубулина и МАБ определяли концентрацию белка методом Бредфорда, используя набор фирмы Био-Рад (Bio-Rad Protein Assay Kit, Bio-Rad, США), в соответствии с протоколом фирмы-изготовителя; аликвоты замораживали в жидком азоте и хранили при температуре –80 °C.

Влияние соединений на гуанозинтрифосфат-зависимую (ГТФ-зависимую) сборку микротрубочек из грубого препарата Тб+МАБ определяли в 384-луночных планшетах согласно методике². Процесс полимеризации исследовали спектрофотометрически, регистрируя изменения во времени светопоглощения суспензии при температуре 30 °C при длине волны $\lambda = 355$ нм на планшетном ридере Wallac 1420 Victor (Perkin Elmer, Финляндия). Значения максимальной скорости изменения светопоглощения ($V_{\max}$) на определенном отрезке времени определяли как производную изменения светопоглощения при длине волны 355 нм (A_{355}) во времени: $V_{\max} = (dA_{355}/dt)_{\max}$ (%) в отсутствие (контрольная проба) или в присутствии исследуемых соединений в концентрации 100 мкМ. Затем эти значения нормализовали: значение 0 соответствовало нулевой скорости изменения светопоглощения, за 100% принимали скорость

² Методика оценки влияния соединений на полимеризацию тубулина. СТП-14.621.21.0008.01-2015. ИФАВ РАН; 2015. https://ipac.ac.ru/docs/ckp/metod_6.pdf

изменения светопоглощения в контрольных пробах, состав которых повторял состав опытных проб, но вместо соединений присутствовал равный объем растворителя диметилсульфоксида (ДМСО; ПанЭко, Россия). Все измерения проведены как минимум в трех повторах. Достоверность различий скоростей полимеризации в присутствии соединений от скоростей в контрольных пробах определяли по непараметрическому критерию Манна–Уитни с использованием программы Prism 6.02 (GraphPad, США). Электронно-микроскопическое исследование структуры образованных микротрубочек проводили методом негативного контрастирования [20] на электронном микроскопе Libra 120 (Carl Zeiss Meditec AG, Германия).

В работе использовали оборудование исследовательской базы «Центр коллективного пользования ИФАВ РАН» (FFSN-2021-0005).

Статистическая обработка результатов и определение IC_{50} методом нелинейной регрессии проведены с использованием программы Prism 6.02 (GraphPad, США).

Результаты и обсуждение

Биологическая активность тиурониевых солей **1a–1i** была изучена на моделях эксайтотоксичности и полимеризации тубулина.

Оценка влияния на глутамат-стимулированный захват ионов кальция в синапсомы. Для первичной оценки нейропротекторных свойств соединений была использована модель эксайтотоксичности *in vitro*, позволяющая оценить способность полученных производных тиурониевых солей ингибировать глута-

мат-стимулированный Ca^{2+} -захват по сравнению с контрольной пробой [18, 19]. В результате первичного скрининга были выделены активные соединения, которые при концентрации 100 мкМ ингибировали захват $^{45}Ca^{2+}$ в синапсомы коры мозга более чем на 50%, затем для этих соединений-лидеров была определена IC_{50} (табл. 2).

Тиурониевые соли **1a–1e**, содержащие этильный заместитель, являлись более эффективными ингибиторами глутамат-стимулированного захвата кальция синапсомы, чем фенильные производные **1g–1i**. Наибольшая биологическая активность была отмечена для соединений, содержащих 3–4 атома углерода в алкильной цепи. Дальнейшее увеличение длины цепи нецелесообразно, так как растворимость подобных производных в воде и буферных растворах резко снижается, что делает проблематичным изучение их биологической активности *in vitro*. Вероятно, с пониженной растворимостью в воде связана и более низкая активность соединений, содержащих повышенное количество ароматических заместителей. Отметим, что замена фенильного заместителя в вицинальном диамине на гетероциклический либо введение в структуру вицинального диамина дополнительных заместителей (например, метокси-групп) снижает активность полученных соединений. Этот факт позволяет предположить, что именно бензиламинный фрагмент играет существенную роль в процессе связывания с глутаматным рецептором и тем самым влияет на ингибирующую способность данных веществ.

Таким образом, было найдено пять соединений, обладающих выраженной способностью

Таблица 2. Влияние производных тиурониевых солей на глутамат-стимулированный захват ионов кальция синапсомы

Table 2. Effects of thiuronium salt derivatives on glutamate-stimulated uptake of calcium ions by synaptosomes

Код соединений <i>Code of the compound</i>	Заместители <i>Substituents</i>	IC_{50} , мкМ <i>IC_{50}, μM</i>
1a	Ar = Ph, R = Et, R' = Et, X = Br	128,8 ± 11,8
1b	Ar = Ph, R = Et, R' = All, X = Br	44,7 ± 7,2
1c	Ar = Ph, R = Et, R' = Bn, X = Cl	40,7 ± 9,4
1d	Ar = Ph, R = Et, R' = nPr, X = Br	24,5 ± 8,6
1e	Ar = Ph, R = Et, R' = iBu, X = Br	19,5 ± 8,1

Примечание. IC_{50} — концентрации вещества, при которой происходит 50%-ное ингибирование глутамат-стимулированного захвата Ca^{2+} , данные представлены как $M \pm SD$ (среднее значение ± стандартное отклонение); Ar — арил; Ph — фенил; Et — этил; All — аллил; Bn — бензил; nPr — *n*-пропил; iBu — изобутил.

Note. IC_{50} is the substance concentration required for 50% inhibition of glutamate-stimulated Ca^{2+} uptake; the data are presented as $M \pm SD$ (mean ± standard deviation). Ar, aryl; Ph, phenyl; Et, ethyl; All, allyl; Bn, benzyl; nPr, *n*-propyl; iBu, isobutyl.

ингибировать глутамат-стимулированный захват ионов кальция (табл. 2). Соединения **1d** и **1e**, IC₅₀ которых составила 24,5 и 19,5 мкМ соответственно, могут быть использованы для дальнейшей разработки новых нейропротекторов на их основе.

Оценка влияния производных тиурониевых солей на полимеризацию грубого препарата тубулина и МАБ, а также на структуру полученных микротрубочек. Первичный скрининг потенциальных стабилизаторов микротрубочек среди полученных соединений проводили *in vitro* в системе ГТФ-зависимой полимеризации препарата тубулина и МАБ согласно методике [20]. Была показана способность четырех производных тиурониевых солей этилендиаминов в концентрации 0,1 мМ стимулировать ГТФ-зависимую полимеризацию (рис. 2).

В контрольной пробе (1% раствор ДМСО в отсутствие добавок производных тиурониевых солей) наблюдался практически линейный рост светопоглощения при длине волны 355 нм в течение 2 ч (рис. 2, табл. 3), что является маркером процесса полимеризации. Такая же линейная зависимость наблюдалась и для пробы с соединением **1f**, содержащим три фенильных заместителя, но при этом максимальная скорость полимеризации превышала скорость полимеризации в контрольной пробе почти в 1,5 раза. В то же время для соединений **1g**, **1h** и **1i**, содержащих четыре фенильных заместителя, кинетика процесса полимеризации, наблюдаемая

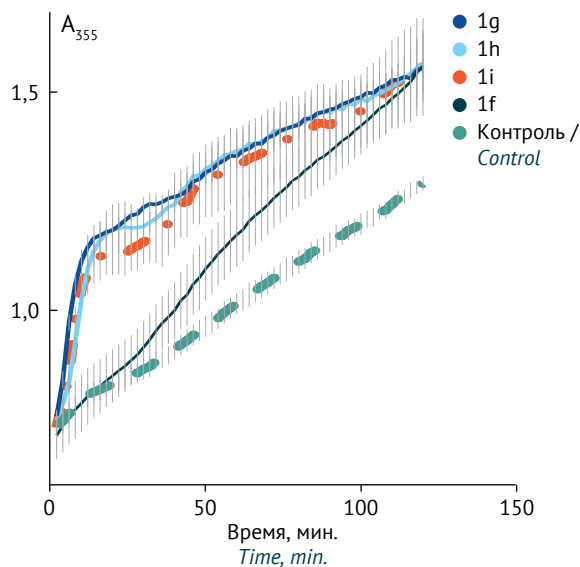


Рис. 2. Влияние производных тиурониевых солей **1f**, **1g**, **1h**, **1i** на полимеризацию препарата тубулина и микротубулоассоциированных белков при концентрации соединений 100 мкМ. A₃₅₅ — светопоглощение при длине волны 355 нм; данные представлены как M ± SD (среднее значение ± стандартное отклонение), область стандартных отклонений обозначена штриховкой

Fig. 2. Effects of thiouronium salt derivatives **1f**, **1g**, **1h**, and **1i** (100 μM) on polymerisation of a preparation of tubulin and microtubule-associated proteins. A₃₅₅ denotes absorbance at 355 nm. The data are presented as M ± SD (mean ± standard deviation); the SD area is hatched

Таблица 3. Влияние активных производных тиурониевых солей **1f–1i** на скорость полимеризации препарата тубулина и микротубулоассоциированных белков при концентрации соединений 100 мкМ

Table 3. Effects of active thiouronium salt derivatives **1f–1i** at 100 μM concentrations on the polymerisation rate of a preparation of tubulin and microtubule-associated proteins

Код соединения <i>Code of the compound</i>	Заместители <i>Substituents</i>	Скорость полимеризации, dA ₃₅₅ /dt (% от контроля) <i>Polymerisation rate, dA₃₅₅/dt (% of the control)</i>	
		2–12 мин <i>2–12 min</i>	50–70 мин <i>50–70 min</i>
1f	Ar = Ph, R = Et, R' = iPr, X = Br	118 ± 22	143 ± 10**
1g	Ar = Ph, R = Ph, R' = nPr, X = Br	574 ± 16***	75 ± 9*
1h	Ar = Ph, R = Ph, R' = Et, X = Br	484 ± 39***	67 ± 4**
1i	Ar = Ph, R = Ph, R' = iPr, X = Br	522 ± 106**	73 ± 9*

Примечание. Данные представлены как M ± SD (среднее значение ± стандартное отклонение, число измерений n = 3; Ar — арил; Ph — фенил; Et — этил; iPr — изопропил, nPr — n-пропил.

* уровень значимости p ≤ 0,05, тест Манна–Уитни; ** p ≤ 0,01, тест Манна–Уитни; *** p ≤ 0,001, тест Манна–Уитни.

Note. The data are presented as M ± SD (mean ± standard deviation); n = 3 (number of measurements). Ar, aryl substituent; Ph, phenyl; Et, ethyl; iPr, isopropyl; nPr, n-propyl.

* p ≤ 0.05 (probability level), Mann-Whitney test; ** p ≤ 0.01, Mann-Whitney test; *** p ≤ 0.001, Mann-Whitney test.

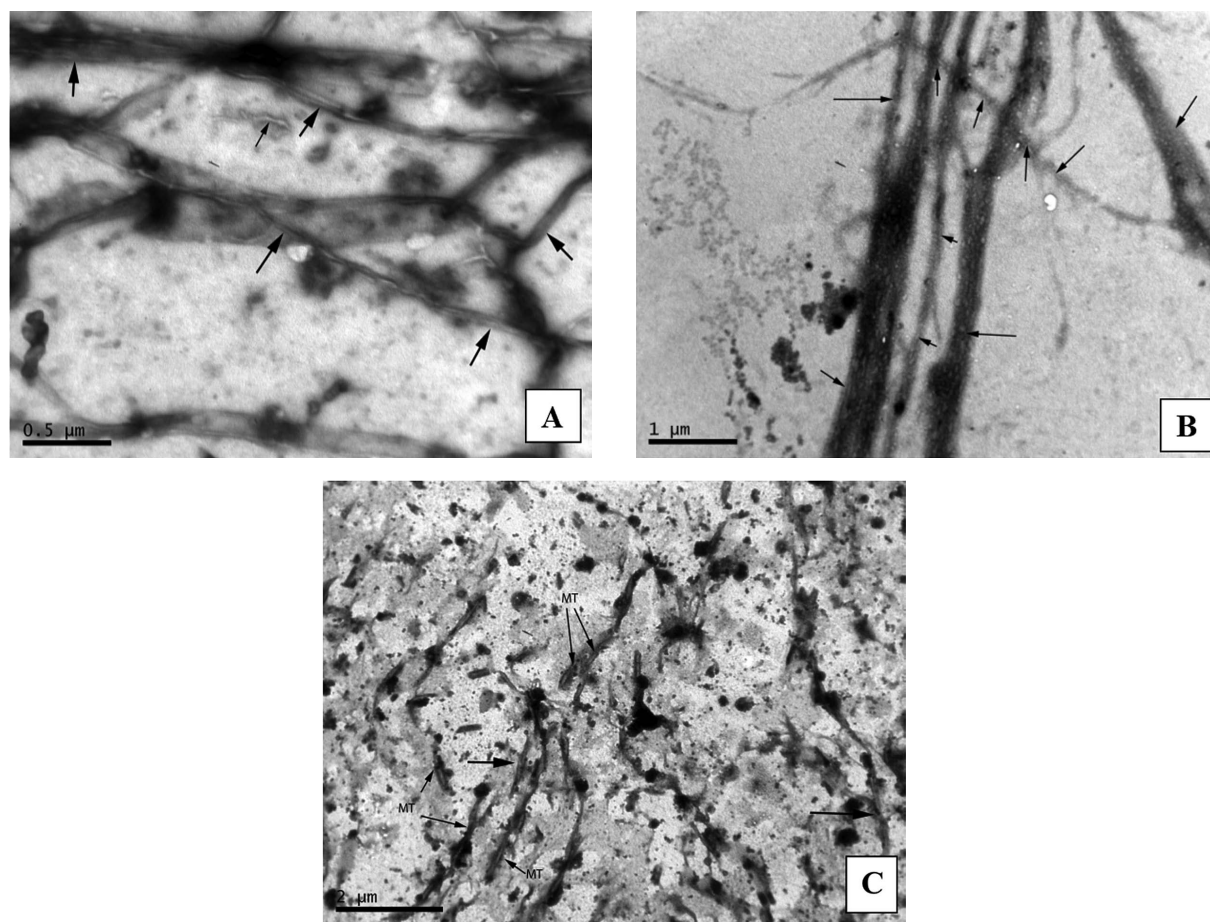


Рис. 3. Электронные микрофотографии структур, образованных в результате полимеризации *in vitro* препарата тубулина и микротубулоассоциированных белков в контрольной пробе в отсутствие производных тиуриновых солей (А), в присутствии соединений **1f** (В) и **1g** (С) в концентрации 100 мкМ. Стрелками обозначены микротрубочки (MT). Трансмиссионную электронную микроскопию ($\times 10000$) проводили после полимеризации тубулина *in vitro*

Fig. 3. Electron micrographs of structures formed as a result of *in vitro* polymerisation of a preparation of tubulin and microtubule-associated proteins in a control sample (A) and in the presence of 100 μM of **1f** (B) or **1g** (C). Microtubules (MT) are indicated with arrows. Transmission electron microscopy ($\times 10,000$) was performed after *in vitro* tubulin polymerisation

на временном промежутке 2 ч, происходила в два этапа: на начальном этапе (до 12 мин) скорость полимеризации более чем в 5 раз превышала контроль, на втором этапе скорость полимеризации была незначительно ниже таковой в контрольной пробе.

Важным этапом работы явилось электронно-микроскопическое исследование с использованием негативного контрастирования [21] структур, образованных в результате полимеризации препарата тубулина и МАБ агрегатов (рис. 3). В контрольной пробе (рис. 3А) видны длинные, достаточно ровные и местами заметно лежащие попарно микротрубочки. Это соответствует нормальной структуре

микротрубочек. В пробе с этильным производным **1f** с линейным нарастанием агрегатов (рис. 3В) наряду с нормальными микротрубочками видны спутанные (перекрученные) пучки нормальных по длине микротрубочек. В пробе с соединением **1g** (рис. 3С) видны короткие фрагменты микротрубочек, некоторые микротрубочки скручены попарно (на рисунке показаны толстыми стрелками). Таким образом, при введении соединения **1g** наблюдается грубое нарушение стандартной структуры микротрубочек. При введении в пробу соединений **1h**, **1i** также отмечено образование аномальных структур – пучков, sheet-структур, сетеподобных структур.

Таким образом, в ряду синтезированных нами производных тиурониевых солей выделены соединения, обладающие способностью стимулировать полимеризацию тубулина. Электронно-микроскопическое исследование методом негативного контрастирования получаемых в результате ГТФ-зависимой полимеризации структур показало, что при введении в пробу соединений **1g**, **1h**, **1i** с четырьмя фенильными заместителями образуются структуры микротрубочек аномального строения. Это не позволяет однозначно считать такие соединения перспективными для дальнейшей разработки на их основе лекарственных препаратов для лечения таупатий. В то же время в пробе с соединением **1f** (изопропил-*N'*-[2-(бензоиламино)-1,2-дифенилэтил]-*N*-этилимидотиокарбамат гидробромид) формируются микротрубочки нормальной структуры наряду с образованием агрегатов в виде пучков. Можно предположить, что это соединение или его производные могут быть потенциальными стабилизаторами микротрубочек в условиях таупатии.

Заключение

Проведено изучение биологической активности новых производных тиурониевых солей на основе вицинальных диаминов в тестах повлияния на глутамат-индуцированный захват кальция синапсосомами и на процессы сборки микротрубочек. Показано, что гидробромиды аллил-, бензил-, изобутил- и *n*-пропил-*N'*-[2-(бензоиламино)-1,2-дифенилэтил]-*N*-этилимидотиокарбаматов способны подавлять глутамат-индуцированный захват кальция синапсосомами, то есть обладают нейропротекторным потенциалом. Для ряда новых соединений обнаружена способность стимулировать процессы ГТФ-зависимой сборки микротрубочек. Выделено соединение-хит (изопропил-*N'*-[2-(бензоиламино)-1,2-дифенилэтил]-*N*-этилимидотиокарбамат гидробромид), в присутствии которого наблюдалось образование микротрубочек нормальной структуры, что делает его перспективной основой для дальнейшей оптимизации.

Литература / References

1. Binignat O, Olloquequi J. Excitotoxicity as a target against neurodegenerative processes. *Curr Pharm Des.* 2020;26(12):1251–62. <https://doi.org/10.2174/1381612826666200113162641>
2. Bachurin SO, Bovina EV, Ustyugov AA. Current trends in the development of drugs for the treatment of Alzheimer's disease and their clinical trials. *Biomedical Chemistry: Research and Methods.* 2018;1(3):e00015. <https://doi.org/10.18097/BMCRM00015>
3. Tan CC, Zhang XY, Tan L, Yu JT. Tauopathies: mechanisms and therapeutic strategies. *J Alzheimers Dis.* 2018;61(2):487–508. <https://doi.org/10.3233/JAD-170187>
4. Valeeva FG, Karimova TR, Pavlov RV, Bakhtiyarov DI, Sapunova AS, Ivshin KA, et al. Introduction of isothiuronium surfactant series: synthesis, structure-dependent aggregation overview and biological activity. *J Mol Liq.* 2021;324(15):114721–31. <https://doi.org/10.1016/j.molliq.2020.114721>
5. Jang D, Szabo C, Murrell GA. S-substituted isothiouras are potent inhibitors of nitric oxide biosynthesis in cartilage. *Eur J Pharmacol.* 1996;312(3):341–7. [https://doi.org/10.1016/0014-2999\(96\)00369-X](https://doi.org/10.1016/0014-2999(96)00369-X)
6. Kazimierczuk Z, Chalimoniuk M, Laudy AE, Moo-Puc R, Cedillo-Rivera R, Starosciak BJ, Chrapusta SJ. Synthesis and antimicrobial and nitric oxide synthase inhibitory activities of novel isothiouras derivatives. *Arch Pharm Res.* 2010;33(6):821–30. <https://doi.org/10.1007/s12272-010-0604-8>
7. Galkina IV, Bakhtiyarov DI, Usupova LM, Gerasimov AV, Shulaeva MP, Pozdeev OK, et al. Antimicrobial activity of novel isothiuronium salts with 7-chloro-4,6-dinitrobenzofuroxan-5-olate anion. *Mendeleev Communications.* 2021;31(3):365–7. <https://doi.org/10.1016/j.mencom.2021.04.027>
8. Ferreira M, Assunção LS, Silva AH, Filippin-Monteiro FB, Creczynski-Pasa TB, Sá MM. Allylic isothiuronium salts: the discovery of a novel class of thiourea analogues with antitumor activity. *Eur J Med Chem.* 2017;129:151–8. <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2017.02.013>
9. Sun J, Wang J, Ma L, Jiang T, Li X, Guo Q, Li X, Sui Z. Determination and pharmacokinetic study of isothiuronium-modified pyrimidine-substituted curcumin analog (1G), a novel antitumor agent, in rat plasma by liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Artif Cells Nanomed Biotechnol.* 2019;47(1):1505–12. <https://doi.org/10.1080/21691401.2019.1602537>
10. El-Henawy AA, Khowdiary MM, Badawi AB, Soliman HM. In vivo anti-leukemia, quantum chemical calculations and ADMET investigations of some quaternary and isothiuronium surfactants. *Pharmaceuticals (Basel).* 2013;6(5):634–49. <https://doi.org/10.3390/ph6050634>
11. Li ZH, Ma JL, Liu GZ, Zhang XH, Qin TT, Ren WH, et al. [1,2,3]Triazolo[4,5-d]pyrimidine derivatives incorporating (thio)urea moiety as a novel scaffold for LSD1 inhibitors. *Eur J Med Chem.* 2020;187:111989. <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2019.111989>
12. Fechner GA, Jacobs JJ, Parsons PG. Inhibition of melanogenesis in human melanoma cells by novel analogues of the partial histamine (H2) agonist nordimaprit. *Biochem Pharmacol.* 1993;46(1):47–54. [https://doi.org/10.1016/0006-2952\(93\)90346-x](https://doi.org/10.1016/0006-2952(93)90346-x)

13. Barnes JC, Brown JD, Clarke NP, Clapham J, Evans DJ, O'Shaughnessy CT. Pharmacological activity of VUF 9153, an isothiourea histamine H₃ receptor antagonist. *Eur J Pharmacol.* 1993;250(1):147–52. [https://doi.org/10.1016/0014-2999\(93\)90632-R](https://doi.org/10.1016/0014-2999(93)90632-R)
14. Iwamoto T, Watano T, Shigekawa M. A novel isothiourea derivative selectively inhibits the reverse mode of Na⁺/Ca²⁺ exchange in cells expressing NCX1. *J Biol Chem.* 1996;271(37):22391–7. <https://doi.org/10.1074/jbc.271.37.22391>
15. Watano T, Kimura J, Morita T, Nakanishi H. A novel antagonist, No. 7943, of the Na⁺/Ca²⁺ exchange current in guinea-pig cardiac ventricular cells. *Br J Pharmacol.* 1996;119(3):555–63. <https://doi.org/10.1111/j.1476-5381.1996.tb15708.x>
16. Прошин АН, Григорьев ВВ, Тихонова ИГ, Палюлин ВА, Бачурин СО. Тетразамещенные соли изотиуриона как мультитаргетные соединения, действующие на NMDA- и AMPA-рецепторы мозга. *Известия Академии наук. Серия химическая.* 2015;(9):2189–94. Proshin AN, Grigor'ev VV, Tikhonova IG, Palyulin VA, Bachurin SO. Tetrasubstituted thiuronium salts as multitarget compounds affecting brain NMDA and AMPA receptors. *Russ Chem Bull.* 2015;64(9):2189–94. <https://doi.org/10.1007/s11172-015-1137-6>
17. Proskurnina MV, Lozinskaya NA, Tkachenko SE, Zefirov NS. Reaction of aromatic aldehydes with ammonium acetate. *Russian Journal of Organic Chemistry.* 2002;38(8):1149–53. <https://doi.org/10.1023/A:1020997325550>
18. Hajós F. An improved method for the preparation of synaptosomal fractions in high purity. *Brain Res.* 1975;93(3):485–9. [https://doi.org/10.1016/0006-8993\(75\)90186-9](https://doi.org/10.1016/0006-8993(75)90186-9)
19. Petrova LN, Bachurin SO. Specificity of glutamate receptors in P₂ synaptosomal fraction from rat brain cortex. *Bull Exp Biol Med.* 2006;142(1):43–6. <https://doi.org/10.1007/s10517-006-0287-9>
20. Bachurin SO, Makhaeva GF, Shevtsova EF, Aksinenko AY, Grigoriev VV, Shevtsov PN, et al. Conjugation of aminoadamantane and γ-carboline pharmacophores gives rise to unexpected properties of multifunctional ligands. *Molecules.* 2021;26(18):5527. <https://doi.org/10.3390/molecules26185527>
21. Shevtsov PN, Shevtsova EF, Burbaeva GSh, Bachurin SO. Effects of anti-Alzheimer drugs on phosphorylation and assembly of microtubules from brain microtubular proteins. *Bull Exp Biol Med.* 2014;156(6):768–72. <https://doi.org/10.1007/s10517-014-2445-9>

Вклад авторов. Все авторы подтверждают соответствие своего авторства критериям ICMJE. Наибольший вклад распределен следующим образом: Н.А. Лозинская — разработка стратегии исследования, контроль выполнения синтетической части исследования, редактирование текста рукописи; А.А. Морозов — синтез, аналитические исследования соединений, написание текста рукописи; Д.Р. Базанов — синтез и аналитические исследования соединений, написание и редактирование текста рукописи; Е.Р. Милаева — анализ и интерпретация результатов работы; Д.А. Арешидзе — проведение электронной микроскопии и анализ полученных результатов; П.Н. Шевцов — проведение тестов по сборке микротрубочек, проведение электронной микроскопии, написание соответствующих разделов рукописи; Л.Н. Петрова — проведение исследования по глутамат-индуцированному захвату кальция, написание текста рукописи; Е.Ф. Шевцова — разработка стратегии исследования, контроль выполнения исследования биологической активности, редактирование текста рукописи.

Соответствие принципам этики. Используемые в данном исследовании манипуляции с животными были одобрены на заседании биоэтической комиссии ИФАВ РАН, протокол заседания от 29.11.2019 № 41.

Благодарности. Работа выполнена в рамках гранта РФФИ № 22-13-00228.

Authors' contributions. All the authors confirm that they meet the International Committee of Medical Journal Editors (ICMJE) criteria for authorship. The most significant contributions were as follows. Natalia A. Lozinskaya developed the research strategy, supervised the synthetic part of the study, and edited the manuscript. Alexey A. Morozov synthesised and analysed the compounds and drafted the manuscript. Daniil R. Bazanov synthesised and analysed the compounds, drafted and edited the manuscript. Elena R. Milaeva analysed and interpreted the study results. David A. Areshidze performed electron microscopy and analysed its results. Pavel N. Shevtsov conducted microtubule assembly tests and electron microscopy and wrote the corresponding part of the manuscript. Ludmila N. Petrova studied glutamate-induced calcium uptake and drafted the manuscript. Elena F. Shevtsova developed the research strategy, supervised biological activity testing in the study, and edited the manuscript.

Ethics approval. The animal manipulations reported in this study were approved at the meeting of the bioethics commission of the IPAC RAS, Protocol dated 29.11.2019 No. 41.

Acknowledgements. The study was carried out within the framework of the Russian Science Foundation's grant No. 22-13-00228.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов, требующего раскрытия в данной статье.

Conflict of interest. The authors declare no conflict of interest requiring disclosure in this article.

ОБ АВТОРАХ / AUTHORS

Лозинская Наталья Александровна, канд. хим. наук.

ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-2518-3694>
natalylozinskaya@mail.ru

Морозов Алексей Андреевич.

ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-5428-4641>
lexsusmoroz@gmail.com

Базанов Даниил Романович.

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-9525-3275>
daniil_bazanov@mail.ru

Милаева Елена Рудольфовна, д-р хим. наук, профессор.

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-5489-3866>
milaeva@org.chem.msu.ru

Арешидзе Давид Александрович, канд. биол. наук.

ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-3006-6281>
labcelpat@mail.ru

Шевцов Павел Николаевич, канд. мед. наук.

ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-5960-3680>
shevt@dio.ru

Петрова Людмила Николаевна.

plv@chph.ras.ru

Шевцова Елена Феофановна, д-р хим. наук.

ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-2887-1185>
e.f.shevtsova@gmail.com

Natalia A. Lozinskaya, Cand. Sci. (Med.).

ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-2518-3694>
natalylozinskaya@mail.ru

Alexey A. Morozov.

ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-5428-4641>
lexsusmoroz@gmail.com

Daniil R. Bazanov.

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-9525-3275>
daniil_bazanov@mail.ru

Elena R. Milaeva, Dr. Sci. (Chem.), Professor.

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-5489-3866>
milaeva@org.chem.msu.ru

David A. Areshidze, Cand. Sci. (Biol.).

ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-3006-6281>
labcelpat@mail.ru

Pavel N. Shevtsov, Cand. Sci. (Med.).

ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-5960-3680>
shevt@dio.ru

Ludmila N. Petrova.

plv@chph.ras.ru

Elena F. Shevtsova, Dr. Sci. (Chem.).

ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-2887-1185>
e.f.shevtsova@gmail.com

Поступила 20.10.2022

После доработки 06.12.2022

Принята к публикации 13.02.2023

Online first 17.02.2023

Received 20 October 2022

Revised 6 December 2022

Accepted 13 February 2023

Online first 17 February 2023