

В. О. Гельмбольдт¹, В. Ю. Анисимов¹, И. О. Шишкин¹,
М. С. Фонарь², В. Х. Кравцов²

СИНТЕЗ, СТРОЕНИЕ И КАРИЕСПРОТЕКТОРНАЯ АКТИВНОСТЬ ГЕКСАФТОРОСИЛИКАТА 2-АМИНО-4,6-ДИГИДРОКСИПИРИМИДИНИЯ

¹ Одесский национальный медицинский университет, Украина, Одесса;
e-mail: vgelmboldt@te.net.ua

² Институт прикладной физики АН Республики Молдова, Молдова, Кишинев

В работе представлен синтез, изучено строение, физико-химические характеристики и кариеспротекторная активность нового потенциального кариеспротекторного вещества — гексафторосиликата 2-амино-4,6-дигидроксипиримидиния. Получены ИК-спектры, масс-спектры EI, спектры ЯМР ¹⁹F и изучены их характеристики. Биологические исследования проводили на животных, которые содержались на кариесогенном рационе Стефана (сахароза 50 %). В гомогенате пульпы определяли активность щелочной (ЩФ) и кислой фосфатаз (КФ) и по соотношению ЩФ/КФ рассчитывали минерализующий индекс (МИ). В сыворотке крови определяли активность ЩФ и активность аланинаминотрансферазы (АЛТ). Подсчитывали число и глубину кариозных поражений зубов и рассчитывали кариеспрофилактическую эффективность (КПЭ). Полученные данные показали, что гексафторосиликат 2-амино-4,6-дигидроксипиримидиния уменьшает число кариозных поражений на 45,5 % и обладает высокой кариеспрофилактической эффективностью, превосходящей аналогичный показатель для фторида натрия в 5 раз.

Ключевые слова: гексафторосиликат 2-амино-4,6-дигидроксипиримидиния; структура; кариеспротекторная активность.

Кариес — одно из наиболее распространенных заболеваний, а для детского возраста эта патология занимает первое место среди хронических заболеваний [1]. В качестве перспективного кариеспротекторного вещества в последние годы активно изучается гексафторосиликат аммония (ГФСА) [2 – 6]. Особенность действия ГФСА обусловлена его гидролизом в среде слюны с образованием растворимой формы диоксида кремния, которая катализирует процесс осаждения фосфата кальция [7] и обеспечивает пролонгированную окклюзию тубул дентина. Очевидно, что кариеспротекторное действие фторидной компоненты ГФСА может быть усилено при замене катиона аммония на органические «ониевые» катионы, проявляющие специфические виды фармакологической активности, в частности, антибактериальной. К соединениям указанного типа относятся синтезированные недавно гексафторосиликаты цетилпиридиния [8], производных гуанидиния [9] и пиридиния [10], катионы которых проявляют антибактериальную активность и способность к стимуляции слюноотделения. Эксперименты на животных показали [11, 12], что использование «ониевых» гексафторосиликатов приводит к существенному улучшению биохимических показателей пульпы зубов и пародонта, уменьшению числа и глубины кариозных поражений и обеспечивает высокую кариеспрофилактическую эффективность. Целью настоящей работы является синтез, изучение строения, физико-химических характеристик и кариеспротекторной активности нового потенциального кариеспротекторного вещества — гексафторосиликата 2-амино-4,6-дигидроксипиримидиния.

Экспериментальная химическая часть

Для синтеза использовали коммерческую кремнефтороводородную кислоту (45 %, ч.д.а.), 2-амино-4,6-дигидроксипиримидин (Acros). В экспериментах использовали фторид натрия NaF (РФ, «Химзавод фторсолей», ч.д.а.) и гексафторосиликат аммония (NH₄)₂SiF₆ (РФ, АО «Реахим», ч.). ИК-спектры поглощения регистрировали на спектрофотометре Spectrum BX II FT-IR System (Perkin-Elmer) (область 4000 – 350 см⁻¹, образцы в виде таблеток с KBr). Масс-спектры EI регистрировали на спектрометре MX-1321 (прямой ввод образца в источник, энергия ионизирующих электронов 70 эВ). Спектры ЯМР ¹⁹F записывали на спектрометре Varian Gemini-200 (188,14 МГц, растворитель D₂O, эталон CFC1₃).

Гексафторосиликат 2-амино-4,6-дигидроксипиримидиния (L¹H)₂SiF₆ (I). Растворяли порциями 1,271 г (0,01 моль) 2-амино-4,6-дигидроксипиримидина (L¹) в 700 мл кипящего метанола, к полученному раствору добавляли 15 мл 45 % кремнефтороводородной кислоты, и оставляли реакционную смесь до полного испарения растворителей. Данные элементного анализа для выделенного бесцветного кристаллического продукта I соответствуют рассчитанным, выход 76 %.

Масс-спектр, *m/z* (*I*_{отн}): [ML¹]⁺ 127 (7,9), [ML¹-H₂CN]⁺ 99 (1,45), [SiF₃]⁺ 85 (100).

ИК-спектр, *v*_{max}, см⁻¹: 3581, 3411, 3282, 3147, 3041, 2988 ((NH₂), (N⁺H), (OH)), 2858 (CH), 740 (SiF).

Спектр ЯМР ¹⁹F (D₂O), δ, м.д.: – 133,0.

Расчетно-структурный анализ комплекса I выполнен на дифрактометре Xcalibur E (комнатная темпера-

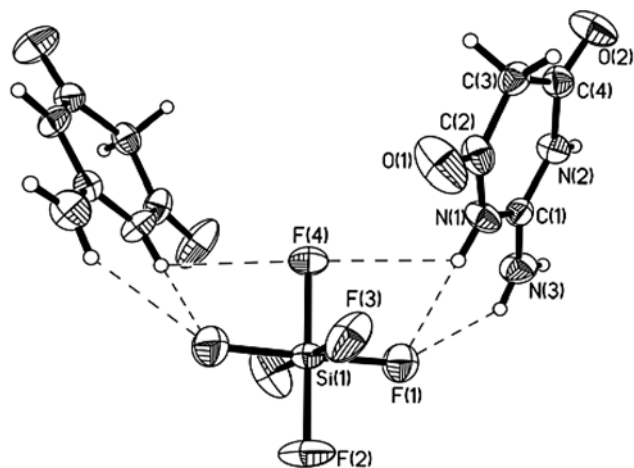


Рис. 1. Строение соединения **I** с указанием тепловых эллипсоидов, водородных связей и частичной нумерацией атомов.

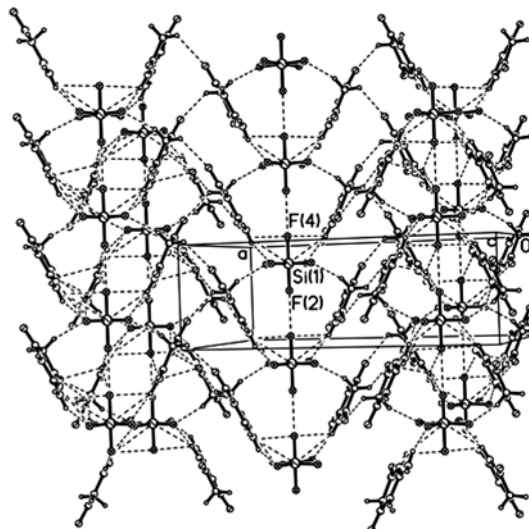


Рис. 2. Фрагмент упаковки в структуре **I**.

тура, двухкоординатный CCD-детектор, графитовый монохроматор, MoK α -излучение).

Кристаллы **I** ($C_8H_{12}F_6N_6O_4Si$, $M = 398,33$) моноклинные: $a = 18,1871(10)$, $b = 6,0848(3)$, $c = 12,5977(6)$ Å, $\beta = 91,333(5)$, $V = 1393,74(12)$ Å³, пр. гр. $I2/a$, $Z = 4$, $\rho_{\text{выч}} = 1,898$ мг/м³, $\mu = 0,277$ мм⁻¹, $F(000) = 808$. Всего зарегистрировано 2015 отражений, из них 1221 независимых. Окончательные результаты уточнения: $R_1 = 0,0352$, $wR_2 = 0,0840$ по 1023 отражениям с $I > 2\sigma(I)$; $R_1 = 0,0443$, $wR_2 = 0,0894$ по всем отражениям. Расшифровка и уточнение структуры проведены с использованием комплекса программ SHELX97 [13]. Все неводородные атомы уточнены в анизотропном приближении. Атомы водорода в амино- и иминогруппах найдены из разностного синтеза Фурье и уточнены в изотропном приближении. Длины некоторых связей и валентные углы для **I** приведены в табл. 1, геометрические параметры Н-связей — в табл. 2. Кристаллографические данные для **I** депонированы в Кембриджской базе структурных данных (CCDC № 1485315).

Таблица 1

Длины связей (d) и валентные углы (ω) для **I**

Связь d , Å	Угол ω , град.		
Si(1)-F(2)	1,6479(18)	F(2)-Si(1)-F(3)	90,15(6)
Si(1)-F(3)	1,6650(13)	F(3)-Si(1)-F(4)	89,85(6)
Si(1)-F(4)	1,6654(18)	F(2)-Si(1)-F(1)	90,57(5)
Si(1)-F(1)	1,6985(12)	F(3)-Si(1)-F(1)	90,00(7)
C(2)-C(3)	1,475(3)	F(4)-Si(1)-F(1)	89,43(5)
C(3)-C(4)	1,481(3)	F(1) ^{#1} -Si(1)-F(1)	178,85(9)
N(3)-C(1)	1,304(3)	C(1)-N(1)-C(2)	125,18(19)
O(1)-C(2)	1,199(2)	C(1)-N(2)-C(4)	124,21(18)
O(2)-C(4)	1,204(3)	N(1)-C(1)-N(2)	119,36(18)
N(1)-C(1)	1,338(3)	N(1)-C(2)-C(3)	116,43(18)
N(1)-C(2)	1,386(3)	C(2)-C(3)-C(4)	117,34(18)
N(2)-C(1)	1,342(3)	N(2)-C(4)-C(3)	117,05(18)
N(2)-C(4)	1,386(3)		

Преобразование симметрии ^{#1} $3/2 - x, y, 1 - z$.

2-Амино-4,6-дигидроксиимидин фиксируется в составе соли **I** в виде дикето-таутомерной формы. Ионное соединение **I** построено из пиримидиниевых катионов L^1H^+ и анионов SiF_6^{2-} в соотношении 2:1, объединенных системой $NH \cdots F$ Н-связей и контактами $CH \cdots F$ (табл. 2, рис. 1). Центром протонирования в катионах L^1H^+ , как и в случае изученных ранее методом PCA солей пиримидиниевых катионов $(L^2H)_2SiF_6$ ($L^2 = 2$ -аминопиримидин) и $(L^3H)_2SiF_6$ ($L^3 = 5$ -цианцитозин) [14], является один из атомов азота пиримидинового цикла. Протонирование атома азота в L^1H^+ проявляется в увеличении угла $C(1)-N(1)-C(2)$ в гетероцикле до $125,18(19)^\circ$ по сравнению со значением $119,3^\circ$ для непротонированного L^1 [15]. Строение пиримидиниевого катиона в **I** идентично таковому в $(L^1H)_2(MoBr_6)(H_3O \cdot H_2O)$ [16]. Геометрия аниона SiF_6^{2-} в **I** — искаженный октаэдр, длины связей Si-F находятся в интервале $1,6479(18) - 1,6984(12)$ Å. Перераспределение длин связей Si-F обусловлено включением атомов фтора анионов в Н-связи различной прочности с Н-донорными фрагментами катионов. Избыток акцепторов протонов в системе обуславливает бифуркатный характер водородных связей с участием NH-групп и сосуществование в кристалле гомомерных мотивов, линейных цепочек анионов SiF_6^{2-} , объединенных коротким контактом $F(2) \cdots F(4) = 2,771$ Å, и катионных слоев, стабилизированных одним $CH \cdots O$ коротким контактом и двумя $NH \cdots O$ водородными связями; эти мотивы объединены в трехмерную структуру $NH \cdots F$ водородными связями, в которых участвуют все атомы фтора (табл. 2, рис. 2). Чистота **I** не определялась, однако, принимая во внимание, что изучаемое вещество состоит преимущественно из монокристаллов, можно говорить о его относительно высокой чистоте.

Экспериментальная биологическая часть

Гели, содержащие фторированные соединения NaF, ГФСА и **I**, готовили на основе геля карбоксиметилцел-

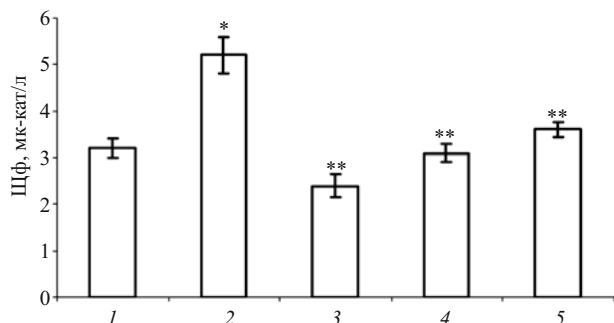


Рис. 3. Влияние фторированных веществ на активность щелочной фосфатазы (ЩФ) в сыворотке крови крыс, получавших КГР. Примечания: 1 — норма; 2 — плацебо; 3 — NaF; 4 — GFSA; 5 — I; достоверно по сравнению ($p < 0,05$): * с группой 1; ** с группой 2.

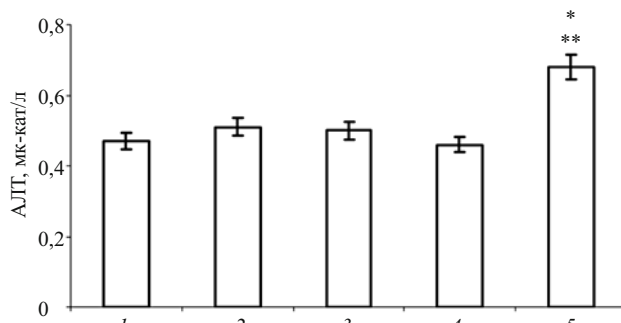


Рис. 4. Влияние фторированных веществ на активность АЛТ в сыворотке крови крыс, получавших КГР. Примечания: 1 — норма; 2 — плацебо; 3 — NaF; 4 — GFSA; 5 — I. Достоверно ($p < 0,05$) по сравнению: * с группой 1, ** с группой 2.

люлозы (натриевая соль) [11]. Концентрация веществ в геле была подобрана таким образом, чтобы доза фтора составляла 1,88 мг/кг.

Исследования на животных проводили с соблюдением положений “Европейской конвенции о защите позвоночных животных, которых используют для экспериментальных и других научных целей” (Страсбург, 1986) и Закона Украины “О защите животных от жестокого обращения” (Украина, 2006). Эксперименты проведены на 35 белых крысах линии Вистар (самки, 1 мес, средняя живая масса — $(40 \pm 1,5)$ г), распределенных в 5 равных групп (табл. 3). Крысы 2 – 5 групп содержались на карисогенном рационе (КГР) Стефана (сахароза 50 %) [17]. Всем крысам опытных групп (3 – 5 группы) и контрольной группы (группа 2) ежедневно в течение 30 дней (за исключением воскресений) делали оральные аппликации гелей с фторированным веществом в дозе 0,3 мл на один прием, покрывая гелем зубы и десны. После аппликации крыс в течение 1 ч не кормили.

Эвтаназию животных осуществляли на 31 день опыта под тиопенталовым (ОАО “Киевмедпрепарат”) наркозом (20 мг/кг) тотальным кровопусканием из сердца.

Извлекали из резцов пульпу, в гомогенате которой определяли активность (мк-кат/кг) щелочной (ЩФ) и

кислой фосфатаз (КФ) [18] и по соотношению ЩФ/КФ рассчитывали минерализующий индекс (МИ) [19].

Получали сыворотку крови, в которой определяли активность ЩФ и аланинаминотрансферазы (АЛТ) [20].

Вычленили челюсти и подсчитывали число и глубину кариозных поражений зубов [17]. Кариеспрофилактическую эффективность (КПЭ) рассчитывали по формуле:

$$\text{КПЭ} = [(A - B)/A] \cdot 100 \%,$$

где А — число кариозных поражений у крыс, получавших КГР; В — число кариозных поражений у крыс, получавших КГР + фторированное вещество.

Результаты исследований подвергали стандартной статистической обработке, рассчитывали среднее арифметическое (M), ошибку среднеарифметического ($\pm m$). Сравнение показателей в группах производили по t -критерию Стьюдента. За достоверные различия принимали данные с $p < 0,05$ [21].

Результаты определения КПЭ фторированных веществ представлены в табл. 3. Как следует из приведенных данных, GFSA и I достоверно уменьшают число кариозных поражений на 22,7 и 45,5 % соответственно, т.е. I обладает высокой КПЭ, превосходящей аналогичный показатель для фторида натрия в 5 раз.

Таблица 2

Параметры Н-связей в I

D-H...A	H...A, Å	D...A, Å	$\angle \text{DHA}, ^\circ$	Операции симметрии для атома А
N(1)-H(1N)...F(1)	2,07(3)	2,894(2)	162(2)	$3/2 - x, y + 1, 1 - z$
N(1)-H(1N)...F(4)	2,51(2)	3,0197(19)	119(2)	$x, y + 1, z$
N(2)-H(2N)...F(3)	1,90(2)	2,759(2)	156(2)	$3/2 - x, 1/2 - y, 3/2 - z$
N(2)-H(2N)...O(1)	2,45(2)	2,933(2)	114(2)	$x, 3/2 - y, z + 1/2$
N(3)-H(3N)...F(2)	2,23(3)	2,818(2)	124(2)	$3/2 - x, 3/2 - y, 3/2 - z$
N(3)-H(3N)...F(4)	2,43(3)	3,188(3)	146(2)	$3/2 - x, 1/2 - y, 3/2 - z$
N(3)-H(3N)...O(1)	2,57(3)	3,079(3)	119(2)	$x, 3/2 - y, z + 1/2$
N(3)-H(4N)...F(1)	2,45(3)	3,167(3)	142(2)	$3/2 - x, y + 1, 1 - z$
C(3)-H(3A)...O(1)	2,51	3,296(3)	138	$2 - x, 1 - y, 1 - z$
C(3)-H(3B)...F(3)	2,23	3,171(2)	163	$3/2 - x, y, 1 - z$

Кариеспрофилактическое действие фторпрепаратов

№	Группа	Число кариозных поражений	Глубина кариозных поражений	КПЭ, %
1	Норма	4,0 ± 0,4	4,0 ± 0,4	-
2	КГР + гель-плацебо	4,4 ± 0,2	4,9 ± 0,4	-
3	КГР + гель-NaF	4,0 ± 0,4	4,6 ± 0,7	9,1 ± 1,6
4	КГР + гель-ГФСА	3,4 ± 0,3**	3,6 ± 0,4**	22,7 ± 2,7***
5	КГР + гель-I	2,4 ± 0,4***	2,4 ± 0,4***	45,5 ± 3,2***

Достоверно ($p < 0,05$) по сравнению: * с группой 1; ** с группой 2; *** с группой 3.

Активность фосфатаз и минерализующий индекс (МИ) пульпы зубов крыс, получавших фторпрепараты

№	Группа	ЩФ, мк-кат/кг	КФ, мк-кат/кг	МИ
1	Норма	2760 ± 300	36,7 ± 2,4	75,2 ± 8,4
2	КГР + гель-плацебо	1850 ± 230*	45,0 ± 3,0*	45,1 ± 6,2*
3	КГР + гель-NaF	3180 ± 310**	30,6 ± 1,2***	103,9 ± 11,5**
4	КГР + гель-ГФСА	2660 ± 590	31,5 ± 2,1**	84,4 ± 8,9**
5	КГР + гель-I	1980 ± 210*	50,5 ± 3,4*	39,2 ± 5,0*

Достоверно ($p < 0,05$) по сравнению: * с группой 1; ** с группой 2.

В табл. 4 включены результаты определения активности фосфатаз и МИ в пульпе зубов крыс, получавших КГР и фторированные вещества. Видно, что при кариесе достоверно уменьшается активность ЩФ и достоверно повышается активность КФ, что в итоге дает снижение МИ пульпы на 40 %. Гель с NaF достоверно увеличивает активность ЩФ и достоверно снижает активность КФ. В результате МИ повышается в 2 раза по сравнению с аналогичным показателем группы крыс, получавших плацебо. В случае I показатель МИ у этой группы крыс оказывается таким же низким, как и у крыс, получавших КГР и плацебо, что, по-видимому, может свидетельствовать об отличиях в механизме противокариозного действия фторида натрия и ГФСА с одной стороны, и I — с другой. Отметим, что действие изученных ранее гексафторосиликатов с катионами — замещенными производными гуанидиния и пиридиния — во всех случаях сопровождалось увеличением в пульпе активности ЩФ и нормализацией МИ [11].

На рис. 3 представлены результаты определения в сыворотке крови активности ЩФ. Из этих данных видно, что КГР вызывает весьма значительное (на 57 %) повышение уровня ЩФ, который достоверно снижается под влиянием всех испытанных фторированных веществ. Механизм повышения в сыворотке активности ЩФ у крыс, получавших КГР, и снижения уровня под влиянием фторированных веществ остается неизвестным. Для I, в отличие от NaF и ГФСА, наблюдается достоверное повышение активности АЛТ (на 39 %, рис. 4), что может свидетельствовать о его гепатотоксическом действии [20]. Известно, что производные пиримидина обладают широким спектром биологической активности [23], однако результаты

PASS-прогноза для 2-амино-4,6-дигидрокси-пиримидина не подтверждают вероятность обнаруженного вида активности. Предположительно, ее источником являются активные метаболиты L¹.

Таким образом, полученные результаты свидетельствуют о том, что I обладает довольно высокой КПЭ, заметно превосходящей как КПЭ фторида натрия, так и ГФСА. По механизму биологического действия этот препарат имеет существенные отличия от фторидов, которые, в определенной степени, действуют через механизм активации пульпы [22]. Очевидным недостатком I как потенциального кандидата в кариеспротекторные вещества является наличие гепатотоксического действия, связанного, по-видимому, со специфическими эффектами пиримидинового катиона, что стимулирует поиск новых соединений в кругу гексафторосиликатов пиримидиниевых производных с минимизированными токсическими эффектами.

ЛИТЕРАТУРА

1. R. H. Selwitz, A. I. Ismail, N. B. Pitts, *Lancet*, **369**, 51 – 59 (2007).
2. T. Suge, A. Kawasaki, K. Ishikawa, et al., *Dent. Mater.*, **24**, 192 – 198 (2008).
3. T. Suge, A. Kawasaki, K. Ishikawa, et al., *Dent. Mater.*, **26**, 29 – 34 (2010).
4. T. Suge, K. Ishikawa, T. Matsuo, et al., *Am. J. Dent.*, **25**, 299 – 302 (2012).
5. Yu. Hosoya, E. Watanabe, K. Tadokoro, et al., *J. Oral. Sci.*, **54**, 267 – 272 (2012).
6. Yu. Hosoya, K. Tadokoro, H. Otani, et al., *J. Oral. Sci.*, **55**, 115 – 121 (2013).
7. P. Li, K. Nakanishi, T. Kokubo, et al., *Biomaterials*, **14**, 963 – 968 (1993).
8. V. O. Gelmboldt, O. V. Prodan, V. Yu. Anisimov, *Am. J. PharmTech. Res.*, **4**, 513 – 521 (2014).

9. V. O. Gelmboldt, V. Yu. Anisimov, O. V. Prodan, *News of Pharmacy*, № 3, 42 – 45 (2014).
10. V. O. Gelmboldt, Ed. V. Ganin, M. M. Botoshansky, et al., *J. Fluorine Chem.*, **160**, 57 – 63 (2014).
11. В. В. Лепский, В. Ю. Анисимов, О. В. Продан, В. О. Гельмбольдт, *Вісник стоматології*, № 2, 10 – 13 (2015).
12. В. Ю. Анисимов, *Вестник фармации*, № 4(70), 81 – 86 (2015).
13. G. M. Sheldrick, *Acta Crystallogr.*, **A64**, 112 – 122 (2008).
14. A. Pevce, *Acta Chim. Slov.*, **62**, 297 – 303 (2015).
15. P. Karen, R. L. Harlow, Z. Li, et al., *Acta Chem. Scand.*, **52**, 1051 – 1055 (1998).
16. П. Е. Казин, В. К. Бельский, А. И. Жиров и др., *Ж. неорганической химии*, **30**, 1426 – 1430 (1985).
17. А. П. Левицкий (ред.), *Лечебно-профилактические зубные эликсиры (учебное пособие)*, КП ОГТ, Одесса (2010).
18. А. П. Левицкий, О. А. Макаренко, О. В. Деньга и др., *Экспериментальные методы исследования стимуляторов остеогенеза: метод, рекомендации*, ГФЦ, Киев (2005).
19. А. П. Левицкий, О. А. Макаренко, І. В. Ходаков та ін., *Одеський мед. ж.*, № 3, 17 – 21 (2006).
20. А. М. Горячковский, *Клиническая биохимия в лабораторной диагностике*, Экология, Одесса (2005).
21. Н. В. Трухачева, *Математическая статистика в медико-биологических исследованиях с применением пакета Statistica*, ГЭОТАР-Медиа, Москва (2012).
22. В. Г. Клименко, *Автореф. дис. канд. мед. наук*, Киев (1980).
23. М. А. Самотруева, А. А. Цибизова, А. Л. Ясенявская и др., *Астраханский мед. ж.*, № 1, 12 – 29 (2015).

Поступила 24.06.16

SYNTHESIS, STRUCTURE AND ANTI-CARIES ACTIVITY OF 2-AMINO-4,6-DIHYDROXYPYRIMIDINIUM HEXAFLUOROSILICATE

V. O. Gelmboldt^{1*}, V. Yu. Anisimov¹, I. O. Shishkin¹, M. S. Fonari², and V. Ch. Kravtsov²

¹ Odessa National Medical University, 65082 Odessa, Ukraine

² Institute of Applied Physics, Chisinau, MD-2028, Republic of Moldova;

* e-mail: vgelmboldt@te.net.ua

We describe the synthesis and present data on the structure, physicochemical characteristics, and anti-caries properties of a new potential protective agent, 2-amino-4,6-dihydroxypyrimidinium hexafluorosilicate. The IR spectra, EI mass spectra, and ¹⁹F NMR spectra of the drug were obtained and their parameters were determined. Biological tests were carried out on animals kept under Stephan's cariogenic diet (50% sucrose) conditions. The pulp homogenate was analyzed to determine the activity of alkaline (ALP) and acid (ACP) phosphatases, and the mineralizing index (MI) was calculated as the ALP/ACP ratio. The blood serum was studied to determine the activity of ALP and the activity of alanine aminotransferase (ALT). The number and depth of carious lesions in teeth were measured and the caries prophylactic efficacy (CPE) was calculated. The obtained data showed that 2-amino-4,6-dihydroxypyrimidinium hexafluorosilicate reduced the number of carious lesions by 45.5% and exhibited high caries prophylactic efficacy, which was 5 times higher than that of sodium fluoride.

Keywords: 2-amino-4,6-dihydroxypyrimidinium hexafluorosilicate; synthesis; structure; anti-caries action.