

БИОЛОГИЯ И ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ МЕДИЦИНА

УДК 615.212+615.276

DOI: 10.17816/pmj374115-119

ИЗУЧЕНИЕ АНАЛЬГЕТИЧЕСКОЙ И ПРОТИВОВОСПАЛИТЕЛЬНОЙ АКТИВНОСТИ ГИДРАЗИНОПРОИЗВОДНЫХ 2,4-ДИОКСОБУТАНОВЫХ КИСЛОТ

Н.А. Пулина, А.С. Кузнецов, С.В. Чащина*

Пермская государственная фармацевтическая академия, Россия

STUDYING OF ANALGESIC AND ANTI-INFLAMMATORY ACTIVITY OF 2,4-DIOXOBUTANOIC ACID HYDRAZINE DERIVATIVES

N.A. Pulina, A.S. Kuznetsov, S.V. Chaschina*

Perm State Pharmaceutical Academy, Russian Federation

Цель. Изучить анальгетическую и противовоспалительную активность водорастворимых гидразинопроводных 2,4-диоксобутановых кислот, а также установить связь строения веществ с их биологическим действием.

Материалы и методы. С применением методов лабораторного синтеза получены 2-гидразинопроводные 2,4-диоксобутановых кислоты. Изучена биологическая активность соединений с использованием теста горячей пластины на мышах и острой воспалительной реакции у крыс, вызванной введением каррагенина.

Результаты. Четыре соединения по анальгетической активности сопоставимы с нимесулидом. Найдено вещество, достоверно превосходящее по выраженности противовоспалительного эффекта нимесулид на один и 3 ч эксперимента. Выявлены два соединения, сочетающие высокую анальгетическую и противовоспалительную активность. Обнаружено влияние определенных радикалов в структуре веществ на изучаемые эффекты.

© Пулина Н.А., Кузнецов А.С., Чащина С.В., 2020

тел. +7 963 873 43 71

e-mail: alexanderiv.88@mail.ru

[Пулина Н.А. – доктор фармацевтических наук, профессор, заведующая кафедрой фармацевтической технологии; Кузнецов А.С. (*контактное лицо) – кандидат фармацевтических наук, доцент кафедры общей и органической химии; Чащина С.В. – кандидат биологических наук, доцент кафедры физиологии].

© Pulina N.A., Kuznetsov A.S., Chaschina S.V., 2020

tel. +7 963 873 43 71

e-mail: alexanderiv.88@mail.ru

[Pulina N.A. – Doctor of Pharmaceutical Sciences, Professor, Head of Department of Pharmaceutical Technology; Kuznetsov A.S. (*contact person) – Candidate of Pharmaceutical Sciences, Associate Professor, Department of General and Organic Chemistry; Chaschina S.V. – Candidate of Biological Sciences, Associate Professor, Department of Physiology].

Выводы. Полученные закономерности связи строения оригинальных веществ с их биологическим действием могут быть использованы в дальнейшем синтезе и поиске новых отечественных фармацевтических субстанций с изучаемыми эффектами.

Ключевые слова. 2,4-диоксобутановые кислоты, анальгетическая активность, противовоспалительная активность.

Objective. To study the analgesic and anti-inflammatory activity of water-soluble hydrazine derivatives of 2,4-dioxobutanoic acids, as well as to determine the relationship between the structure of substances and their biological effects.

Materials and methods. The laboratory synthesis methods were applied to obtain 2-hydrazine derivatives of 2,4-dioxobutanoic acids. The compounds were tested for biological activity using a hot plate test in mice and an acute inflammatory reaction caused by carrageenan-induced paw edema in rats.

Results. The analgesic activity of four compounds is comparable to that of nimesulide. One of the substances obtained is found to exhibit higher anti-inflammatory activity than nimesulide during the 1st and 3rd hours of the experiment. Two compounds with a combination of high analgesic and anti-inflammatory activity were identified. The effect of certain radicals in the structure of the substances on the activities studied was discovered.

Conclusions. The revealed relationship between the structure of original compounds and their biological activities can be used in the further synthesis and search for new domestic pharmaceutical substances with investigated effects.

Keywords. 2,4-dioxobutanoic acids; analgesic activity; anti-inflammatory activity.

ВВЕДЕНИЕ

Поиск оригинальных эффективных лекарственных средств с комплексным биологическим действием и минимальными побочными реакциями на основе новых органических соединений является актуальной проблемой. Ранее нами опробован оптимальный метод синтеза новых биологически активных соединений, имеющих гидразоно-функцию при совмещении реакций Штаудингера и диаза-Виттига, где в качестве химической матрицы использовались 4-(гет)арил-2,4-диоксобутановые кислоты [1]. Как известно, N-замещенные гидразиды 4-оксобут-2-еновых кислот, имеющие различные фармакофоры, в том числе адамантил, проявляют высокое биологическое действие при низкой острой токсичности [2, 3]. Для повышения биологической доступности и расширения спектра фармакологических испытаний нами впервые предложен способ получения водорастворимых 4-(гет)арил-2-{2-[2-(адамантан-1-ил)-2-оксоэтилиден]гидразинил}-4-оксобут-2-еноатов натрия, обладающих высокой гемостатической и про-

тивомикробной активностью [4, 5]. Однако анальгетическая и противовоспалительная активность данных соединений ранее не изучалась. В продолжение исследований представляет интерес изучить у них эти виды биологического действия, выявить вещества-лидеры для дальнейшего исследования, а также определить возможные зависимости фармакологических эффектов от структуры соединений.

Цель исследования – изучить анальгетическую и противовоспалительную активность водорастворимых гидразинопроводных 2,4-диоксобутановых кислот, а также установить связь строения веществ с их биологическим действием.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Объектами исследования являлись синтезированные нами водорастворимые 4-(гет)арил-2-{2-[2-(адамантан-1-ил)-2-оксоэтилиден]гидразинил}-4-оксобут-2-еноаты натрия (шесть соединений). Температуру плавления (разложения) определяли на приборе ПТП-2 (Россия) по методу 1 Государственной Фармакопеи Российской Федерации XIV издания [6]. ИК-спектры записаны на при-

боре ФСМ-1201 (Россия) в виде пасты в вазелиновом масле. Спектры ЯМР ^1H записаны на приборе Varian Mercury Plus (300 МГц), внутренний стандарт – ГМДС, растворитель ДМСО- d_6 .

Анальгетическую активность определяли на белых нелинейных мышцах обоего пола массой 18–28 г по тесту горячей пластины [7]. Животных помещали на разогретую до 54 °С металлическую поверхность, окруженную цилиндром. Регистрировали время с момента помещения на горячую поверхность до появления поведенческого ответа на ноцицептивную стимуляцию (облизывание задних лап, прыжки, отдергивание задней лапы). Критерием аналгетического эффекта считали достоверное увеличение латентного периода реакции после введения вещества по сравнению с контрольными данными. Исследуемые соединения вводили внутрибрюшинно в дозе 50 мг/кг в 1 % растворе крахмала за 30 мин до проведения теста. Животным контрольной группы внутрибрюшинно вводили 1 % раствор крахмала в эквивалентном количестве. В качестве препарата сравнения использовали нимесулид в дозе 50 мг/кг, вводимый аналогично. В контрольные и опытные группы было включено по 6 мышшей.

Противовоспалительную активность (ПВА) полученных соединений изучали на модели острой воспалительной реакции, вызванной субплантарным введением 0,1 мл 1 % водного раствора каррагенина в заднюю лапу белых нелинейных крыс [7]. В каждую экспериментальную группу было включено по 6 животных массой 150–340 г. Исследуемые вещества в дозе 50 мг/кг вводили внутривентрально через атравматичный металлический зонд в виде взвеси в 1 % крахмальном растворе за час до введения флогогенного агента. Животным контрольной группы внутривентрально вводили эквивалентное количество 1 % раствора крахма-

ла. Изменение объема стопы регистрировали онкометрически через 1, 3 и 5 ч после индукции воспаления. Выраженность воспалительной реакции в динамике оценивали по увеличению объема в процентах по отношению к исходной величине. Препаратом сравнения служил нимесулид в дозе 50 мг/кг, вводимый аналогично.

Содержание животных и порядок проведения экспериментов соответствовали правилам надлежащей лабораторной практики (GLP) и требованиям этических стандартов [8].

Статистическую обработку данных проводили с использованием t -критерия Стьюдента. За пороговый уровень значимости принимали величину $p < 0,05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Синтез изучаемых 4-(гет)арил-2-{2-[2-(адамantan-1-ил)-2-оксоэтилиден]гидразинил}-4-оксобут-2-еноатов натрия (1 а-f), включая исходные производные, осуществляли по методикам, описанным в работах [1, 5]. Используемые способы просты по выполнению, легко воспроизводимы, соединения получены с высоким выходом. Их структура и индивидуальность доказаны физико-химическими и инструментальными методами анализа [6].

Соединения 1а-f были подвергнуты фармакологическому скринингу на наличие аналгетической и противовоспалительной активности (таблица). Установлено, что все вещества проявляют аналгетическую активность, достоверно увеличивая время оборонительного рефлекса по сравнению с контролем. Четыре соединения (1а-d) по проявляемому эффекту сопоставимы с препаратом сравнения. Отмечено, что введение в 4-е положение арильного радикала метильной группы (соединение 1с), а также замена арильного фрагмента на тиенильный (соединение 1d) способствуют усилению аналгетической активности.

В ходе определения противовоспалительной активности выявлено, что все соединения проявляют изучаемое действие с различной степенью выраженности. Наименее активно на пике воспаления соединение *1b*. Обнаружено, что наиболее активно производное *1a*, достоверно превосходящее нимесулид на один и 3 ч эксперимента. К 5 ч эксперимента максимальное торможение отека достигается в случае введения веществ *1c* и *1e*, достоверно превосходящее соответствующее значение препарата сравнения. Отмечена тенденция усиления торможения отека при переходе от 3 к 5 ч эксперимента у соединений *1b–e*. Обнаружено, что

наличие электронодонорных заместителей в 4-м положении арильного фрагмента или замена на тиенильный тетероцикл приводят к усилению эффекта (*1c*, *1d*). Установлено, что наличие в 4-м положении 2,4-диоксобутановой кислоты фенильного радикала у производного *1a* способствует максимальному проявлению противовоспалительного действия.

По результатам биологических испытаний выявлены два соединения (*1c*, *1d*), обладающие сочетанием высокой анальгетической и выраженной противовоспалительной активности, что свидетельствует о перспективности их дальнейшего изучения.

Анальгетическая и противовоспалительная активность соединений *1a–f*

Соединение	Латентный период оборонительного рефлекса, с	Торможение каррагенинового отека, %		
		1 ч	3 ч	5 ч
<i>1a</i>	19,67 ± 1,52*	51,63 ± 3,21**	45,27 ± 3,56**	40,68 ± 2,14
<i>1b</i>	17,67 ± 1,48*	19,75 ± 2,82**	20,65 ± 3,16**	29,11 ± 4,82
<i>1c</i>	22,00 ± 1,55*	23,17 ± 3,93**	33,23 ± 3,09	48,84 ± 4,13**
<i>1d</i>	22,00 ± 1,29*	37,92 ± 2,90	31,20 ± 1,09**	35,38 ± 4,27
<i>1e</i>	15,33 ± 0,80*	23,40 ± 2,16**	30,53 ± 2,44**	46,09 ± 3,19**
<i>1f</i>	16,33 ± 1,11*	21,14 ± 5,16**	35,66 ± 3,14	23,19 ± 4,15**
Нимесулид	20,00 ± 2,16*	32,63 ± 3,28	39,23 ± 2,85	36,25 ± 3,92
Контроль	12,71 ± 0,92	–	–	–

Примечание: * – $p < 0,05$ по отношению к контролю; ** – $p < 0,05$ по отношению к препарату сравнения.

Выводы

Таким образом, исследование анальгетической и противовоспалительной активности водорастворимых гидразинопроизводных 2,4-диоксобутановых кислот позволило выявить высокоактивные соединения с изучаемыми эффектами на уровне или превосходящими действие нимесулида. Выявлено, что увеличению активности способствует наличие в структуре электронодонорных заместителей в арильном радикале или его замена на тиенильный фрагмент. Полученные закономерности строения оригинальных веществ с их биологическим действием могут быть исполь-

зованы в дальнейшем синтезе и поиске новых отечественных фармацевтических субстанций с изучаемыми эффектами.

Библиографический список

1. Пулина Н.А., Кузнецов А.С., Рубцов А.Е. Химия иминофуранов IX. Синтез и циклизация (2Z)-2-((2Z)-2-[2-(3-R-адамantan-1-ил)-2-оксо-этилиденгидразинил]-4-(гет)арил-4-оксобут-2-еновых кислот. Журнал органической химии 2015; 51 (7): 986–990.
2. Кожухарь В.Ю., Кузнецов А.С., Пулина Н.А., Махмудов Р.Р., Рубцов А.Е. Исследование анальгетической активности новых соединений, содержащих фрагменты морфолина, пиперазина

и адамантана. *Современные проблемы науки и образования* 2015; 3, available at: <http://www.science-education.ru/ru/article/view?id=17523>.

3. Кузнецов А.С., Собин Ф.В., Кожухарь В.Ю., Пулина Н.А. Оценка перспективности поиска биологически активных соединений в ряду производных 4-*R*-2-гидрокси-4-оксо-2-бутеновых кислот. *Глобальный научный потенциал* 2013; 4: 8–11.

4. Кузнецов А.С., Дубровина С.С., Пулина Н.А. Противомикробная активность новых производных 4-(гет)арил-4-оксобут-2-еновых кислот. *Фармация* 2018; 4: 40–43.

5. Пулина Н.А., Кожухарь В.Ю., Кузнецов А.С., Рубцов А.Е., Старкова А.В. Синтез и поиск соединений с гемостатической активностью в ряду производных 4-(гет)арил-4-оксобут-2-еновых кислот. *Известия Академии наук. Серия химическая* 2017; 8: 1497–502.

6. Государственная фармакопея Российской Федерации Министерства здравоохранения Российской Федерации. XIV изд. М. 2018; 1: 1814.

7. Руководство по проведению доклинических исследований лекарственных средств. Часть первая. Под ред. А.Н. Миронова. М.: Гриф и К 2013; 944.

8. Приказ Министерства здравоохранения Российской Федерации от 1 апреля 2016 г. № 199н. Зарегистрировано в Министерстве юстиции Российской Федерации 15 августа 2016 г. Регистрационный № 43232. М. 2016.

REFERENCES

1. Pulina N.A., Kuznetsov A.S., Rubtsov A.E. Chemistry of iminofurans: ix. Synthesis and cyclization of (2z)-2-((2z)-2-[2-(3-*R*-adamantan-1-yl)-2-oxoethylidene]hydrazinyl)-4-(het)aryl-4-oxobut-2-enoic acids. *Russian Journal of Organic Chemistry* 2015; 51 (7): 967–971 (in Russian).

2. Kozbukbar V.Yu., Kuznetsov A.S., Pulina N.A., Makbmudov R.R., Rubtsov A.E. Study of the analgesic activity of new compounds containing fragments of morpholine, piperazine and adamantane. *Sovremennye problemy nauki i obrazovaniya* 2015; 3, available at: <http://www.science-education.ru/ru/article/view?id=17523> (in Russian).

3. Kuznetsov A.S., Sobin F.V., Kozbukbar V.Yu., Pulina N.A. Evaluation of research prospects of biologically active substances in the series of 4-*R*-2-hydroxy-4-oxo-2-butenoic acid derivatives. *Global scientific potential* 2013; 4: 8–11 (in Russian).

4. Kuznetsov A.S., Dubrovina S.S., Pulina N.A. Antimicrobial activity of new 4-(het)aryl-4-oxobut-2-enoic acids derivatives. *Pharmacy* 2018; 4: 40–43 (in Russian).

5. Pulina N.A., Kozbukbar V.Yu., Kuznetsov A.S., Starkova A.V., Rubtsov A.E. Synthesis and search for compounds with hemostatic activity in the series of 4-(het)aryl-4-oxobut-2-enoic acid derivatives. *Russian Chemical Bulletin* 2017; 8: 1497–1502 (in Russian).

6. State Pharmacopoeia of the Russian Federation of the Ministry of Health of the Russian Federation. 14th ed. M. 2018; 1: 1814 (in Russian).

7. Guidelines for conducting preclinical studies of drugs. Part One. Pod red. A.N. Mironova. Moscow: Grif i K 2013; 944 (in Russian).

8. Order of the Ministry of Health of the Russian Federation of April 1, 2016 no. 199n. Registered with the Ministry of Justice of the Russian Federation on August 15, 2016 Registration no. 43232 Moscow 2016 (in Russian).

Финансирование. Исследование не имело спонсорской поддержки.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Материал поступил в редакцию 27.05.2020