

УДК 615.212.3:547.7

**ИЗУЧЕНИЕ БИОЛОГИЧЕСКОЙ АКТИВНОСТИ НОВЫХ
ПРОИЗВОДНЫХ 4-АЦИЛ-4-ОКСО-2-(2-ФЕНИЛАМИНОБЕНЗОИЛ)
ГИДРАЗОНБУТАНОВЫХ КИСЛОТ**

Чащина С.В.*к.б.н., доцент,**Пермский государственный национальный исследовательский университет,
Пермь, Россия***Кизимова И.А.***аспирант,**Пермская государственная фармацевтическая академия,
Пермь, Россия***Аннотация**

Проведены скрининговые исследования на наличие антиноцицептивной и противовоспалительной активности ряда новых производных 4-ацил-4-оксо-2-(2-фениламинобензоил) гидразонбутановых кислот. Обнаружены соединения, обладающие выраженным фармакологическим эффектом и представляющие интерес для углубленного изучения. Показана перспективность поиска биологически активных веществ среди данного класса производных.

Ключевые слова: алкил-4-оксо-2-(2-фениламинобензоил) гидразонбутаноаты, N-алкил(арил)-4-оксо-2-(2-фениламинобензоилгидразон)бутанамиды, нестероидные противовоспалительные средства (НПВС), антиноцицептивная активность, противовоспалительная активность

THE STUDY OF THE BIOLOGICAL ACTIVITY OF NEW DERIVATIVES 4-ACYL-4-OXO-2-(2-PHENYNYAMINOBENZYL) HYDRAZON BUTANE ACIDS

Chaschina S. V.*Candidate of Biological Sciences, docent*

Perm State National Research University

Perm, Russia

Kizimova I. A.

Graduate student

Perm State Pharmaceutical Academy,

Perm, Russia

Annotation

Screening studies were conducted for the presence of antinociceptive and anti-inflammatory activities of a number of new 4-acyl-4-oxo-2- (2-phenylaminobenzoyl) hydrazonobutanoic acid derivatives. Compounds with pronounced pharmacological effect were found and were of interest for in-depth study. The prospect of searching for biologically active substances among this class of derivatives was shown.

Key words: alkyl-4-R-4oxo-2- (2-phenylaminobenzoyl) hydrazonobutanoates, N-alkyl (aryl) -4-R-4-oxo-2- (2-phenylaminobenzoyl hydrazono) butanamides, nonsteroidal anti-inflammatory drugs (NSAID), anti-inflammatory activity

Боль является одним из самых распространенных симптомов в современной клинической практике и одной из наиболее частых причин, по которой пациенты обращаются за медицинской помощью на амбулаторно-поликлиническом этапе [3, 11]. Традиционно ведущим средством защиты периферических болевых рецепторов являются нестероидные противовоспалительные средства (НПВС). К основным терапевтическим эффектам НПВС относятся противовоспалительный, обезболивающий, жаропонижающий, в связи с чем они приносят облегчение больным с соответствующими симптомами (боль, лихорадка, воспаление), которые отмечаются при многих заболеваниях [1].

Однако с приемом НПВС ассоциируется целый спектр различных осложнений [5] Кроме того, в России потребность пациентов в разрешенных Дневник науки | www.dnevniknauki.ru | СМИ Эл № ФС 77-68405 ISSN 2541-8327

ЭЛЕКТРОННЫЙ НАУЧНЫЙ ЖУРНАЛ «ДНЕВНИК НАУКИ»

для использования сильнодействующих анальгетиках обеспечивается менее чем на 20% [9], что резко снижает возможность оказания необходимой помощи пациентам в целом, а также затрудняет подбор рациональной схемы терапии для конкретного пациента.

Одним из путей инновационного развития фармацевтической науки является разработка и последующее внедрение в практику препаратов на основе новых продуктов органического синтеза. Весьма актуальна проблема использования ароилпировиноградных кислот в органическом синтезе для получения новых биологически активных соединений, обладающих различными видами фармакологической активности, в том числе анальгетической и противовоспалительной [12, 13].

Целью данной работы является изучение биологической активности новых производных 4-ацил-4-оксо-2-(2-фениламинобензоил) гидразонобутановых кислот и выявление соединений, перспективных для дальнейших исследований в качестве анальгетических и противовоспалительных средств.

Объектами исследования служили 10 новых соединений, не описанных ранее в литературе: алкил-4-*R*-4-оксо-2-(2-фениламинобензоил) гидразонобутаноаты **1 а-в** и *N*-алкил(арил)-4-*R*-4-оксо-2-(2-фениламинобензоилгидразоно)бутанамиды **2 а-ж**. Все соединения получены на кафедре общей и органической химии ФГБОУ ВО ПГФА под руководством проф. Игидова Н.М.

Общая формула 4-ацил-4-оксо-2-(2-фениламинобензоил) гидразонобутановых кислот представлена на рис. 1.

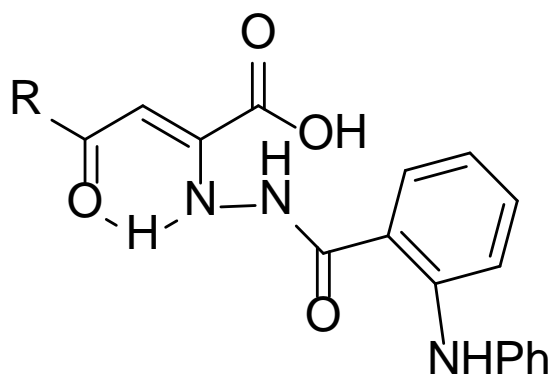


Рис.1 – Общая формула 4-ацил-4-оксо-2-(2-фениламинобензоил) гидразонобутановых кислот

Полученные соединения представляют собой желтые или светло-желтые мелкокристаллические вещества, не растворимые в воде и гексане, растворимые в диметилсульфоксиде, диметилформамиде, ацетоне, трудно растворимые в изопропиловом спирте, ацетонитриле.

Эксперименты по исследованию биологической активности полученных соединений проведены на базе исследовательской лаборатории кафедры физиологии ФГБОУ ВО ПГФА Минздрава России.

Животные, использованные в экспериментах, содержались в типовом виварии с естественным 12-часовым светотеневым циклом, при температуре воздуха $20 \pm 2^\circ\text{C}$. Их питание осуществлялось в соответствии с нормами кормов для экспериментальных животных. Содержание животных соответствовало правилам лабораторной практики при проведении доклинических исследований в РФ (ГОСТ ИСО/МЭК 17025-2009 Общие требования к испытательным лабораториям; ГОСТ 33044-2014 Принципы надлежащей лабораторной практики), Правилами надлежащей лабораторной практики Евразийского экономического союза в сфере обращения лекарственных средств / Решение Совета Евразийской экономической комиссии от 3 ноября 2016 г. № 81) и Приказу МЗ РФ №199н от 01.04.2016 г. «Об утверждении правил лабораторной практики» (GLP), с соблюдением Международных рекомендаций Европейской конвенции по защите позвоночных животных, используемых при

экспериментальных исследованиях (1997 г.) и требований этических стандартов [7, 8].

Оценка биологической активности осуществлялась в соответствии с требованиями Фармакологического комитета, изложенными в «Руководстве по проведению доклинических исследований лекарственных средств» [6]. В качестве эталонов сравнения были использованы типичные представители, а также современные высокоэффективные лекарственные средства соответствующих фармакологических групп.

Для первичной оценки антиноцептивной активности использован скрининговый метод термического раздражения «горячая пластина» [6]. Эксперименты выполнены на белых нелинейных мышах обоего пола массой 24–28 г. Контрольные и опытные группы состояли из 8–10 мышей. Животных помещали на нагретую до 54,0°C поверхность, окруженную цилиндром. Исследуемые соединения вводили внутрибрюшинно в виде взвеси в 1% крахмальном растворе в дозе 50 мг/кг за 30 минут до проведения теста. Регистрировали время с момента помещения на горячую поверхность до появления поведенческого ответа на ноцицептивную стимуляцию (облизывание задней лапы, отдергивание задней лапы, прыжковые реакции). Максимальное время тестирования не превышало 1 мин во избежание повреждения тканей. Критерием анальгетического эффекта считали достоверное увеличение латентного периода реакции после введения вещества. Контрольной группе животных вводили 1% крахмальным раствором в эквивалентных количествах. В качестве эталона сравнения использовали метамизол натрия (ООО «Фармхимкомплект», Россия) в дозе 50 мг/кг, вводимый аналогично исследуемым соединениям.

Для исключения седативного, миорелаксирующего или психотропного действия исследуемых соединений проведены исследования анальгетической активности методом химического раздражения брюшины «уксусные корчи» [6].
Дневник науки | www.dnevniknauki.ru | СМИ Эл № ФС 77-68405 ISSN 2541-8327

Специфическую болевую реакцию «корчи», сопровождающуюся характерными движениями животных (сокращения брюшных мышц, чередующиеся с их расслаблением, вытягивание задних конечностей и прогибание спины) вызывали внутрибрюшинным введением 0,75% раствора уксусной кислоты [4].

Исследования проведены на белых нелинейных мышах обоего пола массой 20–24 г. Каждое соединение исследовали на 10 животных. Исследуемые соединения вводили внутрибрюшинно в дозе 50 мг/кг в виде взвеси в 1% растворе крахмала. Через 30 минут вызывали характерные сокращения абдоминальных мышц животного внутрибрюшинным введением уксусной кислоты. Кислоту вводили в виде 0,75 % водного раствора в объеме 0,1 мл на 10 г массы животного. Подсчет «корчей» начинали сразу после введения кислоты и производили в течение 15 мин. Эффект оценивали по уменьшению количества «корчей» в процентах по сравнению с контрольными животными, которым внутрибрюшинно вводили эквивалентные количества 1% раствора крахмала. В качестве препаратов сравнения использовали метамизол натрия и нимесулид («Unimark Remedies», Индия) в дозе 50 мг/кг, которые вводились внутрибрюшинно.

Противовоспалительную активность (ПВА) изучали в опытах на белых нелинейных крысах обоего пола на модели каррагенинового отека, вызванного субплантарным введением раствора каррагенина. В каждую экспериментальную группу было включено по 10 животных массой 180–200 г. Исследуемые вещества в дозе 50 мг/кг вводили в виде взвеси в 1% растворе крахмала внутривентрально через атравматичный металлический зонд за 1 час до введения флогогенного агента [6]. Контрольным животным внутривентрально вводили 1% раствор крахмала в объеме, эквивалентном испытанной дозе соединения. Острую воспалительную реакцию (отек) воспроизводили субплантарным (под подошвенный апоневроз) введением 0,1 мл 1 % раствора каррагенина. Изменение объема стопы регистрировали

Дневник науки | www.dnevniknauki.ru | СМН Эл № ФС 77-68405 ISSN 2541-8327

ЭЛЕКТРОННЫЙ НАУЧНЫЙ ЖУРНАЛ «ДНЕВНИК НАУКИ»

онкометрически через 3 ч после индукции воспаления. Выраженность воспалительной реакции оценивали по увеличению объема в процентах по отношению к исходной величине. Эталонном сравнения служил нимесулид в дозе 50 мг/кг, вводимый аналогично изучаемым соединениям.

Противовоспалительный эффект оценивали по показателю торможения отека, который выражали в процентах к показателям контрольной группы [10]. Соединение считали эффективным при торможении отека не менее 30%.

Статистическую обработку результатов эксперимента проводили с использованием t-критерия Фишера-Стьюдента. Эффект считали достоверным при $p < 0,05$. [2].

Результаты первичного фармакологического скрининга по тесту «горячая пластина» представлены в таблице 1.

Таблица 1 – Антиноцицептивная активность соединений по тесту «горячая пластина»

Соединение	Латентный период оборонительного рефлекса, с	Изменение латентного периода, % к контролю	P по сравнению с контролем
1а	9,33±1,05	-18,01	>0,05
1б	7,80±0,79	-31,45	>0,05
1в	17,02±2,22	49,56	<0,05
2а	12,57±1,15	10,46	>0,05
2б	6,93±0,67	-39,10	>0,05
2в	12,03±1,03	5,71	>0,05
2г	16,83±2,86	47,89	<0,05
2д	8,80±0,99	-22,67	>0,05
2е	11,23±0,94	-1,31	>0,05
2ж	11,70±0,82	2,81	>0,05
Метамизол натрия	16,60±1,00	45,86	<0,05
Контроль	11,38±0,93	–	–

Установлено, что соединения **1в** и **2г** проявляют анальгетическую активность, достоверно увеличивая время латентного периода оборонительного рефлекса по сравнению с контролем. Активность соединений **1в** и **2г** сопоставима с эффектом препарата сравнения метамизола натрия. Остальные

ЭЛЕКТРОННЫЙ НАУЧНЫЙ ЖУРНАЛ «ДНЕВНИК НАУКИ»

соединения в дозе 50 мг/кг не оказывают статистически значимого анальгетического действия по методу «горячей пластины».

Таблица 2 – Антиноцицептивная активность соединений по тесту «уксусные корчи»

Соединение	Количество корчей	Уменьшение количества корчей, % к контролю	P по сравнению с контролем
1а	12,66±1,84	58,6	<0,05
1б	42,00±5,24*	-37,25	>0,05
1в	6,17±1,07*	79,8	<0,05
2а	10,60±4,30	65,4	<0,05
2б	31,67±1,94*	3,5	>0,05
2в	5,58±1,12*	81,8	<0,05
2г	11,40±4,47	62,7	<0,05
2д	9,33±1,39*	69,5	<0,05
2е	4,75±1,40*	84,5	<0,05
2ж	14,87±2,60	51,4	<0,05
Метамизол натрия	14,00±0,50	54,2	<0,05
Нимесулид	7,50±2,20	75,5	<0,05
Контроль	30,60±2,20	–	–

*- различие достоверно по сравнению с метамизолом натрия при $p < 0,05$

Исследования антиноцицептивной активности с использованием теста «уксусные корчи» показали (таблица 2), что все соединения, за исключением **1б** и **2б**, обладают анальгетической активностью. Соединения **1а**, **2а**, **2г** и **2ж** оказывают анальгетический эффект, сравнимый с эффектом метамизола натрия. Соединения **1в**, **2в**, **2д** и **2е** превосходят по анальгетической активности метамизол натрия и сопоставимы с нимесулидом.

Все исследованные соединения являются структурными аналогами и отличаются видом заместителя в арильной части молекулы. Был проведен предварительный анализ влияния структуры заместителя на анальгетическую активность соединений. Установлено, что введение галогенов, являющихся электроноакцепторными заместителями, в пара-положение фенольного кольца позволяет получить соединения, оказывающие выраженный анальгетический

ЭЛЕКТРОННЫЙ НАУЧНЫЙ ЖУРНАЛ «ДНЕВНИК НАУКИ»

эффект. Так, соединение **2д**, имеющее атом хлора в положении 4 фенольного кольца, проявляет анальгетическую активность на уровне нимесулида. Из соединений, содержащих электронодонорные заместители в фенольном кольце, выраженное анальгетическое действие, сопоставимое с активностью нимесулида, обнаружено у соединений **1в**, **2в** и **2г**, которые имеют этоксигруппу (C_2H_5O-) в данной части молекулы, а также у соединения **2б**, имеющего метильный фрагмент (CH_3-) в положении 4 фенольного кольца. Активность этих соединений достоверно отличается от эффекта соединения **1б**, содержащего (4-трет-бутил-) в качестве заместителя в арильной части молекулы.

Результаты изучения противовоспалительной активности соединений на модели асептического воспаления, индуцированного каррагенином, представлены в таблице 3.

Таблица 3 – Противовоспалительная активность соединений

Соединение	Объем стопы до введения флогогена, мл	Объем стопы через 3 ч, мл	Прирост объема стопы через 3 ч, %	Торможение отека через 3 ч, %
1а	1,08±0,06	1,54±0,06	42,86±3,71	35,52
1б	1,07±0,03	1,52±0,07	41,42±4,12	37,23
1в	1,06±0,04	1,52±0,09	42,48±3,56	36,09
2а	1,12±0,04	1,60±0,06	43,88±5,97	33,98
2б	1,09±0,06	1,51±0,10	38,60±4,90	41,48
2в	1,31±0,07	1,69±0,15	44,56±3,52	32,96
2г	1,14±0,04	1,54±0,06	32,59±1,74	50,97
2д	1,06±0,02	1,56±0,04	47,94±5,97	27,88
2е	1,11±0,05	1,74±0,09	57,64±7,30	12,83
2ж	1,39±0,07	1,92±0,09	38,30±4,41	42,38
Нимесулид	1,14±0,05	1,53±0,07	33,90±6,78	48,99
Контроль	0,77±0,05	1,26±0,08	66,47±10,19	-

Как видно из данных таблицы 3, соединения **2д** и **2е** в дозе 50 мг/кг не проявляют противовоспалительного действия на модели каррагенинового отека. У остальных изученных соединений обнаружена выраженная

противовоспалительная активность, не уступающая эффективности препарата сравнения нимесулида.

Представляет интерес анализ влияния вида заместителя в структуре соединений на их противовоспалительную активность с целью выявления зависимости «структура–биологическая активность». Поскольку объем исследуемой выборки небольшой, можно сделать только предположительные выводы.

Так, наиболее выраженная противовоспалительная активность обнаружена у соединений, содержащих электронодонорный или электроноакцепторный заместитель в 4 положении фенольного кольца. Не проявляют противовоспалительного действия на модели каррагенинового отека производные, содержащие в амидной части молекулы конденсированную систему тиофена.

Проведенные исследования биологической активности новых производных ароилпировиноградных кислот позволили выбрать соединения, перспективные для дальнейшего изучения. Это соединение **1в**, которое проявляет анальгетический эффект на уровне нимесулида и одновременно обладает противовоспалительным действием, сопоставимым с активностью нимесулида. Кроме того, целесообразно дальнейшее изучение биологической активности соединения **2г**, которое проявило наиболее выраженное противовоспалительное действие (торможение отека составило 50,97%), умеренную анальгетическую активность, выявленную с использованием тестов «горячая пластина» и «уксусные корчи».

Таким образом, анализ экспериментальных данных позволяет сделать выводы о перспективности дальнейшего изучения биологической активности и поиска высокоэффективных соединений среди производных 4-ацил-4-оксо-2-(2-фениламинобензоил)гидразобутановых кислот с целью дальнейшего

углубленного изучения их фармакологических свойств и создания на их основе новых лекарственных средств и внедрения их в медицинскую практику.

Библиографический список

1. Баринов А.Н. Комплексное лечение боли // Рус. мед. журн. – 2007. – Т. 15, № 4. –С. 215–220.
2. Беленький М.Л. Элементы количественной оценки фармакологического эффекта / М.Л. Беленький – 2-е изд.- Л., 1963 -152 с.
3. Боль. Болевая чувствительность. [Электронный ресурс] – Режим доступа – URL: <https://www.medeffect.ru/so/headache-0002.shtml> (дата обращения: 15.06.2019).
4. Бондаренко, Д.А. In vivo модели для изучения анальгетической активности / Д.А. Бондаренко, И.А. Дьяченко, Д.И. Скобцов, А.Н. Мурашев // Биомедицина. – 2011. – № 2 – С. 84–94.
5. Каратеев, А.Е. Применение нестероидных противовоспалительных препаратов. Клинические рекомендации. Москва, ИМА–ПРЕСС, 2009, 167 с. [Электронный ресурс] / А.Е. Каратеев, Н.Н. Яхно, Л.Б. Лазебник [и др.] // РМЖ. – Режим доступа – URL: https://www.rmj.ru/articles/revmatologiya/Kak_pravilno_isplayzovaty_nesteroidnye__protivovospalitelnyye_preparaty/#ixzz5sXex5csN (дата обращения 15.06.2019).
6. Миронов, А.Н. Руководство по проведению доклинических исследований лекарственных средств / ред. А.Н. Миронов. – Ч. 1. – М.: Гриф и К, 2012. – 944 с.
7. Национальный стандарт РФ ГОСТ Р 53434 – 2009. Принципы Надлежащей Лабораторной практики. Утвержден и введен в действие Приказом Федерального агентства по техническому регулированию и метрологии от 2 декабря 2009 г. № 544-ст.

8. Правила надлежащей лабораторной практики / Приказ Министерства здравоохранения Российской Федерации от 1 апреля 2016 г. №199н. Зарегистрировано в Министерстве юстиции Российской Федерации 15 августа 2016 г. Регистрационный N 43232.
9. Соснов, А.В. Сильнодействующие ненаркотические анальгетики как направление развития фармацевтики /А.В. Соснов, С.В. Садовников, Ф.М. Семченко [и др.] // Разработка и регистрация лекарственных средств. – 2016. – №1. – С. 196 – 206.
- 10.Тринус, Ф.П. Методические рекомендации по экспериментальному (доклиническому) изучению нестероидных противовоспалительных фармакологических веществ./ Ф.П. Тринус, Б.М., Клебанов, В.И. Кондратюк. М., 1983. – С. 3-5.
- 11.Трухан Д.И., Иванова Д.С. Лечение болевого синдрома на амбулаторно-поликлиническом этапе. Выбор анальгетика с позиций коморбидности и лекарственной безопасности // Медицинский совет.– №20. – 2017. – С. 56–64.
- 12.Чернов, И.Н. Синтез, свойства и биологическая активность новых производных ароилпировиноградных кислот / И.Н.Чернов Автореферат диссертации на соискание ученой степени кандидата фармацевтических наук. Пермь, 2015. – 22 с.
- 13.Чернов, И.Н. Синтез и анальгетическая активность N-замещенных 4-арил-2,4-диоксо-3-(2-фенилгидразоно)бутанамидов. [Электронный ресурс] / И.Н. Чернов, Е.В. Буканова, Р.Р. Махмудов [и др.] // Современные проблемы науки и образования. – 2014. – № 1. – Режим доступа – URL: [http:// www.science-education.ru/115-11962](http://www.science-education.ru/115-11962). (дата обращения 15.06.2019).

Оригинальность 84%