

ПРОТИВОВОСПАЛИТЕЛЬНЫЕ СРЕДСТВА

ФАРМАКОЛОГИЧЕСКАЯ АКТИВНОСТЬ И ТОКСИЧНОСТЬ

(S)-β-[4-АЛЛИЛ-3-ПРОПИЛ-5-ТИОКСО-1,2,4-ТРИАЗОЛ-1-ИЛ]-α-АЛАНИНА

А. Г. Жамгарян¹, С. И. Павлова³, С. Б. Погосян¹, А. В. Гелчарян³,
А. В. Хачатурян¹, М. Г. Баласанян¹

Основываясь на сведениях о связи между структурой и фармакологической активностью производных небелковых аминокислот, провели исследование противовоспалительной и антиноцицептивной активности нового соединения из группы триазолов – (S)-β-[4-аллил-3-пропил-5-тиоксо-1,2,4-триазол-1-ил]-α-аланина. Полученные данные свидетельствуют о выраженной противовоспалительной и антиноцицептивной активности, низкой цитотоксичности и малой острой токсичности соединения.

Ключевые слова: небелковые аминокислоты; противовоспалительная активность; антиноцицептивная активность; цитотоксичность.

ВВЕДЕНИЕ

Нестероидные противовоспалительные средства (НПВС) — одна из наиболее широко применяемых групп лекарственных средств. Несмотря на большое количество препаратов этой группы, поиск новых средств остается одним из важных направлений фармакологии, поскольку НПВС не лишены побочных эффектов, наиболее характерным из которых является ulcerогенное действие. Для снижения ulcerогенного эффекта неселективных НПВС применяют различные подходы, одним из которых является получение нейтральных молекул с менее выраженными кислотными свойствами [7]. Так, согласно литературным данным [6], повреждающее действие на слизистую желудка большинства НПВС обусловлено не только основным механизмом их действия, но и кислотными свойствами этих соединений. Исходя из этого, осуществлен синтез небелковых аминокислот, являющихся амфотерными производными арилпропионовой кислоты, которые однако содержат необходимую фармакофорную группу известных НПВС.

Проведенные ранее исследования показали, что полученные небелковые аминокислоты, производные арилпропионовой кислоты, проявляют выраженную противовоспалительную и антиноцицептивную активность [1]. Наибольшая ЦОГ-ингибирующая активность *in vitro* выявлена у нафтил- и триазолпроизводных. Учитывая данные о связи между структурой и действием полученных небелковых аминокислот, син-

тезировали новое триазолпроизводное 2-амино-3-арил-пропионовой кислоты. Изучение его фармакологической активности и токсического действия проведено в данной работе.

МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Синтез (S)-β-[4-аллил-3-пропил-5-тиоксо-1,2,4-триазол-1-ил]-α-аланина (NPAА 70) осуществлён в НПЦ АрмБиотехнологии РА. Согласно проведённым анализам, химическая (ТСХ, ПМР) и энантиомерная (ГЖХ, ВЭЖХ) чистота полученного соединения превышает 98 % [4].

Определение противовоспалительной и антиноцицептивной активности выполнено на белых беспородных половозрелых крысах-самцах массой 180 – 220 г, которых содержали в условиях вивария в соответствии с Правилами проведения работ с использованием экспериментальных животных. Эксперименты одобрены этическим комитетом ЕрГМУ. Контрольной группе крыс вводили изотонический раствор хлорида натрия. Исследуемым группам животных внутривентриально вводили растворы синтезированного соединения и препаратов сравнения — кетопрофена и диклофенака натрия (USP стандарт, чистота 99,8 %) в дозе 10 мг/кг.

Противовоспалительная активность. Противовоспалительную активность препаратов оценивали на модели острого воспаления уха крыс, индуцированного ксилолом. Животным, разделенным на 3 группы (по 9 крыс в каждой группе), вводили растворы исследуемого соединения, диклофенака натрия, а контрольной группе — изотонический раствор хлорида натрия. Через 30 мин после введения соответствующих соединений крысам под наркозом (4 % раствор хлоралгидрата, 4 мг/кг внутривентриально) апплицировали 0,03 мл ксилолом с внутренней и внешней стороны правого уха. Левое ухо использовали в качестве контро-

¹ Ереванский медицинский университет им. М. Гераци, Армения, 0025, Ереван, ул. Корюна 2, зав. кафедрой А. Г. Жамгарян.

² Научно-производственный центр НАН РА “АрмБиотехнология”, Армения, 0056, Ереван, ул. Гюрджяна 14, директор А. С. Сагиян.

³ ФГБОУ ВО Чувашский государственный университет им. И. Н. Ульянова, Россия, 428015, Чебоксары, Московский пр-т, 15.

ля-сравнения. Через 1 ч животных забивали, отбирали участки ушей диаметром 11 мм и взвешивали. Оценку противовоспалительной активности препарата проводили по разнице массы правого и левого уха.

Антиноцицептивная активность. Антиноцицептивную активность определяли с помощью теста “отдергивания хвоста” на Analgesy-meter LE 7106, (Panlab, Germany) согласно методу D’Amour and Smith по латентному времени отдергивания хвоста на 30, 60, 90 и 120 мин после введения водных растворов соединения и препарата сравнения кетопрофена в дозе 10 мг/кг. Во избежание ожогов тканей максимальное время отдергивания хвоста не превышало 20 с.

Прямая цитотоксичность соединения *in vitro*. Для оценки прямой цитотоксичности использован МТТ-тест, основанный на способности митохондриальных дегидрогеназ живой клетки конвертировать водорастворимый 3-(4,5-диметилтиазол-2-ил)-2,5-дифенил-2Н-тетразолиум бромид (МТТ) в формазан, который выпадает в виде кристаллов. В настоящей работе МТТ-тест проводили с использованием клеток, прилипающих к подложке, по методике, описанной ранее [8]. Клетки опухолевой линии HeLa, полученные из коллекции банка, глубокозамороженных клеточных культур ГУ НИИ вирусологии им. Д. И. Ивановского, рассеивали в лунки 96-луночного плоскодонного планшета для культур клеток (CorningCostar, США) в концентрации $2 \cdot 10^4$ /лунка и инкубировали при 37 °С, 100 % влажности и 5 % содержании углекислого газа в окружающем воздухе в среде RPMI-1640 с 10 % фетальной телячьей сыворотки, 2 мМ L-глутамин и антибиотиков. После формирования монослоя производили замену культуральной среды на среду с низким содержанием сыворотки (1 %) для стационарирования культуры и вносили исследуемый агент. Длительность инкубации с агентом в различных концентрациях составляла 24–48 ч. За 4 ч до окончания инкубации в каждую лунку вносили 20 мкл раствора МТТ (5 мг/мл). Далее супернатант осторожно удаляли, в каждую лунку добавляли по 100 мкл ДМСО. Осадок ресуспензировали и растворяли в течение 15 мин, инкубируя в темноте при комнатной температуре. Показания оптической плотности считывали на микроплан-

шетном ИФА-ридере Immunochem 2100 (США) при 492 нм. Долю жизнеспособных клеток рассчитывали по следующей формуле:

$$\% \text{ жизнеспособных клеток} = \left(\frac{OD_{\text{П}} - OD_{\text{С}}}{OD_{\text{К}} - OD_{\text{С}}} \right) \cdot 100 \%,$$

где $OD_{\text{К}}$ — оптическая плотность в контрольных лунках; $OD_{\text{П}}$ — оптическая плотность в опытных пробах; $OD_{\text{С}}$ — оптическая плотность контроля среды.

Острая токсичность соединения *in vivo*. Определение показателей острой токсичности соединения проводили на белых половозрелых крысах обоих полов массой 180–220 г (по 6 крыс в исследуемой и контрольной группах), содержащихся в одинаковых условиях. После однократного введения внутрь водных растворов вещества в дозах 1000, 1500 и 2000 мг/кг с помощью металлического аграмматического зонда наблюдали действие соединения в течение 15 дней. Критериями токсичного действия NРАА-70 служили: общее состояние животных, изменение поведения, состояние кожных покровов и слизистых оболочек, динамика изменения массы тела, а также количество и время падения животных. По завершении исследований (через 15 сут) животные всех экспериментальных групп подвергнуты декапитации с целью патологоанатомической оценки внутренних органов.

Статистическую обработку данных проводили параметрическими методами, нормальность распределения проверяли по Колмогорову — Смирнову. Для оценки достоверности различий при сравнении 2 групп использовали *t*-критерий Стьюдента, а для сравнения нескольких выборок — *F*-критерий Фишера с использованием метода многофакторного дисперсионного анализа (ANOVA) для повторных измерений. Расчеты проводили с помощью программы SPSS Statistics 20. Результаты представлены в виде $M \pm m$, где M — среднее арифметическое значение величин, m — стандартная ошибка среднего. Проверку статистических гипотез проводили при критическом уровне значимости $p = 0,05$.

Латентное время отдергивания хвоста у крыс на 0, 30, 60, 90 и 120 мин после внутрибрюшинного введения исследуемого соединения (NРАА 70) и препарата сравнения кетопрофена в дозе 10 мг/кг ($M \pm m$)

Время после введения, мин	Латентное время отдергивания хвоста, с		
	контроль — 0,9 %, раствор NaCl	NРАА 70	кетопрофен
0	6,15 ± 0,41	6,075 ± 0,3	5,225 ± 0,16
30	5,8 ± 0,38	8,3 ± 0,39*	5,81 ± 0,23**
60	5,9 ± 0,39	9,64 ± 0,58*	6,35 ± 0,28**
90	5,1 ± 0,29	8,85 ± 0,35*	6,025 ± 0,29**
120	5,08 ± 0,17	7,225 ± 0,45*	5,15 ± 0,27**

* $p < 0,0001$; $F = 97,8$, $F_{\text{кр}} = 3,98$, $n = 8$

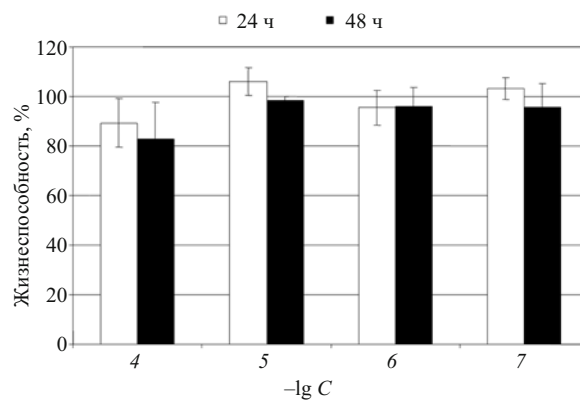
** $p > 0,05$; $F = 0,31$, $F_{\text{кр}} = 3,98$, $n = 8$ по сравнению с контролем.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Проведенные эксперименты по исследованию фармакологической активности соединения свидетельствуют о выраженной противовоспалительной активности (S)-β-[4-аллил-3-пропил-5-тиоксо-1,2,4-триазол-1-ил]-α-аланина. Аппликация ксилотола у контрольной группы крыс приводит к развитию острого отека, при котором разница масс правого (воспаленного) и левого (интактного) уха составляет $80,77 \pm 6,05$ мг. Внутривнутрибрюшинное введение соединения в дозе 10 мг/кг предотвращает развитие отека, при этом наблюдаемая разница масс составляет $(24,2 \pm 5,58)$ мг, что свидетельствует об уменьшении отека на 70 % по сравнению с контролем ($p < 0,05$). В тех же условиях введение диклофенака натрия в дозе 10 мг/кг предотвращает увеличение массы уха крыс на 63,8 % по сравнению с контролем, при котором разница масс правого и левого уха составляет $(29,25 \pm 5,18)$ мг ($p < 0,05$). Данные, полученные в *in vivo* исследованиях противовоспалительной активности (S)-β-[4-аллил-3-пропил-5-тиоксо-1,2,4-триазол-1-ил]-α-аланина, согласуются с полученными нами ранее результатами *in vitro* исследований, согласно которым соединение проявляет неселективную ЦОГ-ингибирующую активность с $IC_{50(ЦОГ2)} 0,9$ мкмоль [3].

Изучение антиноцицептивных свойств (S)-β-[4-аллил-3-пропил-5-тиоксо-1,2,4-триазол-1-ил]-α-аланина показало, что после внутривнутрибрюшинного введения соединения увеличивается латентное время отдергивания хвоста уже на 30 мин после введения (таблица), составляя 36,6 % ($p < 0,0001$), по сравнению с базовым значением. Указанный показатель продолжает возрастать, достигая максимального значения к 60 мин после введения соединения, когда наблюдается прирост латентного времени по сравнению с базовым значением на 58,7 % ($p < 0,0001$). При этом статистически достоверное повышение времени отдергивания хвоста регистрируется также через 90 и 120 мин после введения (S)-β-[4-аллил-3-пропил-5-тиоксо-1,2,4-триазол-1-ил]-α-аланина, составляя соответственно 45,7 и 18,9 % ($p < 0,0001$) по сравнению с данным показателем до введения соединения.

Нами проведено сравнение антиноцицептивной активности исследуемого соединения с активностью препарата из группы арилпропионовой кислоты-кетопрофена. Внутривнутрибрюшинное введение кетопрофена (10 мг/кг) не приводит к статистически достоверным изменениям времени отдергивания хвоста у крыс, что согласуется с литературными данными об отсутствии активности в тесте “отдергивания хвоста” у препаратов с периферическим механизмом антиноцицептивного действия при их внутривнутрибрюшинном введении [2]. Эти данные позволяют предположить наличие у (S)-β-[4-аллил-3-пропил-5-тиоксо-1,2,4-триазол-1-ил]-



Экспозиция М6 в течение 24 – 48 ч с клетками HeLa *in vitro*; по оси ординат — жизнеспособность клеток в процентах, по оси абсцисс — отрицательный логарифм концентрации соединения.

α-аланина также центральных механизмов антиноцицептивной активности.

Исследования цитотоксичности (S)-β-[4-аллил-3-пропил-5-тиоксо-1,2,4-триазол-1-ил]-α-аланина в условиях *in vitro* проведено в диапазоне концентраций $10^{-4} - 10^{-7}$ моль/л. При экспозиции в течение 24 – 48 ч с исследуемым агентом жизнеспособность клеток достоверно не отличалась от контрольных значений. В концентрации 10^{-4} моль/л наблюдалась лишь статистически недостоверная тенденция к уменьшению жизнеспособности в пределах 10 – 20 % (рисунок).

Данные о низкой цитотоксичности соединения подтверждены исследованиями острой токсичности аминокислоты *in vivo*. Так, однократное введение вещества внутрь в дозах 1000, 1500 и 2000 мг/кг не приводит к гибели животных экспериментальной группы в течение исследуемого периода. Анализ данных не выявил каких-либо статистически достоверных различий в динамике массы тела между опытными и контрольными животными. Состояние внутренних органов (головного мозга, щитовидной железы, сердца, легких, желудка, тонкой и толстой кишки, печени, поджелудочной железы, почек, надпочечников, селезенки) не отличалось от контроля. Таким образом, результаты токсикометрии, данные наблюдений за экспериментальными животными на протяжении 15 дней после однократного введения, а также данные некропсии позволяют отнести исследуемое соединение к 3 классу умеренно токсичных соединений согласно ГОСТ 12.1.007–76 и IV категории токсичности по GHS [5] (LD_{50} более 2000 мг/кг).

ВЫВОДЫ

1. (S)-β-[4-аллил-3-пропил-5-тиоксо-1,2,4-триазол-1-ил]-α-аланин проявляет противовоспалительную активность на модели острого воспаления уха крыс.
2. Исследуемое соединение, в отличие от кетопрофена, проявляет выраженную антиноцицептивную ак-

тивность в тесте “отдергивания хвоста” при внутрибрюшинном введении.

3. Результаты исследования токсичности соединения в условиях *in vitro* и *in vivo* свидетельствуют о его низкой токсичности и позволяют отнести к 3 классу токсичности (умеренно токсичные соединения) согласно ГОСТ 12.1.007–76.

ЛИТЕРАТУРА

1. А. Г. Жамгарян, М. Г. Баласанян, А. С. Сагиян, С. А. Григорян, *Высокие технологии. Фундаментальные и прикладные исследования в физиологии и медицине*, Т. 2, Санкт-Петербург (2013), сс. 233 – 237.
2. A. Dogrul, S. E. Gulmez, M. S. Deveci, et al., *Anesth. Analg.*, **104**(4), 927 – 935 (2007).

3. A. G. Zhamharyan, M. G. Balasanyan, L. G. Zhamharyan, et al., *Materials of 3rd International Conference on Medicinal Chemistry and CADD*, **4**(12), USA (2014), pp. 32 – 33.
4. A. S. Saghyan, H. M. Simonyan, S. G. Petrosyan, et al., *Z. Naturforsch.*, № 69, 451 – 460 (2014).
5. *Globally harmonized system of classification and labelling of chemicals (GHS)*, United Nations, Yew York, Geneva (2011).
6. L. M. Lichtenberger, *Biochem. Pharmacol.*, **6**(15), 631 – 637 (2001).
7. M. Gaba, Ch. Mohan, *Med. Chemistry*, **5**(2), 58 – 63 (2015).
8. M. Nicks, M. Otto, *J. Immunol. Methods*, **130**(1), 149 – 151 (1990).

Поступила 03.02.17

PHARMACOLOGICAL ACTIVITY AND TOXICITY OF (S)- β -[4-ALLYL-3-PROPYL-5-THIOXO-1,2,4-TRIAZOL-1-YL]- α -ALANINE

A. G. Zhamgaryan^{1,2}, S. I. Pavlova³, S. B. Pogosyan¹, A. V. Gelcharyan³,
A. V. Khachatryan¹, and M. G. Balasanya¹

¹ M. Heratsi Yerevan State Medical University, Koryun str. 2, 0025 Yerevan, Armenia

² Research and Production Center “Armbiotechnology”, National Academy of Sciences of Armenia, Gyurjan str. 14, 0056 Yerevan, Armenia

³ Department of Pharmacology, Clinical Pharmacology and Biochemistry, Chuvash State University, Moskovskii prosp. 15, Cheboksary, Chuvash Republic, 428015 Russia

The anti-inflammatory and anti-nociceptive activities of new triazole derivative-(S)- β -[4-allyl-3-propyl-5-thioxo-1,2,4-triazol-1-yl]- α -alanine representing – group of triazoles have been studied based on analysis of the structure – anti-inflammatory activity relationship in non-protein amino acids. The obtained data show evidence that this compound possesses significant anti-inflammatory and anti-nociceptive activity and has low cytotoxicity and acute toxicity, which can be used for future development of new effective anti-inflammatory drugs – derivatives of this chemical group.

Keywords: non-protein amino acids; anti-inflammatory activity; anti-nociceptive activity; cytotoxicity.