

БИОЛОГИЧЕСКАЯ АКТИВНОСТЬ НОВЫХ ПРОИЗВОДНЫХ ТРИАЗОЛОВ

Л.Н. Овсянникова*, **Б.Ю. Лалаев**, кандидат химических наук, **И.П. Яковлев**, доктор химических наук, профессор, **Н.А. Анисимова**, кандидат биологических наук, **Е.Н. Кириллова**, кандидат химических наук, **Г.В. Ксенофонтова**, кандидат химических наук
Санкт-Петербургская химико-фармацевтическая академия;
Российская Федерация, 197376, Санкт-Петербург, ул. проф. Попова, д. 14

Введение. Исследование полученных ранее 1,3-оксазинов показало, что они обладают противовоспалительной, седативной, антимикробной активностью. Биологическая активность продуктов их взаимодействия с бинуклеофильными азотсодержащими реагентами не была изучена.

Цель работы – изучение биологической активности синтезированных новых производных 1,2,4-триазола.

Материал и методы. Прогноз вероятных видов биологической активности осуществляли с помощью компьютерной программы PASS. Острую токсичность производных 1,2,4-триазола определяли в эксперименте на нелинейных белых мышцах-самцах. Противогрибковую активность устанавливали с учетом минимальной подавляющей концентрации исследуемых соединений. Антимикробный эффект определяли по отсутствию роста тест-микроорганизма в мясо-пептонном бульоне при минимальной концентрации препарата, а характер противомикробного действия (бактериостатическое или бактерицидное) – при отсутствии роста на плотной питательной среде. Противовоспалительную активность изучали на модели «острый формалиновый отек лапы» у крыс. Анальгезирующую активность устанавливали на модели уксуснокислых «корчей» у мышей.

Результаты. 1,2,4-триазолы были отнесены к классу нетоксичных веществ (LD_{50} – от 1250 до 2000 мг/кг). По противогрибковой и антибактериальной активности 1,2,4-триазолы уступали препаратам сравнения. Противовоспалительное действие было немного ниже препарата сравнения, зато триазолы имели очень низкую токсичность. Анальгезирующая активность у исследуемых соединений была выше препарата сравнения.

Заключение. Синтезированные новые производные 1,2,4-триазола нетоксичны и обладают выраженной противовоспалительной и анальгезирующей активностью.

Ключевые слова: 1,2,4-триазолы, биологическая активность, программа PASS, острая токсичность, противогрибковая, противомикробная, противовоспалительная, анальгезирующая активность.

*E-mail: lilia.ovsyannikova@pharminnotech.com

ВВЕДЕНИЕ

В настоящее время исследования в области химии биологически активных азидов занимают одно из ведущих мест в химии гетероциклических соединений. Наиболее изученная группа среди диазидов – производные пиримидинов [1]. Но ненасыщенные оксопроизводные 6*H*-1,3-оксазин-6-оны изучены недостаточно.

Многие 1,3-оксазин-6-оны используются в качестве исходных соединений для получения разнообразных ациклических и гетероциклических систем, синтез которых другими методами невозможен или многостадийен. Поэтому поиск новых биологически активных веществ (БАВ) среди продуктов взаимодействия 2,5-замещенных-4-гидрокси-6*H*-1,3-оксазин-6-онов с *N*-нуклеофильными реагентами весьма актуален.

Ранее были получены 1,3-оксазины, исследование которых показало, что они обладают противовоспалительной, седативной, антимикробной активностью [2–5]. Однако биологическая активность продуктов их взаимодействия с бинуклеофильными азотсодержащими реагентами не была изучена.

Производные 1,2,4-триазолов (III) были получены (см. рисунок) реакцией 4-гидрокси-6*H*-1,3-оксазин-6-она (I) с 2,4-дигидразинил-6-метилпиримидином (II) в среде безводного метилового спирта без нагревания при постоянном перемешивании в течение 40–48 ч. Полученный осадок отфильтровывали и промывали небольшим количеством этилацетата. Выход продуктов составил 80–87%.

Строение полученных 1,2,4-триазолов доказано физико-химическими методами анализа: ЯМР ¹H, ¹³C, ИК- и УФ-спектроскопии.

Цель работы – изучение биологической активности синтезированных новых производных 1,2,4-триазола.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ

На 1-м этапе исследования *in vivo* полученных соединений был осуществлен прогноз вероятных видов

биологической активности с помощью компьютерной программы PASS (Prediction of Activity Spectra for Substances) используя веб-сервис <http://pharmaexpert.ru/passonline>.

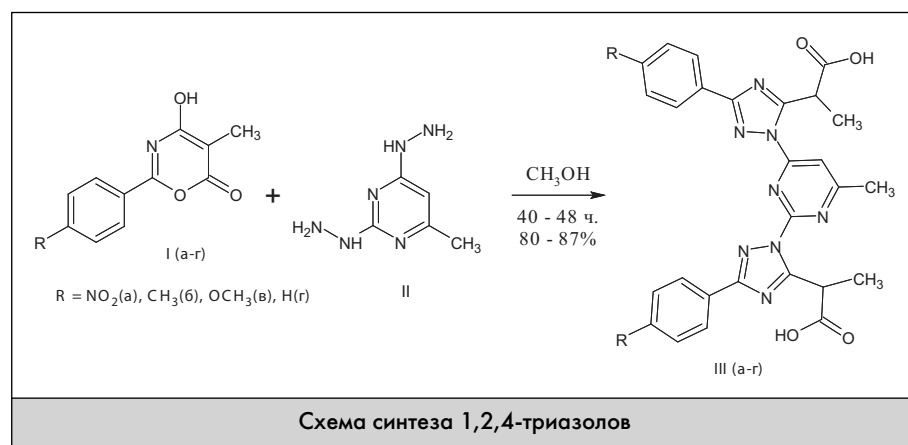
Острую токсичность синтезированных производных 1,2,4-триазола определяли на нелинейных белых мышцах-самцах массой тела 18–20 г. Животных распределяли на равные по численности и массе тела группы, по 10 животных в каждой. Исходные растворы производных 1,2,4-триазолов готовили в 50% водном диметилсульфоксиде из-за их ограниченной растворимости в воде. Водные суспензии соединений, стабилизированные твином-80, вводили животным однократно внутривентриально в интервале доз 50–2000 мг/кг. Наблюдение осуществляли в течение 72 ч. Выживаемость животных определяли через 24 и 48 ч от момента введения исследуемого соединения. Регистрировали развитие основных симптомов и время гибели животных. Расчет среднесмертельных доз LD₅₀ веществ проводили экспресс-методом по Прозоровскому [6].

Противогрибковую активность устанавливали методом двукратных серийных разведений на жидкой питательной среде Сабуро с последующим высевом на плотную питательную среду для определения минимальной подавляющей концентрации (МПК) исследуемых соединений. В качестве тест-культуры использовали штамм грибов *C. albicans* ATCC 885-653 (из коллекции культур Санкт-Петербургской клиничко-фармацевтической академии (СПХФА)).

Для приготовления взвеси дрожжевых культур использовали 2 суточные культуры, выросшие на плотной питательной среде Сабуро. Готовили взвесь по стандарту Мак Фарланда (2·10⁸ КОЕ/мл), затем полученную суспензию разводили до концентрации 10⁵ КОЕ/мл. Посевы выращивали в течение 2 сут.

Определение антибактериальной активности проводили методом двукратных серийных разведений в жидкой питательной среде – мясо-пептонном бульоне (МПБ) с последующим высевом на плотную питательную среду – мясо-пептонный агар (МПА). В качестве тест-микроорганизмов были выбраны *Staphylococcus aureus* (*St. aureus*) штамм P209 и *Escherichia coli* штамм ATCC25922. Микробная нагрузка составляла 1000 кл/мл.

Для приготовления взвеси бактериальных культур использовали 2-суточные культуры, выращенные на МПА. Готовили взвесь по бактериальному стандарту мутности Мак Фарланда (2·10⁸ КОЕ/мл), затем полученную суспензию разводили



ли до концентрации 10^6 КОЕ/мл и вносили по 0,1 мл в каждую пробирку ряда. Микробная нагрузка составляла 10^5 КОЕ/мл.

Бактериальные культуры выращивали в течение 24 ч при температуре 37°C. Антимикробный эффект определяли по отсутствию роста тест-микроорганизма в МПБ при минимальной концентрации препарата, а характер противомикробного действия (бактериостатическое или бактерицидное) – при отсутствии роста на плотной питательной среде.

Противовоспалительную активность изучали на скрининговой модели «острый формалиновый отек лапы» у крыс. Эксперимент выполняли на белых крысах женского пола массой $170,0 \pm 1,2$ г. Острый воспалительный отек вызывали субпланарным введением (под подошвенный апоневроз) в заднюю правую лапку крысы 0,1 мл 2% водного раствора формалина. Исследуемые нативные растворы 1,2,4-триазолов вводили крысам внутрибрюшинно в дозе 1/10 от LD_{50} , которая составляла 125–200 мг/кг. Препарат сравнения – диклофенак – вводили аналогично в дозе 25 мг/кг. Выраженность отека оценивали с учетом объема вытесненной воды после погружения лапы в специальный резервуар. Полученные от каждого животного результаты усредняли в пределах группы и рассчитывали процент угнетения воспаления в опытной группе относительно контрольной.

Анальгезирующую активность 1,2,4-триазолов устанавливали на модели уксуснокислых «корчей» у мышей. Вещества вводили однократно внутрибрюшинно в дозе 1/10 от LD_{50} , которая составляла 125–200 мг/кг. Препарат сравнения – метамизол натрия – вводили аналогично в дозе 25 мг/кг. Контрольные животные получали дистиллированную воду. Химическое раздражение вызывали внутрибрюшинно введением 3% раствора уксусной кислоты. Исследуемые соединения вводили за 40 мин до введения уксусной кислоты. Подсчитывали количество корчей у каждой мыши в течение 20 мин.

Статистическая обработка данных проводилась с помощью пакета прикладной программы Microsoft Excel и экспресс-методом по Прозоровскому [6].

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЯ

Результаты предварительного скрининга биологической активности, проведенные с помощью программы PASS, показали противовоспалительную активность с вероятностью ($P_a > 0,6$), противогрибковую, противомикробную с вероятностью ($P_a > 0,35, 0,37$ соответственно) и анальгезирующую активность с вероятностью ($P_a > 0,8$). Дальнейшим этапом работы стало экспериментальное подтверждение данных видов активности.

В экспериментах была установлена острая токсичность при внутрибрюшинном введении. Для 1,2,4-триазолов LD_{50} составила от 1250 до 2000 мг/кг, поэтому соединения были отнесены к классу нетоксичных веществ [7].

Минимальные ингибирующие концентрации 1,2,4-триазолов при определении противогрибковой активности составили 125–250 мкг/мл, при исследовании антибактериальной активности для *E. coli* и *St. aureus* – от 64 до 500 мкг/мл. В обоих случаях в активности они уступали препаратам сравнения: для флуконазола – 16 мкг/мл (противогрибковая активность), для стрептомицина – 12,5 мг/мл (антибактериальная активность) [8].

В ходе исследования было установлено, что внутрибрюшинное однократное введение 1,2,4-триазолов способствовало сдерживанию развития воспали-

Таблица 1

ПРОТИВОВОСПАЛИТЕЛЬНАЯ АКТИВНОСТЬ СОЕДИНЕНИЙ III (а-г) В ДОЗЕ 1/10 ОТ LD_{50}

№ соединения	LD_{50} , мг/кг	Доза 1/10 от LD_{50} , мг/кг	% угнетения отека через 1 ч	% угнетения отека через 1 сут
Диклофенак	250	25	25±3	60,8±4
III а	2000	200	24±3	58±6
III б	1250	125	18±2	49±5
III в	2000	200	8±2	46±4
III г	2000	200	23±2	55±5

Таблица 2

АНАЛЬГЕЗИРУЮЩАЯ АКТИВНОСТЬ 1,2,4-ТРИАЗОЛОВ III (а-г)

Соединение	Доза 1/10 от LD_{50} , мг/кг	Время начала судорог, мин	Количество судорог, наблюдаемых в течение 20 мин		Прирост к контролю, %
			число	%	
Контроль	–	3,9±0,3	103±2	100	–
Метамизол натрия	25	5,15±0,30	39,33±1	38,18	61,82
III а	200	4,46±0,60	15,33±1	14,88	85,12
III б	125	3,0±0,1	20,33±2	19,74	80,26
III в	200	4,25±0,20	24,67±2	23,95	76,05
III г	200	4,15±0,40	17,33±1	16,83	83,17

тельной реакции в модели «острый формалиновый отек лапы» у крыс спустя сутки на 46–58% (табл. 1). Это немного ниже уровня, широко используемого на практике диклофенака натрия (60,8%) при значительно меньшей токсичности 1,2,4-триазолов, токсичность которых в 8 раз меньше, чем у диклофенака натрия (250 мг/кг).

При подсчете количества корч у мышей при установлении анальгезирующей активности оказалось, что полученные 1,2,4-триазолы приводят к уменьшению числа судорог у животных на 76–85%, по сравнению с препаратом сравнения метамизолом натрия, активность которого составляет 62% (табл. 2).

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Экспериментально показано, что синтезированные новые производные 1,2,4-триазола нетоксичны и обладают выраженной противовоспалительной и анальгезирующей активностью. Использование компьютерной программы PASS позволило быстро, без существенных экспериментальных затрат, определить биологическую активность полученных 1,2,4-триазолов.

ЛИТЕРАТУРА

1. Потапова А.Э., Куваева Е.В., Яковлев И.П., Федорова Е.В., Щеголев А.Е. Синтез и биологическая активность 2,5-замещенных 6-гидрокси-пиримидин-4(3H)-онов. Бултеровские сообщения, 2015; 44 (11): 65–8.
2. Лалаев Б.Ю., Яковлев И.П., Захс В.Э. Синтез 5-алкил(арил)-2-алкилсульфонил(алкокси)-4-гидрокси-6H-1,3-оксазин-6-онов. Журнал общей химии, 2005; 75 (3): 46.
3. Овсянникова Л.Н., Лалаев Б.Ю., Яковлев И.П., Семакова Т.Л. Особенности реакций 2,5-замещенных 4-гидрокси-6H-1,3-оксазин-6-онов с бензимидазол-2-илгидразином. ЖОРХ, 2016; 52 (4): 617–8.
4. Ищенко Р.О., Яковлев И.П., Лалаев Б.Ю., Овсянникова Л.Н. Взаимодействие диамидов фталевых кислот с малонилдихлоридом – новый путь синтеза бис(4-гидрокси-6H-1,3-оксазин-6-онов). Бултеровские сообщения, 2012; 29 (3): 63–5.
5. Овсянникова Л.Н., Ле Нгюк Ан, Семакова Т.Л., Лалаев Б.Ю., Яковлев И.П. Тезисы докладов V Научно-технической конференции студентов, аспирантов и молодых ученых (с международным участием) «Неделя науки-2015». СПб., 2015; 61.
6. Прозоровский В.Б. Статистическая обработка результатов фармакологических исследований. Психофармакология и биологическая наркологию, 2007; 7 (3–4): 2090–20.
7. Bhardwaj S., Gupta D. et al. Study of acute, sub acute and chronic toxicity test. IJARPB, 2012; 2(2):103–129.
8. Shivarama Holla B., Sooryanarayana Rao B., Sarojini B.K., Akberali P.M., Suchetha Kumari N. Synthesis and studies on some new fluorine containing triazolothiadiazines as possible antibacterial, antifungal and anticancer agents. Eur. J. Med. Chem., 2006; 41 (5): 657–63.

Поступила 29 октября 2016 г.

BIOLOGICAL ACTIVITY OF NEW DERIVATIVES OF TRIAZOLES

L.N. Ovsyannikova; B.Yu. Lalaev, PhD; Professor I.P. Yakovlev, PhD; N.A. Anisimova, PhD; E.N. Kirillova, PhD; G.V. Ksenofontova, PhD

Saint Petersburg State Chemopharmaceutical Academy; 14, Prof. Popov St., Saint Petersburg 197376, Russian Federation

SUMMARY

Introduction. A study of previously obtained 1,3-oxazines has shown that they have anti-inflammatory, sedative, and antimicrobial activities. The biological activity of the products of their interaction with nitrogen-containing binucleophilic reagents has not been studied.

Objective: to investigate the biological activity of new synthesized 1,2,4-triazole derivatives.

Material and methods. The probable types of biological activity were predicted using the PASS software. Experiments on outbred male albino mice determined the acute toxicity of 1,2,4-triazole derivatives. Antifungal activity was established from the lowest inhibitory concentration of the test compounds. Antimicrobial effect was determined by the absence of growth of the test microorganisms in the meat-peptone broth containing the lowest concentration of a drug, and the nature of antimicrobial (bacteriostatic or bactericidal) activity was ascertained in the absence of their growth in a nutrient dense medium. Anti-inflammatory activity was investigated using an acute formalin-induced paw swelling in rats. Analgesic activity was established by applying an acetic acid-induced writhing model in mice.

Results. 1,2,4-triazoles were referred to as a class of non-toxic substances (LD₅₀ 1250 to 2000 mg/kg). These were inferior to comparison drugs in antifungal and antibacterial activities. The anti-inflammatory effect of 1,2,4-triazoles was slightly below that of the comparison drug, but the former had a very low toxicity. The analgesic activity of the test compounds was higher than that of the comparison drug.

Conclusion. The new synthesized 1,2,4-triazole derivatives are non-toxic and possess pronounced anti-inflammatory and analgesic activities.

Key words: 1,2,4-triazoles, biological activity, PASS software, acute toxicity, antifungal, antimicrobial, anti-inflammatory, and analgesic activities.

REFERENCES

1. Potapova A.E., Kuvaeva E.V., Yakovlev I.P., Fedorova E.V., Shchegolev A.E. Synthesis and biological activity of substituted 2,5-hydroxy-6-pyrimidin-4(3H)-ones. Butlerovskiyе soobshcheniya, 2015; 44 (11): 65–8 (in Russian).
2. Lalaev B.Y., Yakovlev I.P., Sakhs V.E. Synthesis of 5-alkyl(aryl)-2-alkylsulfonyl(alkoxy)-4-hydroxy-6H-1,3-oxazin-6-ones. Journal of General Chemistry, 2005; 75(3): 46 (in Russian).
3. Ovsyannikova L.N., Lalaev B.Y., Yakovlev I.P., Semakova T.L. Features of reactions of substituted 2,5-hydroxy-4-6H-1,3-oxazin-6-ones with benzimidazol-2-yl-hydrazine. JORC, 2016; 52 (4): 617–8 (in Russian).
4. Ishchenko R.O., Yakovlev I.P., Lalaev B.Y., Ovsyannikova L.N. Interaction of phthalic acid diamides with malonyldichloride – anew way of bis(4-hydroxy-6H-1,3-oxazin-6-ones) synthesis. Butlerovskiyе soobshcheniya, 2012; 29 (3): 63–5 (in Russian).
5. Ovsyannikova L.N., Le Ngoc An, Semakova T.L., Lalaev B.Y., Yakovlev I.P. Abstracts of V Scientific and Technical Conf. of students, graduate students and young scientists (with international participation) Science Week 2015». St. Petersburg, 2015; 61 (in Russian).
6. Prozorovsky V.B. Statistical analysis of the results of pharmacological studies. Psikhofarmakologiya i biologicheskaya narkologiya, 2007; 7 (3–4): 2090–120 (in Russian).
7. Bhardwaj S., Gupta D. et al. Study of acute, sub acute and chronic toxicity test. IJARPB, 2012; 2 (2):103–29.
8. Shivarama Holla B., Sooryanarayana Rao B., Sarojini B.K., Akberali P.M., Suchetha Kumari N. Synthesis and studies on some new fluorine containing triazolothiadiazines as possible antibacterial, antifungal and anticancer agents. Eur. J. Med. Chem., 2006; 41 (5): 657–63.