

ИССЛЕДОВАНИЕ ОСТРОЙ ТОКСИЧНОСТИ И ПРОТИВОВОСПАЛИТЕЛЬНОЙ АКТИВНОСТИ МЕТИЛОВЫХ ЭФИРОВ 5-СУЛЬФАМОИЛ-N-ФЕНИЛАНТРАНИЛОВОЙ КИСЛОТЫ

Л.В. Григорьева

Харьковский национальный университет имени В.Н. Каразина, Украина

РЕЗЮМЕ

Изучена острая токсичность метиловых эфиров 5-сульфамойл-N-фенилантраниловой кислоты. Перемещение в фенильном ядре молекулы метильного радикала с 3-го положения во 2-е – (соед. 10), или в 5-положение (соед. 9), а также замена в сульфамойльном заместителе этильного радикала (соед. 6-12) на атом водорода (соед.1-5) приводит к снижению острой токсичности. Отобрано соединение 8 (метиловый эфир 5-диэтилсульфамойл-4- метил-N-фенилантраниловой кислоты) противовоспалительная активность (42,1%) которого сопоставима с действием диклофенак натрия. Противовоспалительный эффект реализуется за счет ингибирования биосинтеза простагландинов ПГЕ₁.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: острая токсичность, противовоспалительная активность, простагландины, метиловые эфиры 5-сульфамойл-N-фенилантраниловой кислоты, диклофенак натрия

В настоящее время нестероидные противовоспалительные препараты (НПВП) являются наиболее эффективными лекарственными средствами, обладающими противовоспалительной, анальгетической и жаропонижающей активностью [7]. Наряду с воспалительными и дегенеративными ревматическими заболеваниями, НПВП достаточно широко применяются практически во всех разделах медицины, включая онкологию и психиатрию. Известно, что ежегодно в мире выписывается более 60 млн. рецептов только на «неаспириновые» НПВП, при этом реальное число пациентов, принимающих НПВП, значительно больше, так как целый ряд препаратов из этой группы разрешены к применению в качестве безрецептурных лекарственных средств [8].

Однако, несмотря на несомненную клиническую эффективность современных НПВП, подчас даже кратковременный прием этих препаратов в низких дозах может приводить к развитию целого ряда побочных реакций. Наиболее частыми среди них являются язвы желудочно-кишечного тракта и кровотечения из них. По данным гастроскопии, частота этого осложнения достигает 20% [15]. К числу опасных нежелательных явлений относят Осложнения со стороны сердечно-сосудистой системы, в частности сердечную недостаточность [10, 17], риск которой выше у больных с артериальной гипертонией и заболеваниями сердца, а также некроз почек. Особенно высок риск осложнений лекарственной терапии НПВП у лиц пожилого возраста, чаще других нуждающихся в приеме данной группы препаратов [1].

Расшифровка механизмов, лежащих в основе противовоспалительной активности и

побочных эффектов НПВП, а также разработка на этой основе новых препаратов этого класса считается одним из наиболее существенных достижений фармакологии конца XX века [18]. Наиболее важный механизм, определяющий как эффективность, так и токсичность НПВП, связан с подавлением активности циклооксигеназы (ЦОГ) – фермента, регулирующего биотрансформацию арахидоновой кислоты в простагландины (ПГ), простаглицлин (PGI₂) и тромбоксан (T_xA₂) [13]. Относительно недавно были открыты две основные изоформы ЦОГ, которые обозначаются как ЦОГ-1 и ЦОГ-2. В большинстве тканей ЦОГ-1 постоянно присутствует в различном количестве и относится к категории «структурных» ферментов, регулирующих физиологические эффекты ПГ. Напротив, ЦОГ-2 в норме в большинстве тканей не обнаруживается, но ее уровень существенно увеличивается на фоне развития воспаления. Эти данные позволили создать концепцию, заключающуюся в том, что ингибция ЦОГ-2 рассматривается, как один из ведущих механизмов противовоспалительной и анальгетической активности НПВП, а ЦОГ-1 – развития побочных реакций [19]. Вот почему эффективность и токсичность «стандартных» НПВП связывают в первую очередь с их низкой селективностью, то есть способностью в одинаковой степени подавлять активность обеих изоформ ЦОГ [14]. Исходя из селективности к ЦОГ-1 и ЦОГ-2 в настоящее время НПВП условно разделяют на следующие группы: неселективные (стандартные) НПВП (индометацин, ибупрофен, диклофенак натрия и др.), преимущественные ингибиторы ЦОГ-2 (мелоксикам, нимесулид, этодолак, набуметон) и селективные ингибиторы ЦОГ-2, или коксибы [5]. Основ-

ным преимуществом ингибиторов ЦОГ-2 по сравнению с неселективными НПВП является их более высокая гастроэнтерологическая безопасность. Вместе с тем результаты клинических наблюдений, выполненных в последние годы, свидетельствуют о потенциальном риске при длительном приеме специфических ингибиторов ЦОГ-2 серьезных сердечно-сосудистых осложнений. Это может быть связано с выявленным фактом участия ЦОГ-2 не только в воспалительных реакциях, но и в качестве «структурного» фермента, обеспечивающего нормальную функцию фармакологии остается дальнейший поиск новых веществ, проявляющих выраженную противовоспалительную активность и не имеющих нежелательных побочных реакций.

Нерешенной остается проблема создания новых НПВП на основании дальнейшего поиска новых веществ, обладающих высокой противовоспалительной активностью и менее выраженными побочными реакциями. Проведенный компьютерный прогноз видов фармакологической активности свидетельствует, что синтезированные замещенные 5-сульфамоил-N-фенилантраниловой кислоты с высокой вероятностью могут проявлять противовоспалительную активность.

Целью исследования явилось изучение острой токсичности и противовоспалительной активности новых метиловых эфиров 5-сульфамоил-N-фенилантраниловой кислоты (соед. 1-12).

Работа выполнена в рамках научной программы научно-исследовательских работ Национального фармацевтического университета по проблеме «Создание новых лекарственных препаратов» (№ государственной регистрации 0198U007008).

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Объектом исследования служили метиловые эфиры 5-сульфамоил-N-фенилантраниловой кислоты (соед. 1-12), синтезированные на кафедре аналитической химии Национального фармацевтического университета. Изучение общего действия и острой токсичности исследуемых веществ проведено на беспородных белых мышах обоего пола массой 18-23 г, по пять животных в каждой серии. Вещества в виде водных растворов вводили внутрибрюшинно в объеме не более 1 мл. Контрольной группе мышей вводили дистиллированную воду, в том же объеме, что и опытным группам. Животных содержали на стандартном кормовом рационе. Наблюдение за животными проводили в течение 14-ти дней после однократного введения изучаемых веществ. В процессе наблю-

ряда органов и в частности – сердца [4].

Следовательно, до настоящего времени общепризнанным остается мнение, что нет абсолютно безопасных НПВП и в том числе селективные ингибиторы ЦОГ-2 не являются таковыми, а применяемый вот уже 30 лет диклофенак натрия все еще признается «золотым стандартом» эффективности, с которым сравниваются и новые противовоспалительные препараты [3].

В связи с тем, что противовоспалительный эффект является у НПВП преобладающим, актуальной проблемой современной денции обращали внимание на поведенческие реакции, нервно-мышечную возбудимость, состояние волосяного покрова, изменение массы тела, характер выделений и продолжительность жизни [2, 12].

Противовоспалительную активность исследуемых метиловых эфиров 5-сульфамоил-N-фенилантраниловой кислоты изучили на модели острого воспалительного отека, вызванного субплантарным введением флоггена – формалина. Опыты проведены на белых беспородных крысах массой 165-180 г. Метиловые эфиры 5-сульфамоил-N-фенилантраниловой кислоты вводили в дозе 0,1 ЛД₅₀ внутрижелудочно за 30 минут до введения флоггенного агента. Контрольным группам вводили дистиллированную воду. Через 30 минут под апоневроз задней лапки крысы вводили по 0,1 мл 2%-ного раствора формалина. Через 4 часа (максимум развития отека) измеряли объем здоровой и пораженной лапки с помощью онкометра. Величину отека вычисляли по разнице между объемами здоровой и воспаленной лапки. Противовоспалительную активность исследуемых соединений определяли по степени уменьшения экспериментального отека у опытных животных в сравнении с контрольными и выражали в процентах. В качестве препарата сравнения использовали диклофенак натрия (ЕД₅₀=8 мг/кг). Степень угнетения отека рассчитывали по формуле:

$$\% \text{ угнетения} = \frac{V_k - V_o}{V_k} \cdot 100$$

V_k и V_o соответственно объем лапки в контроле и в опыте [2, 6].

Радиоиммунологический анализ простагландинов группы ПГЕ₁ проводили с помощью набора реагентов фирмы “Clinical Assayer” (США). В опытах использованы крысы массой 140-175 г. Крыс декапитировали под эфирным наркозом. Кровь забирали в полиэтиленовые пробирки, содержащие 2% раствор этилендиамина тетраацетата (ЭДТА) в количестве 1 мл и ацетилсалициловой кислоты в объеме 0,01 мл 30,4% раствор на 1

мл цельной крови, в соответствии с рекомендациями В.Д. Помойнецкого и соавт. [9]. Плазму отделяли центрифугированием при 4°C и 2000 об/мин в течение 30 минут.

Экстракцию ПГ₁ из плазмы крови проводили по методу В.М. Jaffe и соавторы [16]. К 1 мл плазмы добавляли 3 мл петroleйного эфира для удаления нейтральных липидов. После удаления липидной фракции добавляли 5 мл раствора, содержащего этилацетат, изопропанол и 0,2Н хлористоводородную кислоту в соотношении 3:3:1. Встряхивали 15 секунд и добавляли 2 мл ацетилацетата и 3 мл дистиллированной воды. После центрифугирования отбирали органическую фазу в объеме 3 мл.

Колоночную хроматографию проводили методом последовательной элюации простагландинов на колонках кремниевой кислоты смесью растворителей из бензола, метанола и этилацетата в различных количественных соотношениях. Полученные элюаты выпаривали в ротационном испарителе. Разделение связанных с антителами не связанных ПГ₁ идет за счет осаждения комплекса антиген-антитело вторым антителом, специфичным к первому. После центрифугирования связанная радиоактивность осаждается. Осадок растворяли в сцинтилляторе Брея. Подсчет импульсов проводили сцинтилляционным счетчиком за 1 минуту.

Для определения содержания ПГ₁ в диапазоне от 8,2 до 2000 пг/мл строилась стандартная кривая из 6 точек, для чего в 6 про-

бирок вместо проб добавляли определенное количество стандартного ПГ₁. На оси ординат откладывали процент связывания Н³ – ПГ, на оси абсцисс – логарифм концентраций ПГЕ₁, соответствующих определенному количеству связывания.

Величину процента связывания для каждой пробы и стандарта рассчитывали по формуле:

$$B_n = \frac{CPM_n - NSB}{B_o - NSB} \cdot 100\%, \text{ где}$$

B_n – величина % связывания для каждой пробы;

CPM_n – количество импульсов в минуту;

NSB – неспецифическое связывание;

B_o – максимальное связывание.

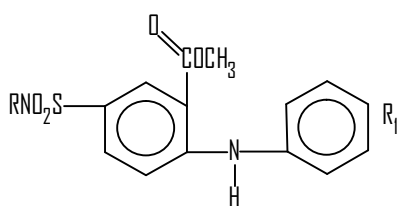
Количество ПГ₁ в пробах определяли по калибровочной кривой и проводили пересчет, учитывая размер пробы, подвергшейся экстрагированию. Статистическую обработку полученных результатов проводили методом вариационных рядов с использованием критериев Стьюдента [11].

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Первичная фармакологическая оценка общего действия и острой токсичности показала, что ЛД₅₀ синтезированных метиловых эфиров 5-сульфамоил-N-фенилантраниловой кислоты (табл. 1) находится в пределах от 42,5 мг/кг до 437,5 мг/кг.

Таблица 1

Острая токсичность метиловых эфиров 5-сульфамоил-N-фенилантраниловой кислоты



Соединения №№	R	R ₁	ЛД ₅₀ , мг/кг
1	Водород	Водород	120,0±17,5
2	Водород	2-метил	162,5±10,9
3	Водород	3-метил	437,5±10,8
4	Водород	4-метил	135,0±13,1
5	Водород	2,5-диметил	155,0±13,5
6	Этил	Водород	131,0±11,7
7	Этил	2-метил	125,0±13,1
8	Этил	4-метил	179,0±14,5
9	Этил	2,4-диметил	143,0±14,7
10	Этил	2,5-диметил	108,0±15,6
11	Этил	3,5-диметил	42,5±2,2
12	Этил	4-метокси	137,5±10,9

Наиболее токсичным оказалось соединение 11, ЛД₅₀ которого равно 42,5 мг/кг. Перемещение в фенильном ядре метильного радикала с 3-го положения во 2-е – (соед. 10), или в 5-положение (соед. 9) приводит к уменьшению острой токсичности. Замена в сульфамойльном заместителе этильного радикала (соед. 6-12) на атом водорода (соед. 1-5) приводит к снижению острой токсичности. Наименее токсичным оказалось соед. 3, ЛД₅₀ которого составило 437,5 мг/кг.

Результаты изучения противовоспалительной активности (табл. 2) свидетельствуют, что среди изученных веществ наиболее активным оказалось соединение 8 (метиловый эфир 5-диэтилсульфамоил 4-метил-N-фенилантраниловой кислоты), которое в дозе 17,9 мг/кг вызывало уменьшение объема лапки у крыс в среднем на 42,1% (p<0,05) по сравнению с контрольной группой. Перемещение метильного радикала с 4-го положения (соед. 8) во второе (соед. 7) приводит к

снижению противовоспалительной активности, которая составила 38,3% ($p < 0,05$).

Замена в 5-положении молекулы N-фенилантраниловой кислоты этильного радикала (соед. 8) на атом водорода (соед. 1-5) приводит к уменьшению противовоспалительного эффекта, который находился в интервале от 24,1% до 36,1% ($p < 0,05$). Введение во 2-е и 5-е положение (соед. 10) и 3-е и 5-е (соед. 11) фенильного радикала двух метильных заместителей приводит к снижению противовоспалительной активности, а перемеще-

ние двух метильных радикалов во 2-е и 4-е (соед. 9) положение фенильного радикала молекулы антраниловой кислоты приводит к утрате антиэкссудативного эффекта.

Эталонный препарат сравнения диклофенак натрия снижал экспериментальный отек лапок у крыс в среднем на 44,4%.

Таким образом, метиловый эфир 5-диэтилсульфамоил 4- метил-N-фенилантраниловой кислоты (соед. 8) обладает противовоспалительным эффектом и по активности сопоставим с действием диклофенак натрия.

Таблица 2

Противовоспалительная активность метиловых эфиров 5-сульфамоил-N-фенилантраниловой кислоты

Соединения №№	Доза, мг/кг	Объем лапки через 4 часа ($M \pm m$), мл	%, к контролю	Противовоспалительная активность, %
1	12,0	0,94±0,08*	70,7	29,3
2	16,3	0,87±0,07*	65,4	34,6
3	43,7	0,98±0,12*	73,7	26,3
4	13,5	0,96±0,11*	72,2	27,8
5	15,5	1,01±0,07*	75,9	24,1
6	13,1	0,85±0,08*	63,9	36,1
7	12,5	0,82±0,07*	61,7	38,3
8	17,9	0,77±0,10*	57,9	42,1
9	14,3	1,42±0,17	106,8	-
10	10,8	0,97±0,12*	72,9	27,1
11	14,3	1,25±0,14	94,0	6,0
12	13,8	1,37±0,16	103,0	-
Диклофенак-натрия	8,0	0,74±0,08*	55,6	44,4
Контроль	-	1,33±0,14	100	-

* - достоверность разницы с интактными ($p < 0,05$).

С целью изучения некоторых сторон фармакодинамики противовоспалительной активности были проведены исследования по изучению влияния соед. 8 (метиловый эфир 5-диэтилсульфамоил 4- метил-N-фени-

лантраниловой кислоты), на содержание простагландинов ПГЕ₁ в плазме крови исследуемых крыс с экспериментальным формалиновым отеком (табл. 3).

Таблица 3

Влияние соединения 8 и диклофенак натрия на уровень простагландинов ПГЕ₁ в плазме крови у крыс

Серия опытов	Содержание ПГЕ ₁				
	Интактные		Формалиновый отек		
	($M \pm m$), нмоль/л	в % к контролю	($M \pm m$), нмоль/л	в % к	
				интактным	контролю
Контроль	6,42±0,11	100	7,57±0,15	117,9	100
Соединение 8	6,04±0,14*	93,8	5,68±0,11*	88,5	75,0
Диклофенак натрия	5,96±0,13*	92,8	5,56±0,14*	84,2	73,5

* - достоверность разницы с интактными ($p < 0,05$).

Установлено, что в контрольной группе количество простагландинов ПГЕ₁ у интактных крыс составило 6,42±0,11 нмоль/л, после введения флогогенного агента (формалина) содержание простагландинов ПГЕ₁ в контрольной группе увеличилось на 17,9% ($p < 0,05$) по сравнению с интактной группой. Во второй экспериментальной группе после введения соединения 8 содержание ПГЕ₁ уменьшилось на 25,5% ($p < 0,05$) по сравнению с контрольной группой.

После введения диклофенак натрия в дозе 8 мг/кг наблюдали уменьшение уровня ПГЕ₁ в плазме крови у крыс на 21,5% ($p < 0,05$) по сравнению с контрольной группой.

Известно, что у животных с экспериментальным формалиновым отеком наблюдается увеличение уровня циклооксигеназы (ЦОГ-2). Ингибция ЦОГ-2 рассматривается, как один из важных механизмов противовоспалительной и анальгетической активности [5, 7]. Проведенные исследования пока-

зали, что соединение № 8 уменьшает количество простагландинов ПГЕ₁ у животных. Это свидетельствует о том, что противовоспалительное действие исследуемого соед. 8 проявляется за счет ингибирования биосинтеза простагландинов (ПГЕ₁) [8]. Можно предположить, что механизм противовоспалительной активности соединения 8 связан с подавлением активности ЦОГ-2, фермента регулирующего биотрансформацию арахидоновой кислоты в простагландины. Полученные результаты позволяют считать, что отобранное вещество является перспективным для дальнейших исследований с целью создания на его основе более безопасных НПВП.

ВЫВОДЫ

1. ЛД₅₀ метиловых эфиров 5-сульфамойл-N-фенилантраниловой кислоты находится в пределах от 42,5 мг/кг до 437,5 мг/кг. Перемещение в фенильном ядре метильного радикала с 3-го положения во 2-е – (соед. 10), или в 5-положение (соед. 9) приводит к сниже-

нию острой токсичности.

2. Метилловый эфир 5-диэтилсульфамойл 4-метил-N-фенилантраниловой кислоты (соед. 8), обладает выраженной противовоспалительной активностью, уменьшает объем отечной лапки у крыс в среднем на 42,1%.
 3. Противовоспалительное действие соединения № 8 проявляется за счет ингибирования биосинтеза и уменьшения уровня простагландинов ПГЕ₁.
- Перспективы последующих исследований

в данном направлении: среди изученных соединений выявленная активная субстанция – метилловый эфир 5-сульфамойл-N-фенилантраниловой кислоты (соед. 8), обладающая значительной противовоспалительной активностью, может явиться основой для дальнейших углубленных исследований специфической активности и безопасности с перспективной возможностью создания нового нестероидного противовоспалительного препарата.

ЛИТЕРАТУРА

1. Белоусов Ю.Б., Гуревич К.Г. Клиническая фармакокинетика. -М.:Литера. - 2005. - 288 с.
2. Доклінічні дослідження лікарських засобів. Метод. Рекоменд. / За ред. О.В. Стефанова. -К.: Авіцена. - 2001. - 528 с.
3. Зупанець І.А., Попов С.Б., Отрішко І.А. // Клінічна фармація. - 2002. - Т. 6 - № 2. - С. 48-50.
4. Коцюбинская О.Б. Дифференцированное лечение остеоартроза нестероидными противовоспалительными препаратами при артериальной гипертензии. Автореф. дис. ...канд.мед.наук. – Москва. - 2003. - 26 с.
5. Лила А.М. // Русский медицинский журнал. - 2005. - Т.13. - № 24. - С. 1598-1601.
6. Методические рекомендации по экспериментальному (доклиническому) изучению нестероидных противовоспалительных фармакологических веществ / Под ред. Тринуса Ф.П. Управление по внедр. нов. лек. средств и мед. техники, ФК МЗ СССР. - М. - 1983. - 11 с.
7. Насонов Е.Л. // Русский медицинский журнал. - 2003. - Т.11. - № 7. - С. 375-378.
8. Насонов Е.Л. // Русский медицинский журнал. - 2005. - Т.13. - № 7. - С. 383-391.
9. Помойнецкий В.Д., Некрасова А.А., Косых В.Н. // Вопр. мед. химии. - 1979. - № 5. - С. 636-641.
10. Регистр лекарственных средств России. Энциклопедия лекарств. Вып. 11. 2004 / Гл. ред. Г.Л. Вышковский. –М.:ООО «РЛС-2004». - 1503 с.
11. Сернов Л.Н., Гацура В.В. Элементы экспериментальной фармакологии. -М. - 2000. - 352 с.
12. Требования к доклиническому изучению общетоксического действия новых фармакологических веществ /Под ред. Арзамасцева Е.В. Управление по внедрению нов. лек. средств и мед. техники, ФК МЗ СССР. - М. - 1985. - 19 с.
13. Чичасова Н.В. // Русский медицинский журнал. - 2002. - Т. 10. - № 22. - С. 1026-1030.
14. Шекель А.М., Гриценко І.С., Листван В.В. // Вісник фармації. - 2003. - № 4. - С. 7-12.
15. Feuba D.A. // Cleveland Clinic J. Med. - 2002. - Vol. 69. - P. 31-39.
16. Jaffe B.V., Bernham H.R., Parker C.W. // J. Clin. Invest. - 1973. - Vol. 52. - P. 398-405.
17. Page J., Henry D. // Arch. Intern. Med. - 2000. - Vol. 160. - P. 777-784.
18. Simon D.L., Botting R.M. // Pharmacol.Rev. - 2004. - Vol. 56. - P. 387-437.
19. Warner T.D., Mitchel J.A. // FASEB J. - 2004. - Vol. 18. - P. 790-804.

ДОСЛІДЖЕННЯ ГОСТРОЇ ТОКСИЧНОСТІ ТА ПРОТИЗАПАЛЬНОЇ АКТИВНОСТІ МЕТИЛОВИХ ЕФІРІВ 5-СУЛЬФАМОЇЛ-N-ФЕНІЛАНТРАНІЛОВОЇ КИСЛОТИ

Л.В. Григорьева

Харківський національний університет імені В.Н. Каразіна, Україна

РЕЗЮМЕ

Вивчена гостра токсичність метилових ефірів 5-сульфамойл-N-фенілантранілової кислоти. Переміщення у фенільному ядрі молекули метилового радикала з 3-ого положення в 2-ге (спол. 10), або в 5-положення (спол.9), а також заміна в сульфамойльному заміснику етильного радикалу (спол. 6-12) на атом водню (спол. 1-5) приводе до зниження гострої токсичності. Відібрана сполука 8 (метиловий ефір 5-діетилсульфамойл-4-метил-N-фенілантранілової кислоти), протизапальна активність (42,1%) якого порівнюється з дією диклофенака натрію. Протизапальний ефект досягається за рахунок інгібування біосинтезу простагландинів ПГЕ1.

КЛЮЧОВІ СЛОВА: гостра токсичність, протизапальна активність, простагландини, метилові ефіри 5-сульфамойл-N-фенілантранілової кислоти, диклофенак натрію

RESEARCH OF ACUTE TOXITY AND ANTIPHLOGISTIC ACTION OF METHYL ETHER 5-SULPHAMOYL-N-PHENYLANTHRANYL ACID

L.V. Grygoryeva

V.N. Karazin Kharkov National University, Ukraine

SUMMARY

Acute toxicity and antiphlogistic action of methyl ether 5-sulphamoyl-N-phenylanthranil acid was analysed. Transfer of the molecule of methyl radical from the third position to the second (connection 10) position, or to fifth position (connection 9), as well as the change in sulphamoyl substitute of ethyl radical (connection 6-12) to an atom of hydrogen (connection 1-5) leads to decrease of acute toxicity. Connection 8 (methyl ether of 5-diethylsulphamoyl-4-methyl-N-phenylanthranil acid) was selected, its antiphlogistic action (42,1%) can be compared with the activity of diclofenac sodium. Antiphlogistic effect is realized on account of inhibition of prostaglandin-synthetase PGE₁.

KEY WORDS: acute toxicity, antiphlogistic action, prostaglandins, methyl ethers 5-sulphamoyl-N-phenylanthranil acid, diclofenac sodium