

УДК 547.891.2:615.212+262.1

В. И. Павловский, Т. А. Кабанова, Е. И. Халимова, С. А. Андронати
Физико-химический институт им. А.В. Богатского
Национальной академии наук Украины,
г. Одесса, Люстдорфская дорога 86, Одесса, 65080, Украина,
e-mail: medchem_department@ukr.net

АНАЛЬГЕТИЧЕСКИЕ И ПРОТИВОВОСПАЛИТЕЛЬНЫЕ СВОЙСТВА НОВЫХ 3-АЛКОКСИ-1,2-ДИГИДРО-3Н-1,4- БЕНЗДИАЗЕПИН-2-ОНОВ

Изучена анальгетическая активность ряда новых замещенных по третьему положению 1,2-дигидро-3Н-1,4-бенздиазепин-2-онов, в качестве лидера выявлено соединение **8** (3-пропокси-7-бром-5-(2'-хлор)фенил-1,2-дигидро-3Н-1,4-бенздиазепин-2-он) с показателем $ED_{50} = 0,030 \pm 0,007$ мг/кг, которое также проявило противовоспалительную активность в опытах *in vivo* на крысах.

Ключевые слова: 3-замещенные 1,4-бенздиазепины, анальгезия, отек.

В настоящее время поиск новых лекарственных веществ, обладающих анальгетической активностью, занимает примерно 24% от общего числа исследований в мире.

Независимо от причин возникновения, многие острые и хронические заболевания сопровождаются болью, резко снижающей качество жизни человека, его социальную адаптацию, вызывающей постоянные страдания. Именно болевые синдромы являются одной из основных причин обращения людей за медицинской помощью. Более 90% заболеваний ассоциированы с болью. Около 20% человечества страдает от хронической боли [1]. К сожалению, современные анальгетические препараты либо не всегда эффективны, как нестероидные противовоспалительные средства, либо, как наркотические анальгетики, имеют опасные побочные эффекты. Поэтому клиника, безусловно, нуждается в новых более совершенных лекарствах для облегчения боли.

В последнее десятилетие в литературе появляются сообщения о том, что замещенные по третьему положению производные 1,4-бенздиазепинов обладают анальгетической активностью. Известными фармацевтическими компаниями, такими как Мерк и Новартис, запатентованы производные 1,4-бенздиазепинов как потенциальные анальгетики, обладающие аффинитетом к рецепторам брадикинина [2, 3]. В работе изучена анальгетическая активность в плане способности снижать болевую чувствительность в ряду новых замещенных по третьему положению 1,2-дигидро-3Н-1,4-бенздиазепин-2-онов, синтезированных нами ранее [4, 5].

Материалы и методы

Модель «корчей», вызванных внутрибрюшинным введением раствора уксусной кислоты

Исследование анальгетической активности проводилось на модели периферической боли, в основе которой лежит химическое болевое раздражение, вызванное

внутрибрюшинным введением раствора уксусной кислоты, которое приводит к возникновению произвольных сокращений брюшных мышц живота – «корчей», сопровождающихся вытягиванием задних конечностей и выгибанием спины [6]. «Корчи» у мышей вызывали 0,75%-ным раствором уксусной кислоты, которую вводили внутрибрюшинно через 40 минут после внутрибрюшинного введения исследуемых соединений в спектре доз от 0,13 до 3,00 мг/кг. За животными наблюдали в течение 20 минут и подсчитывали количество корчей для каждого животного. Анальгетическую активность оценивали по способности соединений уменьшать число корчей в опытной группе животных по сравнению с контролем и выражали в процентах, расчет проводили по нижеприведенной формуле:

$$AA = (C_k - C_o / C_k) \cdot 100\%,$$

где AA – анальгетическая активность в %;

C_k – среднее количество корчей в контрольной группе;

C_o – среднее количество корчей в опытной группе.

Исследуемые соединения изучали в сравнении с эталонным препаратом – диклофенак-натрием, взятым в найденной для него дозе $ED_{50} = 10,0 \pm 1,8$ мг/кг.

ED_{50} рассчитывали по методу В.Б. Прозоровского [7].

Модель каррагинанового отека лапки крыс

Антиэкссудативную активность изучали на модели каррагинанового отека лапки крыс. Отек вызывали субплантарным введением 0,1 мл 1%-ного водного раствора λ -каррагинана в заднюю конечность животных опытных и контрольных групп [8, 9]. Исследуемое соединение или препарат сравнения диклофенак-натрий вводили внутрибрюшинно за 40 мин до индукции воспаления. Контрольная группа крыс получала эквивалентное количество физиологического раствора в эмульсии с Твин-80. Оценка отека проводили измерением объема стопы с помощью механического онкометра по А.С. Захаревскому [10] до введения флагогена и через два и четыре часа после его введения. О степени отека судили по разнице в объеме между отекающей стопой и стопой до индукции воспаления. Антиэкссудативную активность определяли по способности исследуемого соединения подавлять воспалительную реакцию у опытных животных в сравнении с контрольными. Расчет проводили по формуле:

$$A = (\Delta V_k - \Delta V_o / \Delta V_k) \cdot 100\%,$$

где A – антиэкссудативная активность в процентах;

ΔV_o и ΔV_k – разница между отекающей и нормальной стопами в опыте и в контроле

Модель формалинового отека лапки мышей

Антиноцицептивную активность изучали на модели формалинового отека лапки мышей. Преимуществом формалинового теста по сравнению с другими болевыми моделями является то, что он позволяет оценивать два типа боли в течение длительного времени. Установлено, что имеют место две отличных одна от другой фазы лизания лапы: фаза I – короткая моментальная реакция, которая продолжается первые 5 минут после введения флогогена; фаза II – длительная реакция, которая начинается приблизительно с 11-й минуты и заканчивается примерно

через 40 – 50 минут. Фаза I отображает прямую стимуляцию нерва формалином и является болевой фазой, а фаза II – боль, которая индуцируется воспалительными факторами, в сущности, первичная гипералгезия.

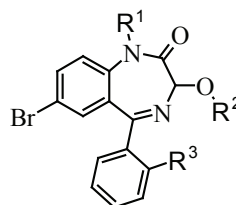
Отек вызывали субплантарным введением 0,01 мл 3%-ного водного раствора формалина в заднюю конечность животных опытной и контрольной групп. Исследуемые соединения или препарат сравнения диклофенак-натрий вводили внутривентриально за 40 мин до индукции болевой реакции. Контрольная группа мышей получала эквивалентное количество физиологического раствора в эмульсии с Твин-80. После инъекции раствора формалина животное размещали в одиночную клетку размером 8×8×8 см и наблюдали за ним в течение 40 мин, фиксируя время, затраченное животным на лизание отека конечности. Об антиноцицептивной активности судили по способности исследуемых соединений уменьшать время лизания отека конечности [11].

Результаты и их обсуждение

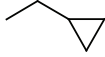
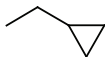
Поскольку в научной литературе имеется ряд данных о том, что некоторые 3-замещенные 1,2-дигидро-3H-1,4-бенздиазепины проявляют значительную анальгетическую активность [12-14], с целью поиска более эффективных анальгетиков осуществлен синтез новых 3-алкокси-1,2-дигидро-3H-1,4-бенздиазепин-2-онов (Табл.).

Таблица

Анальгетическая активность 3-алкокси-1,2-дигидро-3H-1,4-бенздиазепин-2-онов по методу «корчей», вызванных уксусной кислотой, в опытах *in vivo* на мышах.



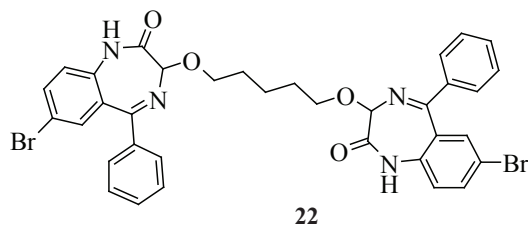
№ п/п	R ¹	R ²	R ³	ED ₅₀ , мг/кг
1	H	CH ₃	H	1,770 ± 0,240
2	H	C ₂ H ₅	H	0,570 ± 0,150
3	H	(CH ₂) ₂ CH ₃	H	0,050 ± 0,016
4	H	(CH ₂) ₃ CH ₃	H	0,087 ± 0,019
5	H	(CH ₂) ₄ CH ₃	H	1,150 ± 0,180
6	H	CH ₃	Cl	1,690 ± 0,420
7	H	C ₂ H ₅	Cl	0,310 ± 0,090
8	H	(CH ₂) ₂ CH ₃	Cl	0,030 ± 0,007
9	H	(CH ₂) ₃ CH ₃	Cl	0,350 ± 0,050

№ п/п	R ¹	R ²	R ³	ED ₅₀ , мг/кг
10	H		H	0,520 ± 0,090
11	H		Cl	0,550 ± 0,110
12	H	C ₂ H ₅ OH	H	0,940 ± 0,170
13	H	C ₂ H ₅ OH	Cl	0,700 ± 0,140
14	H	C ₂ H ₅ OCH ₃	H	0,100 ± 0,010
15 (S)*	H	C ₂ H ₅ OCH ₃	H	0,060 ± 0,015
16 (R)*	H	C ₂ H ₅ OCH ₃	H	1,600 ± 0,290
17	H	C ₂ H ₅ OCH ₃	Cl	0,480 ± 0,130
18	H	C ₅ H ₁₀ OH	H	1,130 ± 0,260
19	C ₂ H ₅	(CH ₂) ₂ CH ₃	H	0,023 ± 0,007
20	CH ₂ COOCH ₃	(CH ₂) ₂ CH ₃	H	0,057 ± 0,018
21	CH ₂ COOCH ₃	C ₂ H ₅	H	0,470 ± 0,150

* – чистый энантиомер

Всего было исследовано 22 представителя ряда 3-алкокси производных 1,2-дигидро-3H-1,4-бензодиазепин-2-онов. Синтезированные соединения **1-21** проявили высокую анальгетическую активность в опытах *in vivo* на модели «корчей», вызванных внутрибрюшинным введением раствора уксусной кислоты у мышей, которая значительно превышала эффект препарата сравнения диклофенак-натрия. Диапазон значений ED₅₀ исследуемых соединений составил: 0,03 – 1,77 мг/кг (для диклофенак-натрия значение ED₅₀ = 10,00 ± 1,80 мг/кг) (Табл.).

Изучена также анальгетическая активность димерного соединения, следующей структуры:

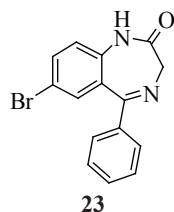


Соединение **22**, значение ED₅₀ которого для анальгетической активности по методу «корчей», вызванных уксусной кислотой у мышей, составило 0,79 ± 0,16 мг/кг, превосходило по активности диклофенак-натрий (ED₅₀ = 10,0 ± 1,8 мг/кг) и индометацин (ED₅₀ = 1,5 мг/кг).

В соответствии с результатами, полученными для 3-алкокси производных 1,2-дигидро-3H-1,4-бензодиазепин-2-она по анальгетической активности, могут

быть отмечены некоторые закономерности зависимости анальгетической активности изученных соединений от их структуры.

Ранее нами [15], в результате скрининга новых синтезированных 3-арилиден-1,2-дигидро-3H-1,4-бенздиазепин-2-онов в опытах на мышах, было обнаружено, что 7-бром-5-фенил-1,4-бенздиазепин-2-он (соединение **23**) без заместителя по третьему положению бенздиазепинового ядра обладает невысокой анальгетической активностью.



В дозе 1 мг/кг соединение **23** всего лишь на 11,5 % снижало число «корчей», вызванных уксусной кислотой у мышей. При введении заместителей в третье положение бенздиазепинового ядра (соединения **1-21**) показатели ED₅₀ существенно снизились в зависимости от длины алкильного радикала и его функционализации.

Если рассмотреть аналоги **1-5** и **6-9**, то можно заметить отчетливое возрастание анальгетической активности при увеличении длины метиленовой цепочки до трех атомов, при этом дальнейшее наращивание цепи приводит к падению активности. Из всех изученных нами аналогов наилучший показатель ED₅₀ (0,03 мг/кг) принадлежал соединению **8** с хлорфенильным заместителем по пятому положению бенздиазепинового ядра. (Рис. 1).

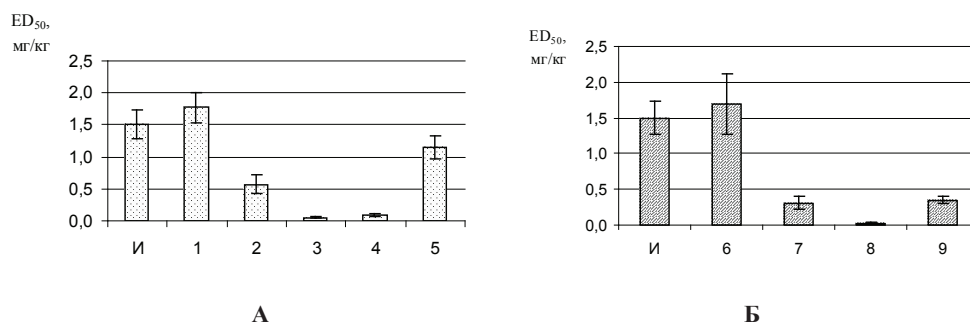


Рис. 1. Влияние увеличения длины алкильного заместителя на показатель анальгетической активности в методе «корчей», вызванных уксусной кислотой в опытах *in vivo* на мышах (И – Индометацин): А– соединения **1-5** с фенильным заместителем по пятому положению бенздиазепинового ядра; Б– соединения **6-9** с хлорфенильным заместителем по пятому положению бенздиазепинового ядра.

Изучена анальгетическая активность рацемата **14**, а также соединений **15** и **16**, которые является его S и R энантиомерами, соответственно (Рис. 2). Если рассмотреть соединения **14-16**, то очевидным является возрастание показателя анальгетической активности в порядке R < SR < S (Рис. 2). Наименьшей анальгетической активностью обладает R энантиомер с показателем ED₅₀ = 1,6 мг/кг, активность рацемата возрастает в 1,5 раза по сравнению с R энантиомером (0,1 мг/кг),

наиболее же активным является S энантиомер (0,06 мг/кг), эффект которого в 1,7 раза превышает таковой рацемата.

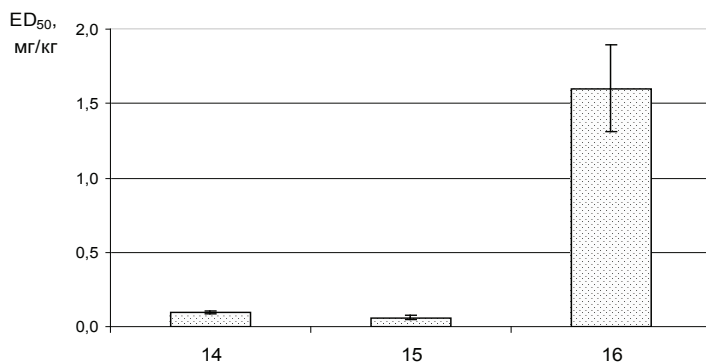


Рис. 2. Анальгетическая активность рацемата (14), S (15) и R (16) энантиомеров (по методу «корчей», вызванных уксусной кислотой в опытах *in vivo* на мышах).

Среди изученных производных выявлено наиболее активное соединение **8**, для которого проведены дополнительные исследования в тестах каррагинанового отека лапки крысы на противовоспалительную активность, формалинового отека лапки мыши на антиноцицептивную активность и острой токсичности на мышах.

Для оценки влияния на противовоспалительную активность выбрана модель каррагинанового отека лапки крысы. Проведенные нами исследования показали, что 3-пропанокси-7-бром-5-(2'-хлор)фенил-1,2-дигидро-3H-1,4-бенздиазепин-2-он (**8**) в дозе 10 мг/кг умеренно снижал размер отека, вызванного введением каррагинана в лапку, на 33,80 % и 42,95 % через 2 и 4 часа, соответственно (Рис. 3).

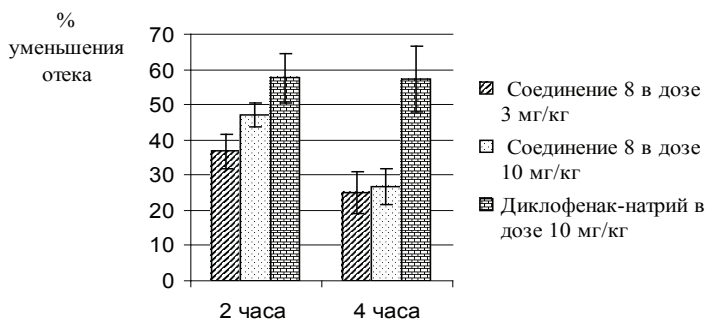


Рис. 3. Противовоспалительная активность соединения **8** по методу каррагинанового отека лапки крысы в опытах *in vivo*

Экспериментальные данные, полученные на основе формалинового теста, демонстрируют наличие высокой антиноцицептивной активности у 3-пропанокси-1,2-дигидро-3H-1,4-бенздиазепин-2-она (**8**), взятого в низких дозах, причем видна четкая зависимость антиноцицептивной активности исследуемого соединения от введенной дозы. Так при снижении дозы процент ингибирования болевой реакции для этого соединения уменьшился с 91,1 и 98,4 % в дозе 3,0 мг/кг до 76,0 и 54,0 % в дозе 0,1 мг/кг (Рис. 4) для I и II фаз, соответственно. При снижении дозы в 100 раз,

то есть введении соединения в дозе 0,01 мг/кг, все еще сохранялась способность снижать болевую реакцию, и показатели для I и II фаз составили 15,0 % и 32,1 %, соответственно.

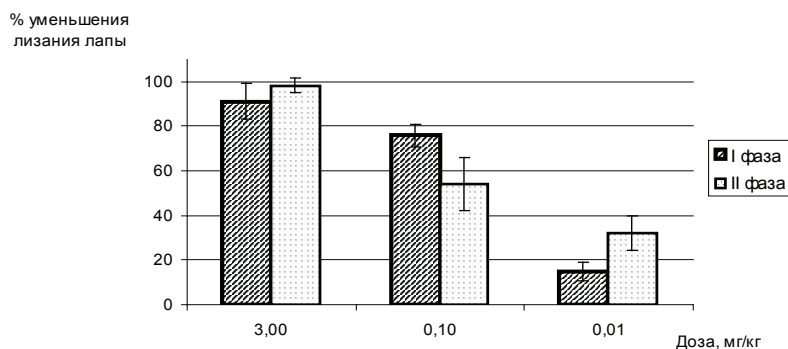


Рис. 4. Зависимость антиноцицептивной активности соединения **8** от введенной дозы в опытах *in vivo* на модели формалинового отека у мышей.

Как видно из графика (Рис. 5), соединение **8** угнетало как первую болевую, так и вторую воспалительную фазу развития отека.

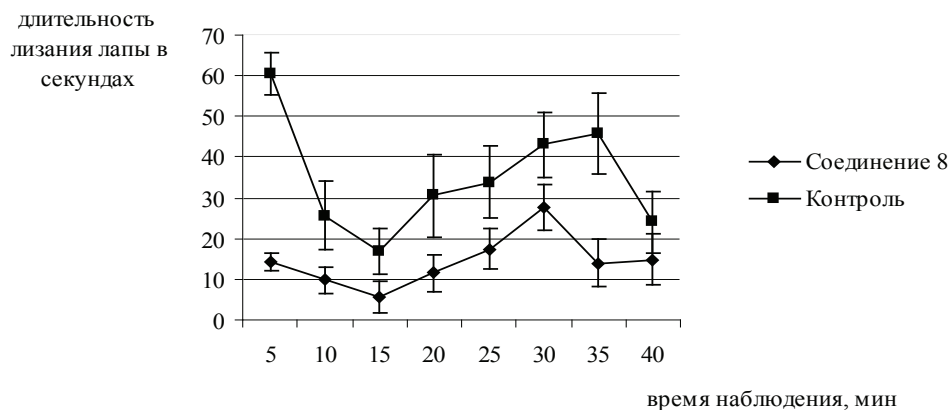


Рис. 5. Антиноцицептивная активность соединения **8** в опытах *in vivo* на модели формалинового отека у мышей.

Проведены также эксперименты по установлению длительности анальгетического действия соединения **8** (Рис. 6). Измерение активности по методу «корчей» на мышах проводилась через каждые 60 мин на протяжении 4 часов, соединение **8** вводили внутривентриально в дозе 3 мг/кг. С течением времени активность уменьшалась с 75,4 % до 55,0 % угнетения «корчей».

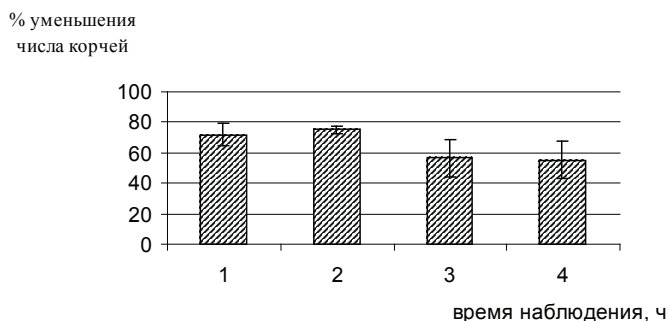


Рис. 6. Изменение анальгетической активности соединения **8** в дозе 3 мг/кг с течением времени по методу «корчей», вызванных уксусной кислотой в опытах *in vivo* на мышах.

Для выяснения механизма анальгетического действия 3-алкокси 1,2-дигидро-3H-1,4-бенздиазепин-2-онов нами проведены опыты с предварительным введением антагониста бенздиазепиновых рецепторов флумазенила и эксперименты с антагонистом опиоидных рецепторов налоксона. (Рис. 7).

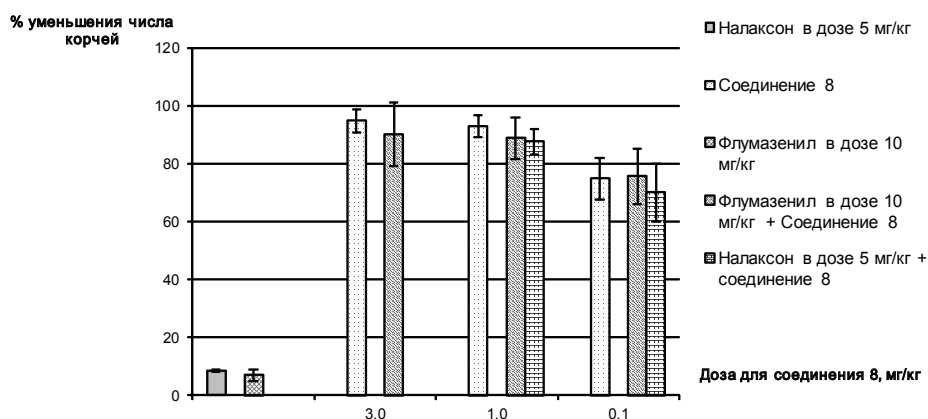


Рис. 7. Влияние предварительного введения флумазенила и налоксона на анальгетическую активность 3-алкокси-1,2-дигидро-3H-1,4-бенздиазепин-2-она (**8**) по тесту «уксуснокислых корчей» на мышах.

Приведенные данные для соединения **8** свидетельствуют о том, что введение флумазенила не отменяет анальгетическое действие изученного соединения. Для этого же аналога опыты с предварительным введением антагониста опиоидных рецепторов налоксона показали, что он не отменяет анальгетическое действие изученного соединения в опытах *in vivo* на модели «уксуснокислых корчей» у мышей.

На основании оценки острой токсичности можно заключить, что соединение **8** является малотоксичным, так как его $LD_{50} > 1000$ мг/кг.

Полученные нами экспериментальные данные свидетельствуют о перспективности поиска веществ с анальгетическими свойствами среди производных 1,2-дигидро-3H-1,4-бенздиазепин-2-онов в плане создания высокоэффективных обезболивающих средств.

Литература:

1. Бондаренко Д.А., Дьяченко И.А., Скобцов Д.И., Мурашев А.Н. *In vivo* модели для изучения анальгетической активности // Биомедицина.– **2011**.– № 2.– С. 84-94.
2. Dziadulewicz E.K., M.C. Brown, A.R. Dunstan et al. The design of non-peptide human bradykinin B₂ receptor antagonists employing the benzodiazepine peptidomimetic scaffold // *Bioorg. Med. Chem. Lett.* – **1999**. – Vol. 9. – P. 463-468.
3. Wood M.R., J.J. Kim, W. Han et al. Benzodiazepines as Potent and Selective Bradykinin B₁ Antagonists // *J. Med. Chem.* – **2003**. – Vol. 46. – № 10. – P. 1803-1806.
4. Павловский В.И., Семенішина Е.А., Кравченко И.А., Радаева И.Н., Симонов Ю.А., Гданец М., Самбурский С.Э., Андронати С.А. Синтез и противосудорожная активность 3-алкокси-1,2-дигидро-3H-1,4-бенздиазепин-2-онов // *Хим. Фарм. Журнал.*– **2012**.–Т.46, № 9.– С. 16-19.
5. Павловський В.І., Семенішина К.О., Андронати С.А., Кабанова Т.А., Халімова О.І., Редер А.С. 3-алкокси-1,2-дигідро-3H-1,4-бенздіазепін-2-они, які мають високу анальгетичну активність // Пат. 102273, МПК С07D 243/14, С07D 243/26.– заявник та власник патенту Фізико-хімічний інститут імені О.В. Богатського НАН України. – № а 2011 05837; заявл. 10.05.2011; опубл. 25.06.2013, Бюл. № 12.
6. Стефанов О.В. Доклінічні дослідження лікарських засобів. Методичні рекомендації.– Київ.– **2001**.– Видавничий дім «Авіцена».– С. 528.
7. Прозоровський В.Б. Статистическая обработка результатов фармакологических исследований // *Психофармакология и биологическая наркология.*– **2007**.–7.– № 3-4, С. 2090-2120.
8. Захаревский А.С. Влияние некоторых производных индола на нервную систему: дисс. канд. мед. наук.– Минск.– **1969**.
9. Winter C.A., E.A. Risely, G.W. Nuss Carrageenan induced oedema in hind paw of the rat as an assay for anti-inflammatory drugs // *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*– **1962**.– Vol. 3.– P. 544-547.
10. Zeilhofer H.U., Benke D., Yevenes G.E. Chronic pain states: pharmacological strategies to restore diminished inhibitory spinal pain control // *Annu.Rev.Pharmacol.Toxicol.*–**2012**.– Vol.52.–P. 111-133.
11. Tjolsen A., Berge O.-G., Hunskaar S., Rosland J. H., Hole K. The formalin test: an evaluation of the method // *Pain.*– **1992**.– Vol. 51.– P. 5-17.
12. Lattmann E., Lattmann P., Boonprakob Y., et al. *In vivo* evaluation of substituted 3-amino-1,4-benzodiazepines as anti-depressant, anxiolytic and anti-nociceptive agents // *Arzneimittelforschung.*– **2009**.–Vol. 59.– №. 2.– P. 61-71.
13. Наджафа Н., Пирали М., Даулатова Р., и др. Синтез, анальгетическая и противовоспалительная активность новых производных бензодиазепина // *Хим. – фарм. Журн.*– **2005**.– Т. 30.– № 12.– С. 21-23.
14. Wood M.R., Kim J.J., Han W., et al. Benzodiazepines as potent and selective bradykinin B₁ antagonists // *J.Med.Chem.*– **2003**.– Vol. 46.– P. 1803-1806.
15. Андронати С. А., Кабанова Т. А., Павловский В.И и др. Лиганды брадикининовых рецепторов как потенциальные анальгетические и противовоспалительные средства // *ЖОФХ.*– **2009**.– Т.7.– № 4.– С. 70-76.

Работа выполнена в рамках целевой комплексной программы фундаментальных исследований НАН Украины «Фундаментальные проблемы создания новых веществ и материалов химического производства» проект № 15-13/343.

Стаття надійшла до редакції 02.10.13

В. І. Павловський, Т. А. Кабанова, О. І. Халімова, С. А. Андронаті

Фізико-хімічний інститут ім. О. В. Богатського Національної академії наук України,
м. Одеса, Люстдорфська дорога 86, Одеса, 65080, Україна,
e-mail: medchem_department@ukr.net

АНАЛЬГЕТИЧНІ ТА ПРОТИЗАПАЛЬНІ ВЛАСТИВОСТІ НОВИХ 3-АЛКОКСИ-1,2-ДИГІДРО-3H-1,4-БЕНЗДІАЗЕПІН-2-ОНІВ

Вивчено анальгетичну активність низки нових заміщених у третьому положенні 1,2-дигідро-3H-1,4-бензодиазепін-2-онів, в якості лідера виявлено сполуку **8** (3-пропокси-7-бром-5-(2'-хлор)феніл-1,2-дигідро-3H-1,4-бензодиазепін-2-он) з показником $ED_{50} = 0,030 \pm 0,007$ мг/кг, яка також проявила протизапальну активність в дослідах *in vivo* на щурах.

Ключові слова: 3-заміщені 1,4-бензодиазепіни, анальгезія, набряк.

V. I. Pavlovsky, T. A. Kabanova, E. I. Khalimova, S. A. Andronati

A. V. Bogatsky Physico-Chemical Institute of NAS of Ukraine
86, Lustdorfskaya doroga, Odessa, 65080, Ukraine, e-mail: medchem_department@ukr.net

ANALGESIC AND ANTI-INFLAMMATORY PROPERTIES OF THE NOVEL 3- ALKOXY-1,2-DIHYDRO-3H-1,4-BENZODIAZEPIN-2- ONES

The analgesic activity of the series of 1,2-dihydro-3H-1,4-benzodiazepin-2-ones substituted in position 3 was studied. As a leader, it was revealed the compound **8** (3-propoxy-7-bromo-5-(2'-chloro)phenyl-1,2-dihydro-3H-1,4-benzodiazepin-2-one) with ED_{50} value of $0,030 \pm 0,007$ mg/kg, which also has demonstrated *in vivo* anti-inflammatory activity in rats.

Keywords: 3-substituted 1,4-benzodiazepines, analgesia, oedema