

Т. А. Кабанова, В. І. Павловський, О. І. Халімова, І. Ю. Ушаков,
Т. Л. Карасьова, С. А. Андронаті

Аналгетичні та протизапальні властивості 1-метоксикарбонілметил-3- ариламінобенздіазепін-2-онів

Фізико-хімічний інститут імені О. В. Богатського НАН України, м. Одеса

Ключові слова: 1-метоксикарбонілметил-3-ариламінобенздіазепін-2-они, аналгезія, карагінановий набряк, формаліновий тест

До числа найпоширеніших аналгетиків, що використовуються в клінічній практиці, відносяться нестероїдні протизапальні лікарські засоби (НПЛЗ) і опіоїдні аналгетики (похідні морфіну). На жаль, сучасні НПЛЗ мають низку виражених небажаних побічних ефектів (ульцерогенну дію, гепатотоксичність, нефротоксичність, гематотоксичність та ін.). Наркотичні (опіоїдні) аналгетики застосовують обмежено через їхню здатність викликати фізичну та психічну залежність.

Із 60-х років ХХ століття, коли бенздіазепіни були відкриті як анксиолітики, численні дослідження дозволили виявити нові біологічні мішені, з якими можуть взаємодіяти бенздіазепіни, та, відповідно, нові їхні впливи на фізіологічні й патологічні процеси в організмі, включаючи й нові ефекти, такі як аналгетичні, протизапальні й антигіпералгезивні (купірування надчутливості до болю). Експериментальні дані демонструють здатність деяких похідних бенздіазепінового ряду, а саме бенздіазепінів, селективних за підтипами ГАМК_A рецепторів, проявляти чітку антигіпералгезивну дію щодо запального та нейропатичного болю в моделях на тваринах [1]. З іншого боку, дослідниками компаній Merk і Elan Pharmaceuticals запатентовано серію 3-заміщених бенздіазепінів – антагоністів брадикінінових рецепторів, які виявляють високу аналгетичну і протизапальну активність *in vivo* [2, 3].

Мета дослідження – пошук сполук з аналгетичними властивостями серед нових 3-заміщених бенздіазепінонів і дослідження їхніх аналгетичних та протизапальних властивостей.

Матеріали та методи. Експерименти проводили на нелінійних білих щурах масою 240–260 г та нелінійних білих мишах масою 20–25 г. Тварин утримували в звичайних умовах віварію (їжа та вода *ad libitum*) на стандартному харчовому раціоні за природного світлового циклу.

Усі експериментальні дослідження здійснювали відповідно до методик, рекомендованих Комітетом з біоетики Державного фармакологічного центру МОЗ України та вимог «Європейської конвенції захисту хребетних тварин, яких використовують з експериментальною та іншою науковою метою» (1986).

Статистична обробка експериментальних даних включала розрахунки середніх арифметичних значень (M), їхніх похибок ($\pm m$). Для визначення вірогідних відмінностей між середніми величинами використовували критерій Стьюдента (t). Показники ED₅₀ розраховували за методом В. Б. Прозоровського [4].

Вивчення аналгетичної дії. Метод «оцтовокислих корчів». «Корчі» у мишей викликали 0,75 % водним розчином оцтової кислоти з розрахунку 0,1 мл на 10 г маси тіла тварини, який вводили внутрішньоочеревинно через 40 хв після внутрішньоочеревинного введення досліджуваних сполук. Внутрішньоочеревинне введення оцтової кислоти викликало синдром «корчення, судомні скорочення черевних м'язів, які супроводжувалися витяган-

ням задніх кінцівок і вигинанням спини (корчі) [5].

За реакцією мишей на введення оцтової кислоти спостерігали протягом 20 хв після введення подразника. Кожну мишу було розміщено в окрему прозору ємність. Під час спостереження підраховували загальне число нападів екстензорних судом (корчів).

Аналгетичну активність досліджуваних сполук оцінювали за їхньою здатністю зменшувати кількість корчів за обраний відрізок часу (20 хв) у дослідній групі тварин порівняно з групою контрольних тварин і виражали у відсотках. Розрахунок проводили за нижченаведеною формулою:

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

де AA – аналгетична активність, %;

C_k – середня кількість корчів у контрольній групі;

C_d – середня кількість корчів у дослідній групі.

Формаліновий тест. Формаліновий тест проводили на мишах. Досліджені сполуки та препарат порівняння диклофенак-натрію вводили внутрішньоочеревинно за 40 хв перед індукцією запалення. Контрольна група мишей одержувала еквівалентну кількість фізіологічного розчину в емульсії з Твін-80.

Утворення набряку провокували субплантарною ін'єкцією 3 % водного розчину формаліну об'ємом 0,01 мл за допомогою мікрошприца (20 мкл) з голкою 0,3 g у праву задню кінцівку тварин дослідних та контрольних груп. Одразу після ін'єкції розчину формаліну кожну тварину розміщували в прозорий бокс розміром 8 × 8 × 8 см із дзеркалом, орієнтованим під кутом 45°, щоб реєструвати положення лапок.

За піддослідною твариною спостерігали протягом 40 хв, фіксуючи час, витрачений твариною на лизання набряклої кінцівки. Інтенсивність больової відповіді в першу й другу фази тесту оцінювали за кількістю та тривалістю патернів облизування (у с) набряклої лапи. Час облизування підсумовували для кожної тварини. Здатність досліджуваних сполук впливати на больову поведінку піддослідних тварин у першій (больовій) фазі (перші 5 хв) і другій

(запальній) фазі (з 15 до 40 хв) визначали за зменшенням часу облизування набряклої кінцівки [9].

Вивчення протизапальних властивостей. Модель карагінанового набряку лапи щурів. Протизапальні властивості досліджуваних сполук вивчали на моделі карагінанового набряку стопи щурів. У дослідах використовували самців білих щурів масою 150–180 г. Перед введенням експериментальних речовин проводили вимірювання об'єму лапи щура, у яку в подальшому робили ін'єкції флогогену. Досліджувані сполуки та препарат порівняння диклофенак-натрію вводили внутрішньоочеревинно за 40 хв перед індукцією запалення. Контрольна група щурів одержувала еквівалентну кількість фізіологічного розчину в емульсії з Твін-80. Гостре асептичне запалення викликали введенням 1 % водного розчину λ -карагінану об'ємом 0,1 мл під плантарний апоневроз задньої кінцівки тварин дослідних та контрольних груп [6, 7]. Виразність запальної реакції оцінювали через 2 та 4 год після введення флогогену. Реєстрацію величини набряку здійснювали за допомогою механічного вимірювання об'єму стоп за А. С. Захаревським та виражали в умовних одиницях [8]. Про ступінь набряку судили за різницею об'ємів набряклої стопи та стопи перед індукцією запалення.

Результати та їх обговорення. Зважаючи на наявність у науковій літературі даних про те, що 3-заміщені 1,2-дигідро-3H-1,4-бенздіазепіни проявляють значну аналгетичну активність [1–3, 10–12], з метою пошуку нових аналгетиків у відділі медичної хімії Фізико-хімічного інституту імені О. В. Богатського НАН України здійснено синтез 1-метоксикарбонілметил-7-бром-5-феніл-3-ариламіно-1,2-дигідро-3H-1,4-бенздіазепін-2-онів – сполуки 1-10 (табл. 1) [13, 14].

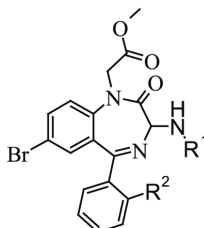
Знайдені показники ED_{50} 3-ариламіно похідних за аналгетичною активністю знаходилися в діапазоні від 0,007 до 0,670 мг/кг, при цьому всі тестовані сполуки перевищували за аналгетичною активністю диклофенак-натрію в дозі ED_{50} (експериментально знайдене значення ED_{50} дорівнює $10,0 \pm 1,8$ мг/кг).

Вихідна сполука **1**, яка містить у третьому положенні залишок аніліну, виявила помірну аналгетичну активність (0,670 мг/кг, табл. 1). При введенні замісників до анілінового фраг-

мента (сполуки **2–10**) аналгетична активність підвищилась, і показники ED_{50} знизилися тою чи іншою мірою, залежно від природи та положення замісника в аніліновому фрагменті.

Таблиця 1

Аналгетична активність 1-метоксикарбонілметил-7-бром-5-феніл-3-ариламіно-1,2-дигідро-3H-1,4-бенздіазепін-2-онів за методом «корців», викликаних введенням оцтової кислоти, у дослідях in vivo на мишах



№	R ¹	R ²	ED ₅₀ , мг/кг
1		H	0,670 ± 0,120
2		H	0,100 ± 0,030
3		H	0,250 ± 0,120
4		H	0,540 ± 0,080
5		Cl	0,060 ± 0,030
6		Cl	0,090 ± 0,050
7		Cl	0,070 ± 0,030
8		H	0,220 ± 0,070
9		H	0,007 ± 0,018
10		H	0,030 ± 0,008
Диклофенак натрію			10,000 ± 1,800

Таким чином, наявність замісників в аніліновому фрагменті досліджених сполук поза всякими сумнівами робить позитивний внесок в аналгетичну активність, яку ці сполуки проявили на моделі «корчів», викликаних введенням оцтової кислоти, у мишей.

Слід зазначити вплив на аналгетичну активність того, у якому положенні (*орто*-, *мета*- або *пара*-) знаходиться замісник в ариламінному фрагменті.

Якщо розглянути сполуки 2–4 з нітрогрупою в положенні *орто*-, *мета*- або *пара*- відповідно та фенільний замісник у п'ятому положенні бенздіазепінового ядра, можна відмітити, що показники аналгетичної активності розташовуються в порядку *пара*- < *мета*- < *орто*-NO₂ (табл. 1), причому аналог з нітрогрупою в *орто*-положенні є в два рази активнішим, ніж аналог з нітрогрупою в *мета*-положенні, при переміщенні нітрогрупи в *пара*- положення активність знижується ще в два рази.

Що стосується сполук 5–7, котрі відрізняються від сполук попередньої групи наявністю *орто*-хлорфенільного замісника в п'ятому положенні бенздіазепінового ядра, різниця у величинах показників ED₅₀ за аналгетичною активністю цих аналогів є незначною, хоча загалом активність представників

цієї групи є вищою порівняно з представниками попередньої групи сполук.

Що стосується сполук 8–10, то найкращий результат щодо аналгетичної активності дає *мета*-положення метоксикарбонільної групи в аніліновому фрагменті (сполука 9). Ця сполука має найвищий показник аналгетичної активності (ED₅₀ дорівнює 0,007 мг/кг) серед усіх досліджених представників 1-метоксикарбонілметил-7-бром-5-феніл-3-ариламіно-1,2-дигідро-3H-1,4-бенздіазепін-2-онів.

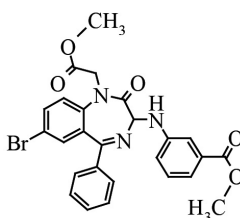
У результаті аналізу даних вищеписаного тестування виявлено найактивнішу сполуку, для якої проведено додаткові дослідження в тестах карагінанового набряку лапи щурів на протизапальну активність, а також формалінового набряку лапи мишей для виявлення дії на першу (больову) і другу (запальну) фази больової поведінки тварин.

Проведені нами дослідження показали, що 1-метоксикарбонілметил-7-бром-5-феніл-3-(3-метоксикарбонілфеніл)аміно-1,2-дигідро-3H-1,4-бенздіазепін-2-он (9) помірно знижував розмір набряку, викликаного введенням карагінану в лапу щура (табл. 2).

У дозі 10 мг/кг сполука 9 знижувала більше ніж на 40 % утворення набряку через 2 год після введення карагінану в

Таблиця 2

Протизапальні властивості сполуки-лідера 1-метоксикарбонілметил-7-бром-5-феніл-3-(3-метоксикарбонілфеніл)аміно-1,2-дигідро-3H-1,4-бенздіазепін-2-ону (9), (M ± m)



Найменування	Карагінановий набряк			Формаліновий тест		
	Об'єм лапи, у. о.			Час лизання лапи, с		
	Доза, мг/кг	2 год	4 год	Доза, мг/кг	I фаза	II фаза
Контроль	–	2,20 ± 0,30	2,50 ± 0,30	–	59,2 ± 5,3	142,5 ± 11,4
Сполука 9	10,0	1,27 ± 0,15*	2,10 ± 0,25	0,1	19,6 ± 2,9*	101,6 ± 1,4*
Диклофенак натрію	10,0	0,94 ± 0,13*	1,07 ± 0,17*	10,0	29,0 ± 3,2*	66,1 ± 7,9*

Примітка. P < 0,05 – вірогідна різниця параметрів відносно контролю.

лапу щура, через 4 год показник знижувався до 16 %.

З використанням формалінового тесту в дослідях *in vivo* на мишах досліджено вплив сполуки-лідера **9** на больову поведінку тварин (табл. 2).

Сполука **9** у дозі 0,1 мг/кг мала більшу активність, ніж диклофенак-натрію, узятий у дозі 10 мг/кг, у першій больовій фазі формалінового тесту, у другій запальній фазі вона поступалася референтному препарату за здатністю впливати на больову поведінку тварин за умов патології.

Висновки

1. Уперше вивчено анальгетичну активність у 10 нових похідних 3-ариламіно-1,2-дигідро-3H-1,4-бенздіазепін-2-онів (сполуки 1–10) *in vivo* за методом «корчів», викликаних введенням оцтової кислоти мишам.

Для всіх досліджених сполук встановлено показники ED_{50} , які знаходяться в діапазоні 0,007–0,670 мг/кг. Виявлено сполуки, які мають показники анальгетичної активності вищі за показники диклофенак-натрію.

2. Виявлено залежність показників анальгетичної активності представників даного ряду від природи та положення (*орто*-, *мета*-, *пара*-) замісників у фрагменті, що знаходиться в третьому положенні бенздіазепінового гетероциклу.

3. Визначено протизапальну активність сполуки-лідера (**9**) у дозі 10 мг/кг на моделі карагінанового набряку в щурів, порівняну з активністю диклофенак-натрію в дозі 10 мг/кг.

4. Встановлено здатність сполуки **9** у дозі 0,1 мг/кг виразно пригнічувати больову поведінку мишей у першій (больовій) і в другій (запальній) фазах «формалінового набряку».

1. Zeilhofer H. U. Chronic pain states: pharmacological strategies to restore diminished inhibitory spinal pain control / Zeilhofer H. U., Benke D., Yevenes G. E. // *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* – 2012. – V. 52. – P. 111–133.
2. WO 2006/071775 US, A2 C07D 403/14, Novel compounds useful for bradykinin B1 receptor antagonism, Elan Pharmaceuticals, INC., Publ. 06.07.2006.
3. WO 02/099388 US, A2 G01N, Benzodiazepine bradykinin antagonists, Merck & CO., Publ. 12.12.2002.
4. Прозоровский В. Б. Статистическая обработка результатов фармакологических исследований / Прозоровский В. Б. // *Психофармакология и биологическая наркология.* – 2007. – Т. 7. – № 3–4. – С. 2090–2120.
5. Гацура В. В. Методы первичного фармакологического исследования биологически активных веществ / Гацура В. В. – М.: Медицина, 1974. – С. 130.
6. Тринус Ф. П. Нестероидные противовоспалительные средства / Тринус Ф. П., Мохорт Н. А., Клебанов Б. М. – Киев, 1975. – С. 204–231.
7. Winter C. A. Carrageenan induced oedema in hind paw of the rat as an assay for anti-inflammatory drugs / Winter C. A., Risley E. A., Nuss G. V. // *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* – 1962. – V. 111. – P. 544–547.
8. Захаревский А. С. Влияние некоторых производных индола на нервную систему / Дисс. канд. мед. наук.; Захаревский А. С. – Минск, 1969. – С. 78–80.
9. The formalin test: an evaluation of the method / Tjolsen A., Berge O.-G., Hunskaar S. [et al] / *Pain.* – 1992. – V. 51. – P. 5–17.
10. *In vivo* evaluation of substituted 3-amino-1,4-benzodiazepines as anti-depressant, anxiolytic and anti-nociceptive agents / Lattmann E., Lattmann P., Boonprakob Y. [et al.] // *Arzneimittelforschung.* – 2009. – V. 59, № 2. – P. 61–71.
11. Синтез, анальгетическая и противовоспалительная активность новых производных бензодиазепина / Наджафа Н., Пирали М., Даулатова Р., [и др.] // *Хим.-фарм. журн.* – 2005. – V. 30, № 12. – С. 21–23.
12. Analgesic effects of 3-substituted derivatives of 1,4-benzodiazepines and their possible mechanisms / Pavlovsky V. I., Tsybalyuk O. V., Martynuk V. S. [et al.] // *Neurophysiology.* – 2013. – V. 45, № 5/6. – P. 427–432.
13. Павловський В. І., Кабанова Т. А., Халімова О. І., Ушаков І. Ю., Андронаті С. А. Застосування 1-метоксикарбонілметил-7-бром-5-феніл-3-ариламіно-1,2-дигідро-3H-1,4-бенздіазепін-2-онів як анальгетичних засобів // Пат. 103803, МПК (2013) C07D 243/14, 243/26, 243/24, 209/00 – заявник та власник патенту Фізико-хімічний інститут імені О. В. Богатського НАН України. – № а 201114668; заявл. 12.12.2011; опубл. 25.01.2013. Бюл. № 22.
14. Павловський В. І., Ушаков І. Ю., Андронаті С. А., Кабанова Т. А., Халімова О. І. 7-бром-5-феніл-3-ариламіно-1,2-дигідро-3H-1,4-бенздіазепін-2-они як анальгетичні агенти // Пат. 105703, МПК (2014) C07D 243/14, 243/06, 243/16, 209/00. – заявник та власник патенту Фізико-хімічний інститут імені О. В. Богатського НАН України. – № а 2012 13432; заявл. 26.11.2012; опубл. 10.06.2014, Бюл. № 11.

**Т. А. Кабанова, В. І. Павловський, О. І. Халімова, І. Ю. Ушаков,
Т. Л. Карасьова, С. А. Андронаті**

Аналгетичні та протизапальні властивості 1-метоксикарбонілметил-3-ариламінобенздіазепін-2-онів

Мета дослідження – вивчення аналгетичних властивостей раніше синтезованих 1-метоксикарбонілметил-3-ариламінобенздіазепін-2-онів.

Аналгетичну активність вивчали в дослідах на мишах за методами «корчів», викликаних внутрішньоочеревинним введенням оцтової кислоти, і в формаліновому тесті. Протизапальну активність вивчали в дослідах на щурах на моделі карагінанового набряку. Як препарат порівняння використовували диклофенак-натрій. Усі сполуки вводили внутрішньоочеревинно.

Знайдено високу аналгетичну активність нових сполук ряду 3-ариламіно-1,2-дигідро-3Н-1,4-бенздіазепін-2-онів, показники ED_{50} за аналгетичною активністю були в діапазоні від 0,007 до 0,670 мг/кг, при цьому всі тестовані сполуки перевищували за аналгетичною активністю препарат порівняння диклофенак-натрій.

Слід відмітити деякі закономірності залежності аналгетичної активності 3-ариламіно похідних від їхньої структури, а саме позитивний вплив на аналгетичну активність положення (о-, м- або л-) і природи замісника в ариламініному фрагменті.

Виявлено найактивнішу сполуку 9 з показником ED_{50} $0,007 \pm 0,018$ мг/кг за аналгетичною активністю в тесті «оцтовокислих корчів» на мишах.

На моделі карагінанового набряку лапи щура (протизапальна активність) сполука 9 у дозі 10 мг/кг знижувала більш ніж на 40 % утворення набряку через 2 год після введення карагінану, через 4 год показник знижувався до 16 %. У формаліновому тесті сполука 9 у дозі 0,1 мг/кг знижувала показник больової поведінки мишей у першій та другій фазах тесту на 66,9 % та 28,7% відповідно.

Отримані дані свідчать про перспективність сполук вивченого ряду для пошуку і створення нових ефективних аналгетичних і протизапальних засобів.

Ключові слова: 1-метоксикарбонілметил-3-ариламінобенздіазепін-2-они, аналгезія, карагінановий набряк, формаліновий тест

**Т. А. Кабанова, В. И. Павловский, Е. И. Халимова, И. Ю. Ушаков,
Т. Л. Карасева, С. А. Андронати**

Анальгетические и противовоспалительные свойства 1-метоксикарбонилметил-3-ариламинобенздиазепин-2-онов

Цель исследования – изучение анальгетических свойств ранее синтезированных 1-метоксикарбонилметил-3-ариламинобенздиазепин-2-онов.

Анальгетическую активность изучали в опытах на мышах по методам «корчей», вызванных внутрибрюшинным введением уксусной кислоты, и в формалиновом тесте. Противовоспалительную активность изучали в опытах на крысах по методу карагинанового отека. В качестве препарата сравнения использовали диклофенак-натрий. Все соединения вводили внутрибрюшинно.

Обнаружена высокая анальгетическая активность новых соединений ряда 3-ариламино-1,2-дигидро-3Н-1,4-бенздиазепин-2-онов, показатели ED_{50} по анальгетической активности находятся в диапазоне доз от 0,007 до 0,670 мг/кг, при этом все тестируемые соединения превышали по анальгетической активности препарат сравнения диклофенак-натрий.

Можно отметить некоторые закономерности зависимости анальгетической активности 3-арил-амино производных от их структуры, а именно влияние на анальгетическую активность положения (о-, м- или л-) и природы заместителя в ариламином фрагменте.

Виявлено найбільш активне соединение 9 с показателем ED_{50} , равным $0,007 \pm 0,018$ мг/кг, по анальгетической активности в тесте «уксуснокислых корчей» на мышах.

На модели карагинанового отека лапы крысы (противовоспалительная активность) соединение 9 в дозе 10 мг/кг уменьшает более чем на 40 % образование отека через 2 ч после введения карагинана, через 4 ч показатель снижался до 16 %. В формалиновом тесте соединение 9 в дозе 0,1 мг/кг снижало показатель болевого поведения мышей в первой и второй фазах теста на 66,9 % и 28,7 %, соответственно.

Полученные данные свидетельствуют о перспективности соединений изученного ряда для поиска и создания новых эффективных анальгетических и противовоспалительных средств.

Ключевые слова: 1-метоксикарбонилметил-3-ариламинобенздиазепин-2-оны, аналгезия, карагинановый отек, формалиновый тест

**T. A. Kabanova, V. I. Pavlovsky, E. I. Khalimova, I. Yu. Ushakov,
T. L. Karaseva, S. A. Andronati**

Analgesic and anti-inflammatory properties of 1-methoxycarbonylmethyl-3-aryl-aminobenzodiazepine-2-ones

The aim of work is to study the analgesic properties of previously synthesized 1-methoxycarbonylmethyl-3-arylamino benzodiazepine-2-ones.

Analgesic activity was studied on mice on the model of «writhing» caused by intraperitoneal injection of acetic acid solution and in formalin test. Anti-inflammatory activity was studied on the model of carrageenan-induced paw edema on rats. The diclofenac-sodium was used as the standard preparation. All compounds were administrated intraperitoneally.

There was found a high analgesic activity for the novel compounds of 3-arylamino-1,2-dihydro-3H-1,4-benzodiazepine-2-ones series, ED₅₀ indices for analgesic activity were in the dose range from 0,007 to 0,670 mg/kg, all tested compounds by analgesic activity values exceeded reference preparation, diclofenac-sodium.

It may be noted some regularities of the dependance of analgesic activity values for 3-arylamino derivatives from their structure, namely the influences on analgesic activity of position (*o*-, *m*- or *p*-), and the substituent nature in the arylamine moiety.

The most active compound 9 with a ED₅₀ value of 0,007 ± 0,018 mg/kg for analgesic activity in the «acetic writhings» test on mice was revealed.

At the carrageenan paw edema model in rats (anti-inflammatory activity) compound 9 in a dose of 10 mg/kg reduced edema formation by more than 40 % within 2 hours after carrageenan administration in the rat paw, after 4 hours the value of edema decrease falls to 16 %. In the formalin test, compound 9 at a dose of 0,1 mg/kg decreased the ratio of the nociceptive behavior of mice in the first and second phases of the test of 66,9 % and 28,7 %, respectively.

The data obtained indicate that 1-methoxycarbonylmethyl-3-arylamino benzodiazepin-2-ones are perspective for search and creation of new effective analgesic and anti-inflammatory agents.

Key words: 1-methoxycarbonylmethyl-3-arylamino benzodiazepin-2-ones, analgesia, carrageenan edema, formalin test

Надійшла: 03.10.2014 р.

Контактна особа: Павловський Віктор Іванович, кандидат хімічних наук, відділ медичної хімії, Фізико-хімічний інститут імені А. В. Богатського Національної академії наук України, буд. 86, Люстдорфська дорога, Одеса, 65080. Тел.: +38 0 48 765 92 30.
Електронна пошта: medchem_department@ukr.net