

Н. А. Пулина, Т. А. Юшкова, А. И. Краснова

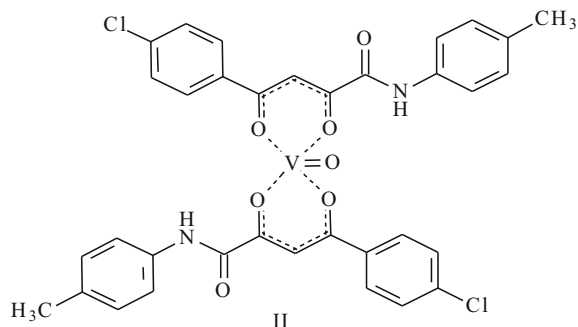
## БИОЛОГИЧЕСКАЯ АКТИВНОСТЬ БИС[3-(4-ХЛОРФЕНИЛ)-1-(4-МЕТИЛФЕНИЛ)КАРБОКСАМИДО- 1,3-ПРОПАНДИОНАТО]ОКСОВАНАДИЯ

ГБОУ ВПО "Пермская государственная фармацевтическая академия" Министерства здравоохранения Российской Федерации, Пермь, Пермский край, Россия

Изучена острая токсичность, гипогликемическая, антигипоксическая, иммунофармакологическая активность, влияние на поведение и память бис[3-(4-хлорфенил)-1-(4-метилфенил)карбоксамидо-1,3-пропандионато]оксованадия в сравнении с исходными лигандами сульфатом ванадила и метформином. Выявлена низкая токсичность, гипогликемическая, иммуномодулирующая активность, превышающая действие препарата сравнения и исходных продуктов его синтеза.

**Ключевые слова:** бис[3-(4-хлорфенил)-1-(4-метилфенил)карбоксамидо-1,3-пропандионато]оксованадий; гипогликемическая; иммунофармакологическая активность.

Сложность фармакотерапии сахарного диабета (СД), сопряженная с его многофакторным генезом, высокая летальность и инвалидизация вследствие развития микро- и макроангиопатий стимулируют поиск новых высокоэффективных антидиабетических препаратов, обеспечивающих целевые терапевтические и профилактические эффекты. Одним из перспективных направлений исследований в этой области является синтез и изучение новых органических соединений, в частности, металлокомплексных соединений ванадия (IV) ввиду выявления у них положительного влияния на углеводный обмен [1, 2]. Определенными преимуществами в реакциях комплексообразования могут обладать органические лиганды, являющиеся естественными метаболитами организма, в том числе биологически активные производные 4-арил-2-гидрокси-4-оксо-2-бутеновых кислот. Рассматривая возможность потенцирования фармакологических эффектов данных соединений путем их хелатирования, ранее нами исследовано взаимодействие 4-метилфениламида 4-(4-хлорфенил)-2-гидрокси-4-оксо-2-бутеновой кислоты (I) с сульфатом ванадила (III) с образованием бис[3-(4-хлорфенил)-1-(4-метилфенил)карбоксамидо-1,3-пропандионато]оксованадия (II) [3].

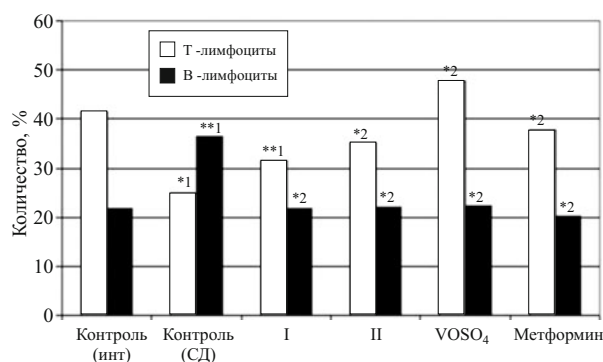


Целью работы является сравнительное многофакторное изучение биологической активности хелата II и исходных продуктов его синтеза.

### Экспериментальная часть

Острую токсичность исследуемых соединений изучали на белых нелинейных мышах обоего пола массой 20–25 г с определением ЛД<sub>50</sub> по методу Першина Г. Н. [4]. Соединения вводили перорально в виде взвеси в 2 % крахмальном растворе из расчета 0,1 мл/10 г однократно, после чего животные находились под наблюдением в течение 14 дней [5]. Контрольным животным вводили эквивалентное количество 2 % крахмального раствора.

Гипогликемическую активность изучали на модели аллоксанового диабета, который моделировали внутривенным введением аллоксана тригидрата ("Alfa Aesar") в дозе 170 мг/кг нелинейным крысам обоего пола массой 200–250 г. Животных лишали пищи за 8 ч до опыта и на время его проведения. Эксперименты проводили на животных, у которых развивалась острая гипергликемия через 72 ч после введения диабетогена [5]. Исследуемые вещества I, II и III, а также препарат сравнения метформин (IV) в виде гидрохлорида (ОАО "Фармакон") вводили перорально в дозе 50 мг/кг в виде взвеси в 2 % крахмальном растворе. Концентрацию глюкозы в крови животных опреде-



Влияние соединений I, II, ванадила сульфата и метформина на количество Т-, В-лимфоцитов. \*  $p < 0,05$ , \*\*  $p < 0,01$ ; 1 — по отношению к контролю (интактные животные); 2 — к контролю (СД).

ляли глюкозооксидазным методом до и через 120 мин после введения исследуемых веществ. Степень гипогликемической активности сравнивали с показателями контрольной группы животных с СД, получавшей 2 % крахмальный раствор.

При исследовании влияния на поведенческую активность использовали стандартные психофармакологические тесты как на интактных животных, так и на крысах с аллоксановым СД. Для оценки влияния веществ на ориентировочно-исследовательское поведение использовали тест “открытое поле” (ОП), для изучения воздействия на формирование и воспроизведение памятного следа — метод “условная реакция пассивного избегания” (УРПИ) [5].

Исследование в “ОП” осуществляли через 60 мин после перорального введения соединений I, II, III и IV в дозе 50 мг/кг в виде взвеси в 2 % крахмальном растворе. В течение 3-минутной экспозиции регистрировали горизонтальную, вертикальную двигательную активность и количество исследованных отверстий. Контрольным животным вводили эквивалентное количество 2 % крахмального раствора.

Формирование УРПИ осуществляли в двухкамерной экспериментальной установке с электрофицированным полом в течение 3 мин. Влияние исследуемых соединений на прочность сформированной реакции характеризовали степенью ее сохранения через 24 ч: учитывали число животных в %, зашедших в затемненный отсек камеры, и время первого захода. Соединения I, II, III и IV вводили перорально в дозе 50 мг/кг в виде взвеси в 2 % крахмальном растворе за 1 ч до помещения в экспериментальную установку.

Антигипоксическую активность изучали на белых нелинейных мышах на модели нормобарической гипоксии с гиперкапнией при помещении поодиночке в герметически закрывающиеся сосуды (250 см<sup>3</sup>) [5]. Регистрировали продолжительность жизни животных. Исследуемые вещества I, II, а также III и IV вводили перорально в дозе 50 мг/кг в виде взвеси в 2 % крахмальном растворе за 1 ч до эксперимента. Мышам контрольной группы в том же объеме вводили 2 % крахмальный раствор. Эталонным препаратом служил пирарцетам (V) [6] в дозе 50 мг/кг, вводимый аналогично.

Т а б л и ц а 1

**Гипогликемическая активность и острая токсичность соединений I, II, III и IV**

Соединение	ЛД <sub>50</sub> , мг/кг	Доза, мг/кг	Уровень гликемии, ммоль/л		% торможения гипергликемии
			0 мин	120 мин	
I	1110	50	17,8 ± 1,0	16,3 ± 0,5	8,4 ± 2,4
II	2820	50	16,9 ± 1,0	5,3 ± 0,4	69,0 ± 2,6 <sup>***1**2***3</sup>
III	98	50	17,7 ± 0,7	10,0 ± 0,5	43,4 ± 2,5 <sup>***1*2</sup>
IV	1266	50	16,7 ± 1,0	7,6 ± 0,6	54,5 ± 2,9 <sup>***1*3</sup>
Контроль	—	—	16,6 ± 0,9	16,2 ± 0,5	2,2 ± 2,1

\*  $p < 0,05$ , \*\*  $p < 0,01$ , \*\*\*  $p < 0,001$ ; <sup>1</sup> — по отношению к контролю; <sup>2</sup> — по отношению к IV; <sup>3</sup> — по отношению к III.

Т а б л и ц а 2

**Влияние соединений I – IV на поведенческую активность и условно-рефлекторное обучение экспериментальных животных**

Группа	Соединение	Тест “открытое поле”			Тест “условная реакция пассивного избегания”			
		количество			Обучение		Через 24 ч	
		ОП	стоек	ОО	Латентный период,	n/N, %	Латентный период,	n/N, %
Интактные животные	I	27,7 ± 3,6 <sup>*3</sup>	9,7 ± 1,3 <sup>*2</sup>	26,3 ± 1,5 <sup>***3</sup>	51,3 ± 9,1	6/6 (100 %)	180,0 ± 0,0 <sup>*2</sup>	0/6 (0 %)
	II	29,5 ± 4,4 <sup>*3</sup>	11,8 ± 1,0	28,8 ± 4,2 <sup>*3</sup>	36,3 ± 5,2	6/6 (100 %)	180,0 ± 0,0 <sup>*2</sup>	0/6 (0 %)
	III	29,1 ± 3,5 <sup>**3</sup>	10,4 ± 1,4	31,5 ± 3,3 <sup>***3</sup>	45,2 ± 6,2	6/6 (100 %)	176,2 ± 9,8	1/6 (16,7 %)
	IV	16,0 ± 2,5 <sup>***2</sup>	13,3 ± 1,6	12,0 ± 1,9 <sup>**2</sup>	32,0 ± 3,9	6/6 (100 %)	148,3 ± 20,0	2/6 (33,3 %)
	КГ	32,8 ± 2,3	15,8 ± 0,6	34,5 ± 2,4	46,6 ± 11,9	9/9 (100 %)	152,1 ± 11,1	7/9 (22,2 %)
Животные с СД	I	17,7 ± 3,6 <sup>***1***3</sup>	6,7 ± 1,3 <sup>***2</sup>	18,3 ± 1,5 <sup>***1***3</sup>	...	...	...	...
	II	35,3 ± 4,2 <sup>**1***3</sup>	10,6 ± 2,6 <sup>***3</sup>	17,4 ± 1,6 <sup>***1*2***3</sup>	...	...	...	...
	III	10,1 ± 1,1 <sup>*2*3</sup>	14,9 ± 2,0 <sup>***1***3</sup>	10,8 ± 0,8 <sup>*1*3</sup>	...	...	...	...
	IV	6,4 ± 0,2 <sup>*1***2</sup>	8,0 ± 1,2 <sup>***2</sup>	4,4 ± 0,7 <sup>**2</sup>	...	...	...	...
	КГ (СД)	9,5 ± 1,7 <sup>***2</sup>	6,2 ± 2,0 <sup>***2</sup>	4,7 ± 0,8 <sup>***2</sup>	177,6 ± 8,9	1/9 (11,1 %)	180,0 ± 0,0	0/9 (0 %)

\*  $p < 0,05$ , \*\*  $p < 0,01$ , \*\*\*  $p < 0,001$ ; Данные достоверны по отношению к показателю: <sup>1</sup> — контрольной группы с СД, <sup>2</sup> — интактной группы контроля, <sup>3</sup> — IV.

ОП — обследованные поля, ОО — обследованные отверстия, КГ — контрольная группа, n/N — количество животных в группе, посетивших темный отсек, ... — не исследовано.

## Антигипоксическая активность соединений I, II, ванадила сульфата и метформина

Соединение	Доза, мг/кг	Нормобарическая гипоксия с гиперкапнией	
		Время жизни, с	% увеличения продолжительности жизни
I	50	2052,3 ± 73,6 <sup>**1***2**3</sup>	38,7
II	50	2633,3 ± 125,4 <sup>***1*2***3**4</sup>	77,9
III	50	2006,5 ± 65,7 <sup>**1***2**3</sup>	35,6
IV	50	1568,8 ± 113,8 <sup>***2**4</sup>	6,0
V	-	3100,3 ± 120,5 <sup>***1***3**4</sup>	109,5
Контроль		1480,0 ± 111,7	-

\*  $p < 0,05$ , \*\*  $p < 0,01$ , \*\*\*  $p < 0,001$ ; <sup>1</sup> — по отношению к контролю; <sup>2</sup> — по отношению к V; <sup>3</sup> — по отношению к IV, <sup>4</sup> — по отношению к III.

О реакции иммунной системы на воздействие исследуемых веществ судили по количеству Т-, В-лимфоцитов, показателям фагоцитоза, а также по изменению уровня циркулирующих иммунных комплексов [5, 7]. Определение числа Т- и В-лимфоцитов в крови проводили методом спонтанного розеткообразования лимфоцитов с эритроцитами морской свинки и эритроцитами мыши соответственно [7]. Фагоцитарную активность нейтрофилов исследовали *in vitro* путем инкубации нативной крови с корпускулярным антигеном, в качестве которого были использованы формализированные эритроциты барана, с последующим цитологическим исследованием мазков крови [7]. Изучали следующие показатели фагоцитоза: подсчитывали фагоцитарную активность (процент фагоцитоза), фагоцитарный индекс — количество поглощенных эритроцитов на 1 фагоцитирующий нейтрофил и фагоцитарное число — количество поглощенных эритроцитов на 100 нейтрофилов. Уровень циркулирующих иммунных комплексов определяли методом преципитации 3,5 % раствором полиэтиленгликоля [5, 7]. Пробы замеряли нефелометрически и выражали в условных единицах. Соединения I–IV вводили в дозе 50 мг/кг в виде взвеси в 2 % крахмальном растворе за 1 ч до проведения экспериментов.

Работа выполнена в соответствии с существующими международными этическими и научными стандартами качества планирования и проведения исследований на животных. Результаты обработаны статистически при помощи программ Windows XP (Excel) с использованием *t*-критерия Стьюдента. Результаты представлены в виде  $M \pm m$  ( $M$  — среднее значение,  $m$  — средняя арифметическая ошибка). Различия считали достоверными при уровне  $p < 0,05$ .

## Результаты и их обсуждение

Исследование острой токсичности показало, что синтезированный хелат II относится к 5 классу опасности согласно ГОСТа Р 53856 – 2010 [8], при этом он в 2,2 – 2,5 раза менее токсичен, чем IV и исходный ор-

ганический лиганд I и, соответственно, в 29 раз чем III (табл. 1).

Кроме того, хелат II проявлял достоверно значимую гипогликемическую активность, превосходя при этом по выраженности эффекта действие III и IV (табл. 1). Следует отметить, что исходный амид I не оказывал гипогликемического эффекта, что свидетельствует о существенном потенцировании этого действия при его химической модификации до хелата II.

Установлено также, что выявленная гипогликемическая активность хелата II, вероятно, способствовала устранению депрессивно-подобного поведения у крыс с СД, нормализуя показатели горизонтальной и вертикальной двигательной активности до уровня контрольной группы интактных животных. При этом влияния на индивидуальное поведение здоровых крыс при введении хелата II не выявлено. Кроме того, у здоровых крыс II оказывало облегчающее действие на выработку и сохранение УРПИ, что выражалось в увеличении латентного периода захода в темный отсек и сохранение условной реакции у 100 % животных при тестировании через 24 ч (табл. 2). Исходный амид I также частично нормализовал поведенческие реакции у крыс с СД, однако показатели не достигали уровня здоровой

## Влияние соединений I, II, III, IV на фагоцитоз и уровень циркулирующих иммунных комплексов

Соединение	Доза, мг/кг	Процент фагоцитоза		Фагоцитарный индекс		Фагоцитарное число		Уровень ЦИК
		фон	2 ч	фон	2 ч	фон	2 ч	
I	50,0	26,5 ± 1,2	33,5 ± 1,0 <sup>***1***2*4</sup>	0,39 ± 0,11	0,42 ± 0,02	1,27 ± 0,06	1,32 ± 0,09 <sup>*2****4</sup>	60,8 ± 2,9 <sup>***2***3</sup>
II	50,0	25,5 ± 1,1	39,5 ± 1,1 <sup>***1***2</sup>	0,38 ± 0,02	1,14 ± 0,04 <sup>***1***2</sup>	1,49 ± 0,06	2,92 ± 0,10 <sup>***1***2***3</sup>	58,0 ± 2,3 <sup>***2***3</sup>
III	50,0	28,3 ± 0,9	39,5 ± 0,6 <sup>***1***2*4</sup>	0,45 ± 0,02	0,69 ± 0,02 <sup>***1***2</sup>	1,57 ± 0,08	1,77 ± 0,03 <sup>***4</sup>	59,7 ± 2,3 <sup>***2***3</sup>
IV	50,0	26,3 ± 1,1	44,5 ± 1,6 <sup>***1***2</sup>	0,39 ± 0,12	1,23 ± 0,02 <sup>***1***2</sup>	1,49 ± 0,04	2,77 ± 0,10 <sup>***1***2</sup>	61,5 ± 2,9 <sup>***2***3</sup>
Контроль (интактный)	-	39,5 ± 1,3	40,0 ± 1,6 <sup>***2</sup>	0,60 ± 0,06	0,57 ± 0,03 <sup>***2</sup>	1,52 ± 0,10	1,51 ± 0,10	28,7 ± 1,8
Контроль (СД)		25,8 ± 1,4	26,8 ± 0,9 <sup>***3</sup>	0,46 ± 0,02	0,44 ± 0,02 <sup>***3</sup>	1,62 ± 0,10	1,64 ± 0,10	104,0 ± 4,8

\*  $p < 0,05$ , \*\*  $p < 0,01$ , \*\*\*  $p < 0,001$ ; <sup>1</sup> — по отношению к фону, <sup>2</sup> — по отношению к контролю (СД), <sup>3</sup> — по отношению к контролю (интактные животные), <sup>4</sup> — по отношению к IV.

группы животных. Следует отметить, что III и IV не улучшали поведенческие реакции у животных с аллоксановым СД, не способствовали улучшению когнитивных функций у здоровых крыс, в частности, IV вызывал у них расстройство мотивированного поведения (табл. 2). Вследствие нарушений воспроизводимости “норкового рефлекса” у животных с СД и существенного уменьшения показателя формирования памятного следа нам не удалось изучить влияние исследуемых веществ на состояние памяти крыс с СД.

Выявлено, что соединения I, II и III оказывали достоверное антигипоксическое действие, при этом их активность не достигла уровня V, но значительно превосходила по выраженности эффекта IV (табл. 3).

Изучение иммунофармакологической активности показало, что на фоне аллоксанового СД при введении всех исследуемых соединений наблюдается тенденция к нормализации показателей как клеточного, так и гуморального звеньев иммунной системы, что характеризуется увеличением числа Т-лимфоцитов и уменьшением В-лимфоцитов (рисунок).

Установлено, что введение исследуемых соединений способствовало восстановлению показателей фагоцитоза до нормальных значений и уменьшению количества циркулирующих иммунных комплексов. Кроме того, при воздействии соединения II наблюдалось увеличение фагоцитарного индекса и фагоцитар-

ного числа, по сравнению с уровнем интактного контроля, что свидетельствует об улучшении поглотительной способности нейтрофилов (табл. 4).

Таким образом, хелат проявляет гипогликемическую активность, антигипоксическое и иммуномоделирующие действие, превосходя при этом эффекты исходного лиганда I, неорганического соединения ванадия III и IV.

Работа выполнена при финансовой поддержке РФФИ (проект № 14-03-96016 р\_урал\_a).

## ЛИТЕРАТУРА

1. H. Sakurai, *Chem. Rec.*, **2**, 237 – 248 (2002).
2. K. H. Thompson, J. Lichter, C. LeBel, *J. Inorg. Biochem.*, **103**, 554 – 558 (2009).
3. Н. А. Пулина, Т. А. Юшкова, А. И. Краснова, В. В. Юшков, *Вестник РУДН. Сер. Медицина*, **4**, 423 – 425 (2010).
4. В. Б. Прозоровский, *Психофармакология и биологическая наркология*, 3 – 4, 2090 – 2120 (2007).
5. А. Н. Миронов (ред.), *Руководство по проведению доклинических исследований лекарственных средств.*, Гриф и К, Москва (2012).
6. М. Д. Машковский, *Лекарственные средства*, Новая волна, Москва (2007).
7. В. А. Черешнев, *Экспериментальные модели в патологии*, ПГУ, Пермь (2011).
8. А. А. Юрасова, А. С. Макарова, Д. О. Скобелев, *Токсикол. вест.*, **1**, 2 – 10 (2011).

Поступила 28.06.13

## BIOLOGICAL ACTIVITY OF BIS[3-(4-(CHLORPHENYL)-1-(4-METHYLPHENYL)CARBOXAMIDO-1,3-PROPANDIONATO]OXOVANADIUM

N. A. Pulina, T. A. Yushkova, and A. I. Krasnova

Perm State Pharmaceutical Academy, Perm, 614990 Russia

The acute toxicity, hypoglycemic, anti-hypoxic, immunopharmacological activity, and effects on memory and behavioral processes have been studied for bis[3-(4-(chlorophenyl)-1-(4-methylphenyl)carboxamido-1,3-propandionato]oxovanadium in comparison to the starting ligand, vanadyl sulfate, and metformin. Low toxicity, and hypoglycemic and immunomodulatory activity, exceeding those of reference drugs and the initial compounds of synthesis, were revealed.

**Keywords:** bis[3-(4-(chlorophenyl)-1-(4-methylphenyl)carboxamido-1,3-propandionato]oxovanadium; hypoglycemic activity; immunopharmacological activity.