

С.В. Хом'як, Н.Л. Заярнюк, О.С. Яремкевич, В.Г. Червецова, З.В. Губрій
Національний університет "Львівська політехніка",
кафедра технології біологічно активних сполук, фармації та біотехнології

БІОЛОГІЧНА АКТИВНІСТЬ ВОДНИХ РОЗЧИНІВ 1,3-ДИФЕНІЛ-5-(4-ГІДРОКСИ-3,5-ДИ-ТРЕТ.-БУТИЛФЕНІЛ)-ПІРАЗОЛІНУ-2

© Хом'як С.В., Заярнюк Н.Л., Яремкевич О.С., Червецова В.Г., Губрій З.В., 2008

Запропоновано метод одержання піразоліну з просторово екранованим фенольним замісником. Одержано водні препарати на його основі з використанням допоміжного розчинника та комплексоутворювальних полімерів неспецифічної дії. Досліджено їхню біологічну активність та токсичність.

The method of receipt of pyrazolin with hindered phenol as deputy have been proposed. Water-soluble preparations on it's basis with co-solvent and polymeric surfactant with unspecific due using have been obtained. The biological and toxical activitie have been studied.

Постановка проблеми і її зв'язок з важливими науковими завданнями. Фармацевтична промисловість має у своєму розпорядженні великий арсенал синтезованих біологічно активних речовин (БАР). Актуальною проблемою сучасної фармації є розроблення та впровадження нових лікарських форм вже відомих БАР, а також виявлення у них інших аспектів біологічної дії.

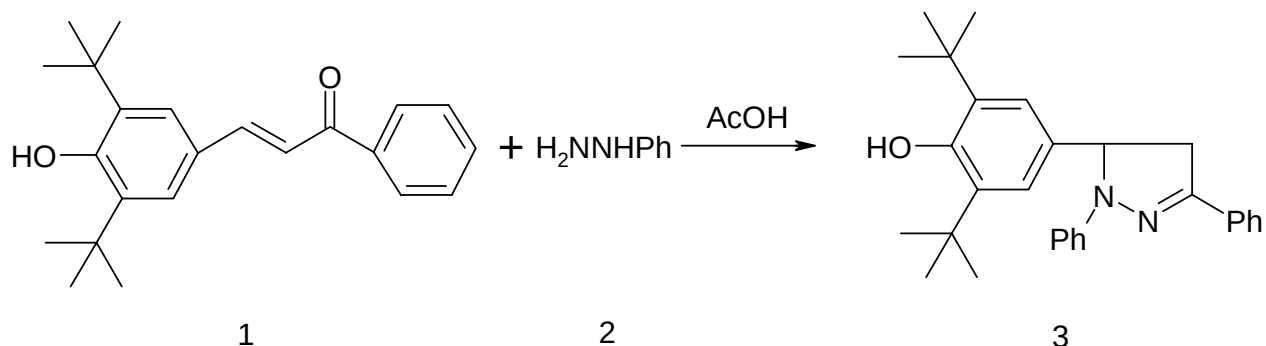
Перевага у застосуванні надається водорозчинним лікарським формам, які є спорідненішими до фізіологічних рідин організму. На жаль, велика кількість біологічно активних речовин є нерозчинними у воді і вимагає додаткового введення допоміжних речовин, які б сприяли кращій розчинності. Важливим є опрацювання нових методик одержання та дослідження водних препаратів БАР.

Аналіз попередніх досліджень і публікацій. Піразоліни є компонентами багатьох біологічно активних структур, що застосовуються як анальгетики, антипіретики, протизапальні засоби тощо [1]. Поєднання в одній молекулі піразольного гетероциклу та фрагмента просторово екранованого фенолу може надати молекулі інших властивостей. Просторово екрановані феноли є найпоширенішим та найпопулярнішим класом синтетичних антиоксидантів, які використовуються для розв'язання прикладних задач у фундаментальних дослідженнях. Фенольні антиоксиданти першого покоління (іонол, фенозани, прості заміщені похідні 2,6-ди-(трет.-бутил)фенолу) широко використовувалися як інгібітори термоокиснювальної деструкції полімерів, жирів, мастил, а також як коректори антиоксидантних патологій у живих біологічних системах [2]). Однак сучасний підхід до створення біооксидантів потребує більшої спеціалізації, поєднання в них антиоксидантних властивостей із здатністю до адресної доставки і структурних взаємодій із захисною ділянкою біосистеми [3]. Первинне віртуальне прогнозування біологічної активності за програмою PASS показало наявність протизапальної активності у похідних піразоліну з просторово екранованим фенолом, що потребує експериментального підтвердження. Основним недоліком, що обмежує вивчення і застосування цієї речовини, є мала розчинність у воді.

Мета. Метою нашої роботи було створення водних препаратів на основі піразоліну з просторово екранованим фенольним замісником, вивчення їхньої біологічної активності та гострої токсичності для подальшого застосування у фармації.

Виконання експерименту. Для дослідження був вибраний 1,3-дифеніл-5-(4-гідрокси-3,5-ди-трет.-бутил)-піразолін-2 (3), синтезований на кафедрі технології біологічно активних сполук, фармації та біотехнології Національного університету "Львівська політехніка" останнім часом.

Найзагальнішим методом синтезу піразолінів є реакція гідразинів з α,β -ненасиченими карбонільними сполуками [4]. Для синтезу піразоліну нами був використаний 4-гідрокси-3,5-ди-трет-бутилхалкон (1) як карбонільна сполука та фенілгідразин (2). Під час реакції був застосований кислотні умови реакції, на відміну від описаних раніше лужно-спиртових [5]. Внаслідок цього вихід збільшився до 92 %.



Реакцію здійснювали в оцтовій кислоті при нагріванні. Одержаний 1,3-дифеніл-5-(4-гідрокси-3,5-ди-трет.-бутил)-піразолін-2 (3) є кристалічною сполукою білого кольору, нерозчинною у воді, погано розчинною в органічних розчинниках. Він утворює безбарвні розчини з невисокою концентрацією, які відзначаються голубою флуоресценцією при $\lambda_{\text{max}} = 440\text{nm}$.

Перед нами постала задача створити водорозчинний препарат сполуки 3. З цієї метою був використаний допоміжний розчинник. Серед дозволених Державною фармакопеею України (ДФУ) неводних розчинників ми вибрали диметилсульфоксид (ДМСО). ДМСО має здатність проникати через біологічні мембрани, реалізуючи свою специфічну дію (протизапальну, антипіретичну, анальгетичну, антисептичну, фібринолітичну). Препарат має помірну загальностимулюючу дію, а також посилює проникнення через шкіру та слизові оболонки лікарських засобів, проявляючи транспортну здатність. Застосовують ДМСО у вигляді апікацій та зрошень, використовуючи як нерозведений диметилсульфоксид, так і його розчини (10–30–50–70 %). Відоме застосування ДМСО у складі ін'єкційних розчинів з концентрацією до 30 % [6].

Виконані нами попередні експерименти з визначення власної активності ДМСО показали, що мінімальна бактеріостатична і мінімальна бактерицидна концентрація становлять 5 % і 2,5 % відповідно. Тому в подальших дослідженнях використовувались концентрації, не вищі від цих.

Вивчали біологічну активність 1,3-дифеніл-5-(4-гідрокси-3,5-ди-трет-бутил)-піразоліну-2 методом "лунок" [7]. Як тестові культури використовували такі мікроорганізми: бактерії *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, дріжджі *Candida tenuis*, цвільовий гриб *Aspergillus niger*. Для одержання препаратів наважку піразоліну розчиняли в ДМСО з утворенням флуоресцентних розчинів. Одержані розчини змішували з водою у різних співвідношеннях, при цьому спостерігалось збереження флуоресценції протягом декількох днів. Результати мікробіологічного аналізу свідчили про відсутність як антибактеріальної, так і протигрибкової активності. Цілком можливо, що внаслідок складної конфігурації молекули дифузія в агар піразоліну ускладнюється, а механізм дії ДМСО як транспортного агента в агарі відрізняється від такого в клітинних мембранах.

Плазматичні мембрани є першою ланкою у сприйнятті зовнішніх сигналів, передавання та формування адекватної відповіді, особливо на ембріональних клітинах. Адекватною тест-системою для дослідження впливу різних фармакологічних та хімічних чинників на живі організми є зародки в'юна у період раннього ембріогенезу [8, 9]. Нами були виконані дослідження на токсичність вищевказаних речовин на зародках прісноводної кісткової риби в'юна (*Misgurnus fossilis* L.). Порівняно коротка тривалість періоду ембріогенезу цього виду, легкість одержання статевих продуктів і відсутність особливих труднощів в утриманні цих риб в лабораторних умовах пояснюють його популярність [10].

Розвиток зародків у фізіологічному розчині з ДМСО в концентрації $5 \cdot 10^{-6}$ мг/мл на початкових етапах розвитку (ембріональній стадії) візуально не відрізнявся від контрольного, а вже після утворення личинки простежувались морфологічні аномалії, а саме деформація кінцівки хвостової частини тіла, що проявилась на десятий день розвитку личинки (рис. 1).

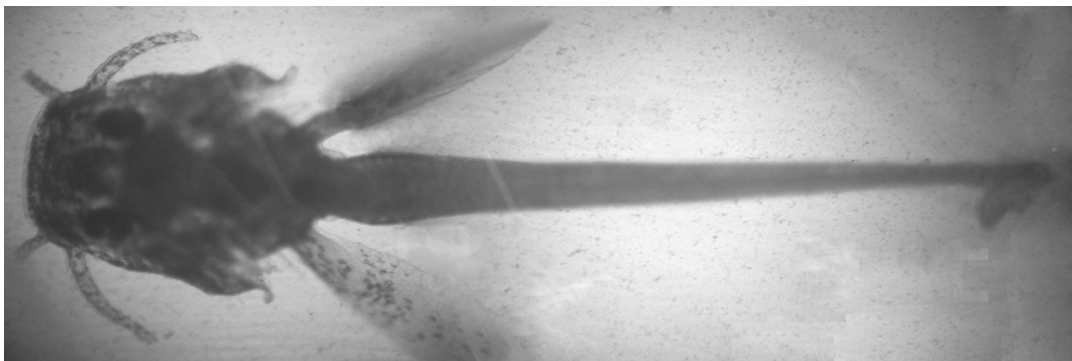


Рис. 1. Личинка в'юна віком два тижні, яка розвивалась у розчині ДМСО

Для зменшення токсичності, покращання водорозчинності та надання стійкості водним розчинам ми використали комплексоутворювальні полімери з неспецифічною активністю, відомі і дозволені ДФУ: полівініловий спирт (ПВС) та полівінілпіролідон (НВП). У фармацевтичній практиці для одержання водних лікарських форм використовують НВП з молекулярною масою, починаючи від 2000 та ПВС з молекулярною масою від 10000. Залежно від молекулярної маси вони використовуються як плазмозамінники, препарати дезінтоксикаційної дії, пролонгатори дії БАР. Розчини 2,5–10 % пролонгують дію БАР завдяки утворенню легкорухливих комплексів за рахунок нековалентних зв'язків. Водні розчини БАР у комбінації із ПВС або НВП забезпечують вищу концентрацію активної сполуки та триваліше знаходження її у тканинах [11].

Робочі розчини були приготовані так:

Чашка № 1 – 5 мл ДМСО+95 мл H_2O .

Чашка № 2 – 2,5 мл 2 % р-ну НВП в ДМСО + 2,5 мл ДМСО + 95 мл H_2O .

Чашка № 3 – 2,5 мл 2 % р-ну ПВС в ДМСО + 2,5 мл ДМСО + 95 мл H_2O .

Чашка № 4 – 2,5 мл 2 % р-ну піразоліну (3) в ДМСО + 2,5 мл ДМСО + 95 мл H_2O .

Чашка № 5 – 2,5 мл 2 % р-ну НВП в ДМСО + 2,5 мл 2 % р-ну піразоліну (3) в ДМСО+ 95 мл H_2O .

Чашка № 6 – 2,5 мл 2 % р-ну ПВС в ДМСО + 2,5 мл 2 % р-ну піразоліну (3) в ДМСО+ 95 мл H_2O .

Для ембріотоксичних досліджень робочі розчини розводились фізіологічним розчином Гольтфретера до концентрації діючої речовини близько 10^{-6} мг/мл.

В експерименті використовували яйцеклітини і зародки в'юна *Misgurnus fossilis* L., які отримували і запліднювали за методикою Нейфаха [12]. Для отримання ікри самкам внутрішньом'язово вводили хоріогонічний гонадотропін за 24–48 годин до експерименту. Залежно від пори року і розмірів самки доза гормону становила від 500 з жовтня до 250 міжнародних одиниць з лютого по червень [13]. Овуляція наставала через 36–40 годин при температурі $+19 \div +20^\circ C$. Самця декапітували, сім'яники подрібнювали та заливали відстояною водопровідною водою. Запліднення ікри здійснювали в чашках Петрі, додаючи суспензію спермій протягом 5–10 хв. Потім запліднену ікру відмивали від спермій і інкубували при температурі $21\text{--}22^\circ C$ у розчині Гольтфретера. Стадії розвитку контролювали візуально під бінокулярним мікроскопом МБС-9. Запліднену і відмиту ікру інкубували у дослідні чашки по 100 ікринок, а для контролю – тільки в розчині Гольтфретера для холоднокровних. Стадії розвитку визначали за таблицями нормального розвитку [14].

Після запліднення простежувалося нормальний розвиток зародків на ранніх та на пізніх стадіях у всіх досліджуваних препаратах порівняно з контролем. Більша кількість вилуплених личинок спостерігалась (порівняно з контролем) у чашках № 2 та № 5, що свідчить про пришвидшений ріст личинки у цих розчинах, а у чашка № 1, 3, 4, 6 – не перевищувала контроль. Розвиток цих личинки ми спостерігали до 12 доби. Однак у чашці № 1 (рис.1) збереглися аномалії

в розвитку. Розвиток личинок у інших чашках відбувався без істотних змін з нормальною формою тіла та добре вираженою пігментацією. Вони були рухливими, з доброю координацією тіла, зябра личинок були добре розвинуті, грудні та хвостовий плавник також були округлої форми і добре розвинуті і не відрізнялися від контрольних (рис. 2).

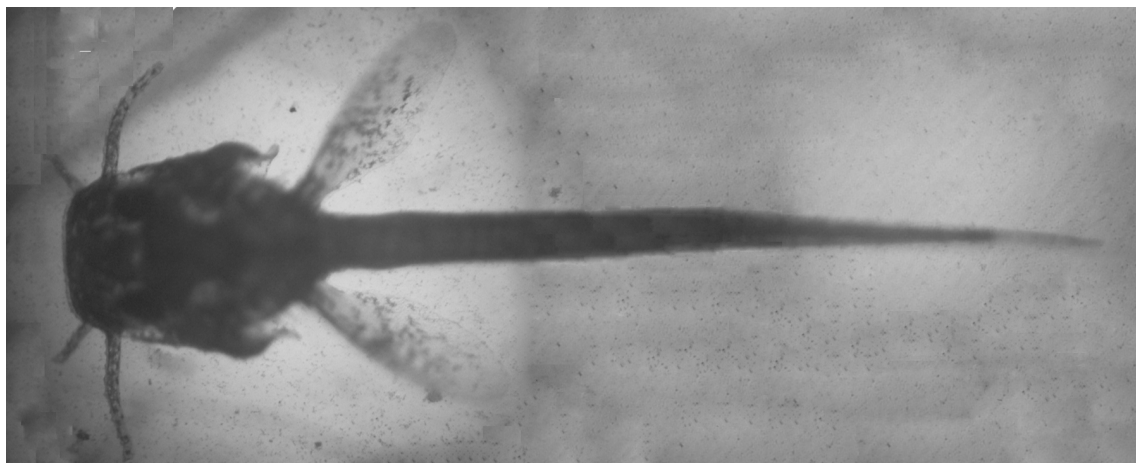


Рис. 2. Личинка в'юна віком два тижні, яка розвивалась у досліджуваних розчинах

Розчини, до складу яких входив НВП, проявляли рістстимулюючий ефект, що було підтверджено морфологічними дослідженнями.

Висновки. Одержано 1,3-дифеніл-5-(4-гідрокси-3,5-ди-*трет.*-бутил)-піразолін-2 із підвищеним виходом. Використовуючи ДМСО як допоміжний розчинник, полівініловий спирт та полівінілпіролідон як комплексоутворювальні поверхнево-активні олігомери створено стійкі водні препарати на основі піразоліну із збереженням флуоресценції. Досліджено їхню бактерицидну та фунгіцидну активність, гостру ембріональну токсичність. Виявлено патологічну дію ДМСО на личинки в'юна, а при сумісному застосуванні ДМСО та олігомерів ця дія не проявлялась. Було відзначено рістстимулюючий ефект досліджуваних розчинів піразоліну на личинки в'юна.

1. Швайка О.П. *Основи синтезу лікарських речовин та їх проміжних продуктів.* – Донецьк. Норд, 2004. – 551 с.
2. Ершов В.В., Никифоров Г.А., Володькин А.А. *Пространственно затрудненные фенолы.* – М.: Химия, 1976. – 363 с.
3. Десенко С.М., Орлов В.Д. *Азогетероцикли на основе ароматических ненасыщенных кетонів.* – Харків: Фоліо, 1998. – 145 с.
4. Арефьев Д.В., Белостоцкая И.С., Комиссаров Н.Л. *Гибридные макромолекулярные антиоксиданты на основе гидрофильных полимеров и пространственно-затрудненных фенолов* // *Известия АН РФ сер.хим.* – 2007. – № 4. – С.751–760.
5. Хом'як С.В., Губрій З.В., Троценко С.І., Клеп В.З., Новіков В.П. *Резонансно стабілізовані феноксил* // *Вісник НУ "Львівська політехніка". Хімія, технологія речовин та їх застосування.* – 2000. – № 414. – С.141–143.
6. Наказ Міністерства охорони здоров'я України № 339 від 19 червня 2007.
7. Пояснювальна записка по проекту тимчасової фармакопейної статті на розчин димексиду 30 % для ін'єкцій // *Державна Фармакопея України.* – 2001.
8. *Практикум по микробиологии* / Под ред. И.С.Егорова. – М.: Изд. Моск. ун-та, 1986.
9. Гойда О.А. *Биофизические аспекты раннего онтогенеза животных.* – К.: Наук. думка, 1993. – 224 с.
10. Белоусов Л.В., Дабяган Н.В., Чунаева М.З. *Пособие к большому практикуму по эмбриологии.* – М., Изд-во МГУ, 1990. – Ч.1 – 104 с.
11. *Объекты биологии развития* // Под.ред. Астаурова Б.А. – М.: Наука, 1975. – 579 с.
12. Грицкова И.А., Кедик С.А., Януль Н.А. // *Полимеры в технологии лекарственных препаратов.* – М., 2002.
13. Нейфах А.А. *Молекулярная биология процессов развития.* – М.: Наука, 1977. – 311 с.
14. Костомарова А.А. *Вьюн Misgurnus fossilis* // В кн.: *Объекты биологии развития.* – М.: Наука – 1975. – С. 308–323.
15. *Объекты биологии развития* // Под ред. Б.А. Астаурова. – М.: Наука, 1975. – 579 с.