

СИНТЕЗ И ОЦЕНКА АНАЛЬГЕЗИРУЮЩЕЙ АКТИВНОСТИ НОВОГО 5-БУТИЛ-1,2-ДИФЕНИЛ-6-ОКСО-1,6- ДИГИДРОПИРИМИДИН-4-ОЛЯТА НАТРИЯ

Е.В. Куваева

к.фарм.н., доцент, Санкт-Петербургский государственный химико-фармацевтический университет (Санкт-Петербург, Россия) E-mail: elena.kuvaeva@pharminnotech.com

Д.А. Колесник

аспирант, Санкт-Петербургский государственный химико-фармацевтический университет (Санкт-Петербург, Россия) E-mail: denis.kolesnik@spcru.ru

П.О. Левшукова

студентка, Санкт-Петербургский государственный химико-фармацевтический университет (Санкт-Петербург, Россия) E-mail: levshukova.polina@pharminnotech.com

Д.Ю. Ивкин

к.б.н., доцент, Санкт-Петербургский государственный химико-фармацевтический университет (Санкт-Петербург, Россия) E-mail: dmitry.ivkin@pharminnotech.com

И.П. Яковлев

д.х.н., профессор, Санкт-Петербургский государственный химико-фармацевтический университет (Санкт-Петербург, Россия) E-mail: igor.yakovlev@pharminnotech.com

Цель работы. Синтез 5-бутил-1,2-дифенил-6-оксо-1,6-дигидропиримидин-4-олята натрия (исследуемое соединение, целевое соединение) и оценка его острой токсичности, а также анальгезирующей активности *in silico* и *in vivo*.

Материал и методы. Целевое соединение получено взаимодействием 5-бутил-6-гидрокси-2,3-дифенилпиримидин-4(3H)-она и эквимолярным количеством водного раствора гидроксида натрия. Строение доказано с помощью ЯМР ^1H и ^{13}C спектроскопии. Прогнозирование острой токсичности исследуемого соединения осуществляли с помощью программного обеспечения GUSAR. Острую токсичность *in vivo* определяли на белых аутбредных мышах-самцах. Компьютерный скрининг биологической активности проводили с помощью программы PASS, расположенной на веб-сервисе и доступной через Интернет. Для экспериментальной оценки анальгезирующей активности были использованы две модели: «отдергивание хвоста от теплового излучения (tail-flick)» и «уксуснокислые корчи».

Результаты. Соединение 5-бутил-1,2-дифенил-6-оксо-1,6-дигидропиримидин-4-олят натрия синтезировано с количественным выходом. Прогнозируемые и экспериментальные данные острой токсичности позволяют отнести исследуемое соединение к классу «умеренно опасные». В процессе скрининга биологической активности получены данные о предположительном анальгезирующем действии. Исследование анальгезирующей активности *in vivo* показало, что целевое соединение обладает выраженным анальгезирующим действием.

Выводы. Синтезировано новое соединение 5-бутил-1,2-дифенил-6-оксо-1,6-дигидропиримидин-4-олят натрия. Его строение доказано с помощью современных физико-химических методов анализа. Результаты компьютерного моделирования позволили определить класс токсичности и потенциальную биологическую активность. С помощью экспериментальных фармакологических исследований доказано, что исследуемое соединение обладает низким уровнем токсичности и проявляет выраженную анальгезирующую активность.

Ключевые слова: водорастворимые гидроксипиримидины, острая токсичность, компьютерный скрининг, анальгезирующая активность, уксуснокислые корчи, tail-flick.

Для цитирования: Куваева Е.В., Колесник Д.А., Левшукова П.О., Ивкин Д.Ю., Яковлев И.П. Синтез и оценка анальгезирующей активности нового 5-бутил-1,2-дифенил-6-оксо-1,6-дигидропиримидин-4-олята натрия. Вопросы биологической, медицинской и фармацевтической химии. 2021;24(6):42–46. <https://doi.org/10.29296/25877313-2021-06-06>

Соединения, в основу строения которых положен 1,3-диазиновый цикл (пиримидин), обладают различными видами биологической активности. Многие из них хорошо зарекомендовали себя на фармацевтическом рынке в качестве эффектив-

ных и безопасных лекарственных средств: имати-
ниб (противоопухолевое средство), дипиридамол
(сосудорасширяющее, антиагрегационное сред-
ство), метилурацил (обладает выраженным анабо-
лическим эффектом). Получение новых соедине-

ний, имеющих в основе пиримидиновое ядро, а также исследование их биологической активности является приоритетным и актуальным направлением в фармацевтической индустрии [1]. В свою очередь, низкая растворимость многих производных пиримидина в воде является существенным недостатком с позиции создания новых лекарственных средств. Решением этой проблемы может стать изменение баланса липофильно-гидрофильных характеристик соединений. Этого можно достичь как путём введения в их молекулы заместителей, влияющих на транспорт и меняющих биодоступность в организме, так и получением солей, обладающих высокой растворимостью.

Ц е л ь и с л е д о в а н и я – получение хорошо растворимого в воде 5-бутил-1,2-дифенил-6-оксо-1,6-дигидропиримидин-4-олята натрия и оценка его острой токсичности, а также анальгезирующей активности *in silico* и *in vivo*.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ

Синтез целевого соединения проводили путём обработки 5-бутил-6-гидрокси-2,3-дифенилпиримидин-4(3H)-она [2] эквимолярным количеством водного раствора гидроксида натрия при перемешивании в течении 30 мин (рис. 1). Твёрдый целевой продукт получали упариванием реакционной массы при 40–45 °С и давлении 80–96 мбар. Выход составил 84–86 %. Строение полученного соединения доказано с помощью ЯМР ^1H , ^{13}C -спектроскопии.

Прогнозирование острой токсичности исследуемого соединения проводили с помощью программного обеспечения GUSAR [3]. Острую токсичность *in vivo* определяли на белых аутбредных мышцах-самцах массой тела 18–22 г, из которых были сформированы три группы по 10 животных.

Мышам вводили однократно внутривентриально 0,5 мл раствора 5-бутил-1,2-дифенил-6-оксо-1,6-дигидропиримидин-4-олята натрия в воде для инъекций в диапазоне доз от 1200 до 1500 мг/кг. Выживаемость животных определяли, наблюдая за ними через 24 и 48 ч от момента введения исследуемого соединения. За животными наблюдали в течение двух недель. При этом регистрировали развитие основных симптомов и время гибели животных [4]. Экспериментальную среднелетальную дозу (LD_{50}) рассчитывали с использованием инсталлированного программного обеспечения STATISTICA 7.0 [5].

Компьютерный скрининг биологической активности проводили с помощью программы PASS, которая расположена на веб-сервисе и доступна через Интернет [6].

Все эксперименты на животных были проведены в соответствии с решением совета Евразийской экономической комиссии от 3 ноября 2016 г. № 81 «Об утверждении правил надлежащей лабораторной практики Евразийского экономического союза в сфере обращения лекарственных средств» и Национальным стандартом Российской Федерации ГОСТ Р-53434-2009 «Принципы надлежащей лабораторной практики». Все опытные и контрольные животные были взяты из одного привоза и прошли карантин в течение 14 суток. Лабораторных животных содержали в стандартных условиях центра экспериментальной фармакологии. Все проводимые манипуляции с лабораторными животными были рассмотрены и одобрены на заседании биоэтической комиссии ФГБОУ ВО СПбХФУ Минздрава России.

Для экспериментальной оценки анальгезирующей активности применяли две модели: «отдергивание хвоста от теплового излучения (tail-flick)» и «уксуснокислые корчи».

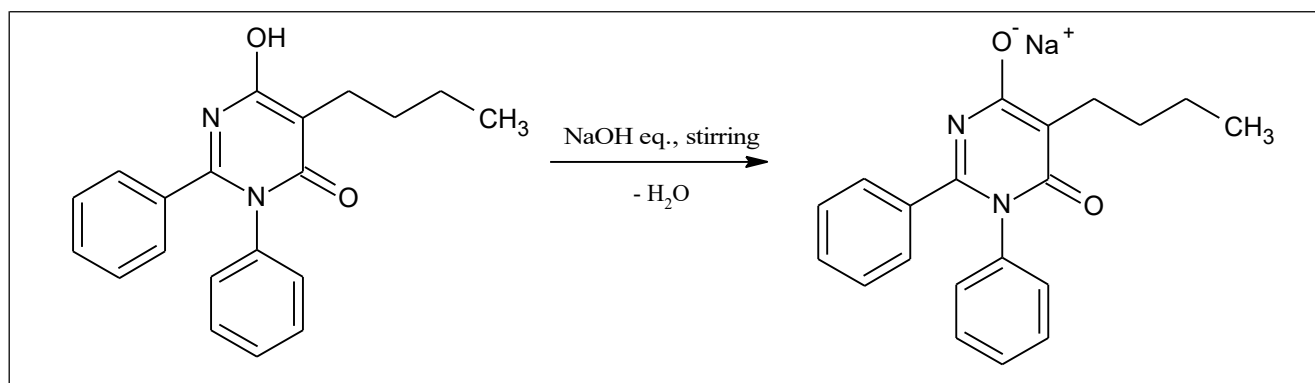


Рис. 1. Синтез 5-бутил-1,2-дифенил-6-оксо-1,6-дигидропиримидин-4-олята натрия

Для моделирования «отдергивания хвоста от теплового излучения (tail-flick)» [4] использовали белых аутбредных мышей-самцов массой 18–22 г, из которых были сформированы две группы по 15 особей в каждой. Болевое раздражение наносили каждой особи на хвост локально, воздействуя постепенно увеличивающимся тепловым излучением (лампа накаливания, 40 Вт). Регистрировали латентный период реакции отдергивания хвоста (время избавления от болевого раздражителя). Исследуемое соединение растворяли в воде для инъекций и вводили внутривенно в дозе 20 мг/кг. Препарат сравнения – метамизол натрия, вводили тем же путём в дозе 168,57 мг/кг. Животным первой группы вводили исследуемое соединение и засекали 40 мин. Животным второй группы вводили препарат сравнения и также засекали 40 мин. Затем повторно наносили болевое раздражение и регистрировали латентный период отдергивания хвоста. Анальгезирующую активность исследуемых соединений оценивали по достоверному увеличению латентного периода реакции после введения вещества.

Для моделирования «уксуснокислых корчей» [4] также использовали белых аутбредных мышей-самцов массой 18–22 г, из которых были сформированы три группы по 10 особей в каждой. Судороги у животных вызывали при помощи внутривенного введения 0,5%-ного раствора уксусной кислоты. Исследуемое соединение растворяли в воде для инъекций и вводили внутривенно в дозе 20 мг/кг. Препарат сравнения – метамизол натрия, вводили тем же путём в дозе 168,57 мг/кг. За 40 мин до начала эксперимента животные первой опытной группы получали исследуемое соединение, животные второй опытной группы – препарат сравнения. Особям контрольной группы внутривенно вводили только раствор 0,5%-ной уксусной кислоты. Регистрировали время начала судорог и их количество в течение 20 мин. Анальгезирующую активность исследуемого соединения оценивали по достоверному уменьшению числа корчей в получавшей препарат группе относительно контрольной группы. Показателем эффективности являлся коэффициент угнетения болевой реакции (УБР), который рассчитывали по формуле

$$\text{УБР, \%} =$$

$$= \left(1 - \frac{\text{среднее число корчей в группе}}{\text{среднее число корчей в контроле}} \right) \times 100\%.$$

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Соединение 5-бутил-1,2-дифенил-6-оксо-1,6-дигидропиримидин-4-олята натрия было получено взаимодействием 5-бутил-6-гидрокси-1,2-дифенил-1,6-дигидропиримидин-4(3H)-она и эквимолярным количеством водного раствора гидроксида натрия.

Строение полученного продукта доказано с использованием ЯМР ^1H и ^{13}C – спектроскопии.

Спектр ЯМР (^1H , DMSO- d_6 , δ м.д.) полученного соединения характеризуется наличием резонансных сигналов протонов бензольных колец (7,03–7,24 м.д.), сигнала протонов группы CH_3 (0,89 (t, $J = 7,2$ Hz, 3H)) и сигналов групп CH_2 в области 1,24–2,3 м.д.

В спектре ЯМР C^{13} полученного соединения наблюдаются сигналы атомов углерода бензольных колец в области 127,19–140,09 м.д., сигнал метильной группы – 14,73 м.д. и сигналы метиленовых групп в области 23,19–31,17 м.д. В слабом поле при 163,10 м.д. и 170,93 м.д. наблюдаются сигналы атомов углерода $-\text{C}=\text{O}$ и $-\text{C}-\text{O}^- \text{Na}^+$ соответственно, а также сигналы атомов углерода C_2 – 154,99 м.д. и C_5 – 96,51 м.д. (рис. 2).

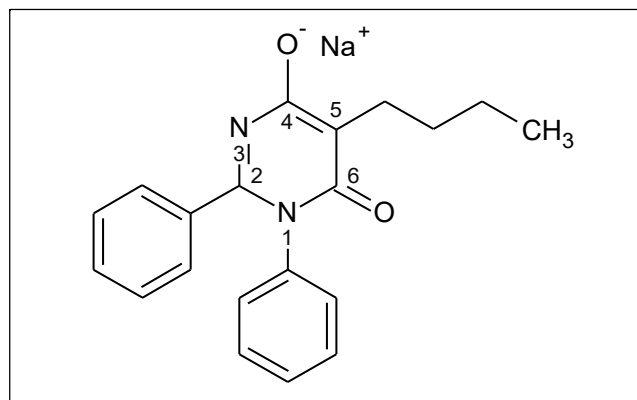


Рис. 2. Формула 5-бутил-1,2-дифенил-6-оксо-1,6-дигидропиримидин-4-олята натрия с нумерацией главного цикла

Прогнозируемая LD_{50} у мышей при внутривенном введении составила 1204,8 мг/кг, экспериментальная LD_{50} – 1350 мг/кг. Таким образом, исследуемое соединение можно отнести к четвертому классу опасности – умеренно опасные.

В ходе скрининга биологической активности *in silico* с помощью программы PASS получены данные о предположительной анальгезирующей активности с вероятностью $P_a \approx 0,5$. Поэтому для нового 5-бутил-1,2-дифенил-6-оксо-1,6-дигидропиримидин-4-олята натрия изучение данного вида активности является перспективным.

Исследование анальгезирующей активности *in vivo* показало, что 5-бутил-1,2-дифенил-6-оксо-1,6-дигидропиримидин-4-олят натрия обладает выраженной анальгезирующей активностью, действуя как при боли, вызванной химическими раздражителями-альгогенами (модель перитонисце-

ральной боли – тест «уксуснокислые корчи») (табл. 1), так и при термической боли (модель «отдергивание хвоста от теплового излучения (tail-flick)» (табл. 2). Активность исследуемого соединения находится на одном уровне с препаратом сравнения.

Таблица 1. Влияние исследуемого соединения на болевую чувствительность мышей-самцов на модели оценки термической соматической боли – tail-flick, n=15

Группа		Доза, мг/кг	Время от момента включения лампы, с
Первая	Латентный период реакции (до введения метамизола натрия)	–	25,0±1,24
	Латентный период реакции (после введения метамизола натрия)	168,57	37,6±0,90*
Вторая	Латентный период реакции (до введения исследуемого соединения)	–	24,067±1,19
	Латентный период реакции (после введения исследуемого соединения)	20	35,93±1,12*

Примечание: * – различия с соответствующей группой «латентный период реакции (до введения)» статистически значимы $p \leq 0,01$.

Таблица 2. Влияние исследуемого соединения на болевую чувствительность мышей-самцов на модели химического болевого раздражения брюшины (тест «уксуснокислые корчи»), n=10

Группа	Доза	Число корчей за 20 мин, абс.	Латентное время развития, с	УБР, %
Контроль	–	74,30±3,85	344,50±18,35	–
Метамизол натрия	168,57 мг/кг	3,40±0,77*	911,80±3,99*	95,43
Исследуемое соединение	20 мг/кг	8,20±0,96*#	437,6±5,64*#	88,96

Примечание: * – различия с группой «контроль» статистически значимы $p \leq 0,01$; # – различия с группой «метамизол натрия» статистически значимы $p \leq 0,01$.

ВЫВОДЫ

Синтезировано новое соединение – 5-бутил-1,2-дифенил-6-оксо-1,6-дигидропиримидин-4-олят натрия. Его строение доказано с помощью современных физико-химических методов анализа. Результаты компьютерного моделирования позволили определить класс токсичности и потенциальную биологическую активность. С помощью экспериментальных фармакологических исследований доказано, что исследуемое соединение обладает низким уровнем токсичности и проявляет выраженную анальгезирующую активность.

ЛИТЕРАТУРА

1. Государственный реестр лекарственных средств [справочная система]. URL: grls.rosminzdrav.ru (дата обращения 24.01.2021).

- Патент 2738605 С1 РФ. 5-Замещённые-6-гидрокси-2,3-дифенилпиримидин-4-(3Н)-оны и способ их получения. Д.А. Колесник, Е.В. Куваева, Т.Л. Семакова, О.Ю. Стрелова, И.П. Яковлев. 2020.
- GUSAR V. 2011.1: система моделирования острой токсичности [для моделирования]. А. Захаров, В. Поройков. Москва: 2011. (Электронная дистрибуция).
- Миронов А.Н. Руководство по проведению доклинических исследований лекарственных средств. Часть первая. М.: Гриф и К, 2012. 944 с.
- STATISTICA 7.0: система статистического анализа [для статистического анализа]. «Statsoft» – Америка: 1984. (Электронная дистрибуция).
- PASS Online. Way2Drug: [веб-ресурс]. Москва.URL: www.way2drug.com/PASSOnline (дата обращения 24.01.2021).

Поступила 15 марта 2021 г.

SYNTHESIS AND ASSESSMENT OF ANALGESIC ACTIVITY OF A NEW 5-BUTYL-1,2-DIPHENYL-6-OXO-1,6-DIHYDROPYRIMIDIN-4-OLATE SODIUM

© Authors, 2021

E.V. Kuvaeva

Ph.D.(Pharm.), Associate Professor, Department of Organic Chemistry, Saint-Petersburg State Chemical and Pharmaceutical University (Saint-Petersburg, Russia)
E-mail: elena.kuvaeva@pharminnotech.com

D.A. Kolesnik

Post-graduate Student, Saint-Petersburg State Chemical and Pharmaceutical University (Saint-Petersburg, Russia)
E-mail: denis.kolesnik@spcpu.ru

P.O. Levshukova

Student, Saint-Petersburg State Chemical and Pharmaceutical University (Saint-Petersburg, Russia)
E-mail: levshukova.polina@pharminnotech.com

D.Y. Ivkin

Ph.D.(Biol.), Associate Professor, Department of Pharmacology and Clinical Pharmacology, Saint-Petersburg State Chemical and Pharmaceutical University (Saint-Petersburg, Russia)
E-mail: dmitry.ivkin@pharminnotech.com

I.P. Yakovlev

Dr.Sc. (Chem.), Professor, Head of the Department of Organic Chemistry, Saint-Petersburg State Chemical and Pharmaceutical University (Saint-Petersburg, Russia)
E-mail: igor.yakovlev@pharminnotech.com

Aim. 5-butyl-1,2-diphenyl-6-oxo-1,6-dihydropyrimidine-4-sodium olate synthesis (test compound, target compound) and its acute toxicity, analgesic activity in silico and in vivo evaluation.

Material and methods. The target compound was obtained by the interaction of 5-butyl-6-hydroxy-2,3-diphenylpyrimidin-4 (3H) - OH radicals and an sodium hydroxide aqueous solution equimolar amount. The structure was proved by NMR ¹H and ¹³C spectroscopy. The test compound acute toxicity prediction was carried out using the GUSAR software. Acute toxicity in vivo was determined in white outbred male mice. Biological activity computer screening was performed using the PASS program located on a web service freely accessible via the Internet. For the analgesic activity experimental assessment, two models were used: tail-flicking of the tail from heat radiation and acetic acid cramps.

Results. Sodium 5-butyl-1,2-diphenyl-6-oxo-1,6-dihydropyrimidine-4-olate was synthesized in quantitative yield. The structure is proved using ¹H and ¹³C NMR spectroscopy. The acute toxicity predicted and experimental data allow to classify the compound under study as moderately hazardous. During the biological activity screening with the PASS program help, data on the alleged analgesic effect were obtained. The analgesic activity study in vivo showed that the target compound has a pronounced effect.

Conclusion. A new compound, 5-butyl-1,2-diphenyl-6-oxo-1,6-dihydropyrimidine-4-sodium olate, was synthesized. Its structure has been proven using modern physicochemical analysis methods. The computer modelling results made it possible to determine the toxicity class and potential biological activity. With the experimental pharmacological studies help, it was proved that the studied compound has a toxicity low level and shows pronounced analgesic activity.

Key words: water-soluble hydroxypyrimidines, acute toxicity, computer screening, analgesic activity, acetic acid cramps, tail-flick.

For citation: Kuvaeva E.V., Kolesnik D.A., Levshukova P.O., Ivkin D.Y., Yakovlev I.P. Synthesis and assessment of analgesic activity of a new 5-butyl-1,2-diphenyl-6-oxo-1,6-dihydropyrimidin-4-olate sodium. Problems of biological, medical and pharmaceutical chemistry. 2021;24(6):42–46. <https://doi.org/10.29296/25877313-2021-06-06>

REFERENCES

1. Gosudarstvennyj reestr lekarstvennyh sredstv [spravochnaja sistema]. URL: grls.rosminzdrav.ru (data obrashhenija 24.01.2021).
2. Patent 2738605 S1 RF. 5-Zameshjonnye-6-gidroksi-2,3-difenilpirimidin-4-(3N)-ony i sposob ih polucheniya. D.A. Kolesnik, E.V. Kuvaeva, T.L. Semakova, O.Ju. Strelova, I.P. Jakovlev. 2020.
3. GUSAR V. 2011.1: sistema modelirovaniya ostroj toksichnosti [dlja modelirovaniya]. A. Zaharov, V. Poroj-kov. Moskva: 2011. (Jelektronnaja distrib'jucija).
4. Mironov A.N. Rukovodstvo po provedeniju doklinicheskih issledovanij lekarstvennyh sredstv. Chast' pervaja. M.: Grif i K, 2012. 944 s.
5. STATISTICA 7.0: sistema statisticheskogo analiza [dlja statisticheskogo analiza]. «Statsoft» – Amerika: 1984. (Jelektronnaja distrib'jucija).
6. PASS Online. Way2Drug: [veb-pecypc]. Moskva. URL: www.way2drug.com/PASSOnline (data obrashhenija 24.01.2021).