

СИНТЕЗ, ФИЗИКО-ХИМИЧЕСКИЙ АНАЛИЗ И ФАРМАКОЛОГИЧЕСКАЯ АКТИВНОСТЬ НЕКОТОРЫХ ПРОИЗВОДНЫХ КУМАРИНА

¹Абышев А.З., ²Агаев Э.М., ¹Абышев Р.А., ¹Ивкин Д.Ю.

¹Санкт-Петербургский Химико-Фармацевтический Университет,
кафедра Фармацевтической химии, Санкт-Петербург, Россия;

²Азербайджанский Государственный Институт Усовершенствования Врачей им. А.Алиева,
кафедра фармации, Баку, Азербайджан

Изучена антигипоксическая активность известных производных кумарина, новых синтезированных фармацевтических субстанций (ФС) и антигипоксанта этилметилгидроксипиридина сукцината в условиях *in vivo* на различных моделях острой гипоксии. Наиболее выраженным антигипоксическим эффектом, определяемым по времени жизни мышей в секундах при острой гемической гипоксии, обладали вещества обтусифол ($971,9 \pm 158,1$ с), ФС №4 ($1020,0 \pm 309,2$ с) и №5 ($1031,2 \pm 188,9$ с); при острой гистотоксической гипоксии - обтусифол ($548,9 \pm 110,6$ с) и умбеллиферон ($601,2 \pm 113,7$ с); при острой нормобарической гипоксии с гиперкапнией – ФС №4 и умбеллиферон ($2290,0 \pm 781,2$ с).

Ключевые слова: кумарин, декурсинол, обтусифол, умбеллиферон, диуманкал, этилметилгидроксипиридина сукцинат, антигипоксическая активность.

Введение. Гипоксия как патологическое состояние, сопровождается различными заболеваниями и, во многом, определяет тяжесть его течения. В нормальных условиях организм способен полностью снабжать ткани и органы необходимым количеством кислорода. Неблагоприятная экологическая обстановка, тяжело или хронически протекающие заболевания и другие факторы приводят к значительному нарушению типичного хода обменных процессов и в организм не поступает достаточное количество кислорода, обеспечивающего естественную жизнедеятельность. Проблемой коррекции гипоксии, возникающей при дефиците кислорода, занимаются многие исследователи. Направления исследований включают поиск высокоэффективных средств с антигипоксической активностью в числе давно известных препаратов из различных фармакологических групп и среди вновь синтезированных химических соединений [5-7].

В ряду гетероциклических соединений в практическом отношении весьма важными являются вещества ряда 2Н-1-бензопиран-2-она (кумарина) и его многочисленные природные и синтетические производные. Кумарины, в отличие от других групп гетероциклических соединений, имеют разнообразные структуры, придающие им целый ряд различных физиологических свойств, что привлекает внимание химиков, биохимиков, фармакологов и клиницистов и представляется интересными и перспективными

для создания новых, более активных лечебных препаратов с ценными терапевтическими эффектами. Эти препараты, как правило, созданы на основе синтетических, ковалентно комбинированных производных кумарина; модификаций, уже имеющих в соединении заместителей, либо введением в различные положения кумаринового ядра аминоалкильных, сложноэфирных и других радикалов. Более подробная информация по синтезу и фармакологической активности полученных соединений представлена в монографиях [1-3, 11-13].

Целью настоящей работы является расширение арсенала лекарственных препаратов с антигипоксической активностью из группы производных кумаринов, посредством сравнительной оценки их действенности на различных моделях острой гипоксии.

Указанная задача решается нами в течение ряда лет, путем создания новых структур различных комбинированных соединений кумарина, поскольку целенаправленный поиск и синтез оригинальных эффективных лекарственных средств и изучение их биологической активности является весьма актуальным научным направлением.

Материал и методы исследования. Общая методика синтеза новых производных кумарина. 3,1 г (19,1 ммоль) 4-гидроксикумарина растворяли в 50 мл ацетона и 20 мл диметилформамида в круглодонной колбе вместимостью 100 мл, снабженной магнитной мешалкой,

*e-mail: azabyshv@mail.ru

добавляли 3,3 мл (38,3 ммоль) дибромэтана и 1,66 г (12,0 ммоль) K_2CO_3 . Затем реакционную смесь кипятили в течение 24 часов и вливали в стакан с водой 150 мл с работающей магнитной мешалкой. Осадок отфильтровывали. Чистый продукт получали с помощью колоночной хроматографии на колонке (5×150 см) с нейтральной Al_2O_3 (800 г, II степени активности). Элюирование проводили смесью хлористого метилена и петролейного эфира, постепенно увеличивая полярность системы.

Экспериментальная химическая часть. На спектрометре ФСМ-1201 («СПб Инструментс», Россия) регистрировали ИК-спектры синтезированных веществ в виде суспензии в вазелиновом масле или в дисках с KBr. Спектры ядерного магнитного резонанса были сняты на спектрометрах Bruker Avance III 400MHz (Bruker, США), внутренний стандарт – тетраметилсилан (ТМС). Температуры плавления синтезированных соединений определялись на приборе Melting points Apparatus IA9000 Series (Electrothermal, США).

Тонкослойную хроматографию проводили на пластинках Sorbfil UV254 (ПТСХП-В-УФ) (ЗАО «Сорбполимер», Россия) или Kieselgel 60 F254 (Merck, США) размером 10×20 см в системе растворителей бензол – этилацетат в соотношении 3:1.

Анализы высокоэффективной жидкостной хроматографии выполнены на жидкостном хроматографе LC-20 Prominence (Shimadzu, Япония) с ультрафиолетовым (УФ) детектором модели 168 с диодной матрицей. Рабочая длина волны 220 нм. Колонка из нержавеющей стали (250×4,6 мм), упакованная октадецилсиликагелем зернением 5 мкм типа Nucleosil C18, температура колонки 30±1 °С.

Подвижная фаза 1: в мерную колбу вместимостью 1 л помещали 150 мл деионизированной воды, доводили объем до метки ацетонитрилом (сорт 0, ос.ч., «Криохром», Россия) и перемешивали.

Подвижная фаза 2: в мерную колбу вместимостью 1 л помещали 100 мл деионизированной воды, доводили объем до метки ацетонитрилом и перемешивали.

Испытуемые растворы образцов с концентра-

цией 0,1 мг/мл помещали в мерную колбу вместимостью 100 мл, растворяли в ацетонитриле и доводили объем раствора до метки тем же растворителем.

Синтезированные соединения рекомендуются для более глубоких фармакологических исследований с целью внедрения его в медицинскую практику в качестве антигипоксических средств.

Определение антигипоксической активности. Исследование проведено на базе Центра экспериментальной фармакологии, Санкт-Петербургского Химико-Фармацевтического Университета (СПХФУ). Были использованы 3 модели гипоксии.

Гемическая гипоксия – снижение содержания O_2 в артериальной крови либо из-за уменьшения ее кислородной емкости, либо из-за снижения кислородсвязывающих свойств гемоглобина при нормоксическом pO_2 .

Гистотоксическая гипоксия – связана с блокадой работы цитохромового каскада переноса электронов цианидами или иными токсикантами.

Нормобарическая гипоксия с гиперкапнией – связана, как со снижением содержания кислорода в рециркулирующем воздушной смеси, из-за его поглощения при дыхании, так и с повышением парциального давления CO_2 за счет выдыхаемого воздуха.

Острая гемическая гипоксия (ОГемГ). Для создания модели острой гемической гипоксии, животным вводили внутрибрюшинно нитрит натрия (300 мг/кг), предварительно растворенный в воде для инъекций, а затем фиксировали продолжительность жизни мышей в минутах, которые переводили для расчетов в секунды

Острая гистотоксическая гипоксия (ОГтГ). Острую гистотоксическую гипоксию моделировали путем внутрибрюшинного введения мышам 0,4% водного раствора нитропруссид натрия (20 мг/кг), который является ингибитором тканевого дыхания. Затем регистрировали продолжительность жизни животных в минутах, которые переводили для расчетов в секунды.

Острая нормобарическая гипоксия с гиперкапнией (ОНГсГ). Животных помещали поодиночке в герметически закрываемые банки объём-

мом 200 см³. Фиксировали продолжительность жизни животных в минутах, которые переводили для расчетов в секунды [4,5,8].

Тест-система. В качестве тест-системы для проведения исследования использовались белые лабораторные аутбредные мыши самки. Все процедуры с животными в исследовании были рассмотрены и утверждены комиссией по биоэтике СПХФУ Минздрава России на предмет соответствия регулирующим актам.

Настоящее исследование было проведено в соответствии с международно-признанными стандартами [4].

Животные содержались в период адаптации и эксперимента по 10 особей в прозрачных поликарбонатных клетках для грызунов с подстилом. Клетки располагались в стеллажах, к которым подключено вентиляционно-приточное устройство Био.В.С. «Vent II» (производитель BIOSCAPE (EHRET), Германия). В клетках сохранялось давление выше атмосферного. Животные получали стандартный гранулированный «Полнорационный экструдированный комбикорм ЛБК-120 для лабораторных животных (крыс, мышей)», производства ЗАО «Тосненский комбикормовый завод», Россия ad libitum в кормовое углубление клетки. Животные содержались в контролируемых условиях окружающей

среды при температуре 20-26°C и относительной влажности 30-70 %. В комнатах содержания животных поддерживался 12-ти часовой цикл освещения и, по крайней мере, 10-ти кратная смена объема воздуха комнаты в час, температура и влажность постоянно контролировались с помощью термогигрометров Testo 608 – H1. После адаптации каждому отобранному в исследование животному была присвоена индивидуальная метка. Метка была нанесена специальным нетоксичным маркером на шерсть животного. Каждая клетка была идентифицирована карточкой, содержащей следующую информацию: название исследования, номер исследуемой группы, пол и количество животных в клетке, а также индивидуальные номера животных [4, 5, 9].

Схема введения. Испытуемые образцы вводили внутривентрикулярно в виде суспензий однократно за 60 минут до начала моделирования гипоксии. Животные контрольной группы получали воду очищенную в эквивалентных количествах. Также использовали препарат сравнения – этилметилгидроксипиридина сукцинат. В исследовании использовали одну дозу испытуемых ФС (фармацевтических субстанций), равную 10 мг/кг. Были сформированы 24 группы животных по 10 особей в каждой группе, всего 240 мышей самок.

Таблица

Влияние однократного внутривентрикулярного введения испытуемых субстанций на продолжительность жизни мышей самок при острых гемической, гистотоксической и нормобарической с гиперкапнией гипоксий (M±SD, n=10)

Группа №	Испытуемая субстанция	Дозировка (мг/кг)	Время жизни, с M±SD		
			при ОГемГ (n=10), гр.1-8	при ОГтГ (n=10), гр.9-16	при ОНГсГ (n=10), гр.17-24
1/9/17	Декурсинол	10	895,9±148,4*	482,6±87,1	1711,8±305,4 [#]
2/10/18	Обтусифол	10	971,9±158,1*, [#]	548,9±110,6	1928,7±296,7 [#]
3/11/19	Диуманкал	10	811,7±251,3	494,9±125,1	2178,9±817,4
4/12/20	ФС №4	10	1020,0±309,2	406,8±126,3	2465,6±649,4
5/13/21	ФС №5	10	1031,2±188,9*, [#]	457,6±143,6	1678,3±356,2 [#]
6/14/22	Умбеллиферон	10	852,2±200,6	601,2±113,7	2290,0±781,2
7/15/23	Контроль	-	601,7±113,5	433,6±141,0	2085,3±412,3
8/16/24	ЭМГПС	100	671,6±121,5	635,3±131,1	3382,2±647,3

Примечание: ОГемГ – острая гемическая гипоксия; ОГтГ – острая гистотоксическая гипоксия; ОНГсГ – острая нормобарическая гипоксия с гиперкапнией; ФС – фармацевтическая субстанция; ЭМГПС – этилметилгидроксипиридина сукцинат. * – достоверное отличие от контрольной группы (p<0,05); # – достоверное отличие от группы, получавшей мексидол (p<0,05).

Результаты. Животные контрольной группы, получавшие эквивалентное количество очищенной воды, погибали через $601,7 \pm 113,5$ с после инъекции натрия нитрита. Наиболее выраженным антигипоксическим эффектом при ОГемГ обладали вещества обтусифол ($971,9 \pm 158,1$ с), ФС №4 ($1020,0 \pm 309,2$ с) и ФС №5 ($1031,2 \pm 188,9$ с). Статистически достоверные отличия от группы контроля наблюдались при применении веществ декурсинола, обтусифола, ФС №5 ($p \leq 0,05$), а от ЭМГП сукцината – при применении обтусифола и ФС №5.

Животные контрольной группы, получавшие эквивалентное количество очищенной воды, погибали через $433,6 \pm 141,0$ с после инъекции ингибитора тканевого дыхания натрия нитропруссида. Наиболее выраженным антигипоксическим эффектом при ОГтГ обладало вещество обтусифол ($548,9 \pm 110,6$ с) и умбеллиферон ($601,2 \pm 113,7$ с). Статистически достоверных отличий от группы контроля и ЭМГП сукцината не наблюдалось. Эффекты всех ФС были значительно меньшими, чем таковой у ЭМГП сукцината.

Животные контрольной группы, получавшие эквивалентное количество очищенной воды, погибали через $2085,3 \pm 412,3$ с после помещения в гермообъем. Наиболее выраженным антигипоксическим эффектом при ОНГГ обладали ФС №4 ($2465,6 \pm 649,4$ с) и умбеллиферон ($2290,0 \pm 781,2$ с), однако, их эффект уступал по эффективности референтному препарату.

Обсуждение. В течение многих лет основным направлением в создании новых лекарственных веществ являлась модификация природных соединений растительного происхождения. Из литературных источников следует, что к веществам такого класса можно отнести кумарины. Синтезированные производные кумарина являются комбинированными молекулами, которые разработаны с использованием концепции молекулярной гибридизации [1-3]. Спектр эффектов, которыми обладают кумарины и их производные, очень масштабны (противосудорожный, противоопухолевый, антибактериальный, противовирусный, противовоспалительный, антикоагулянтный, антиоксидантный и др), поэтому они могут применяться для лечения многих заболеваний. Широкий диапазон биоло-

гической активности этих соединений постоянно исследуется в различных областях медицинской химии. Между тем, при гипоксических состояниях, имеющих место вследствие ограниченного усвоения кислорода тканями организма, фармакологическая активность производных кумарина охарактеризована не в полной мере [5-7,10,13].

В исследовании анализировалась антигипоксическое действие декурсинола, обтусифола, умбеллиферона, диуманкала, этилметилгидроксипиридина сукцинат и синтезированных ФС №4 и №5.

Декурсинол представляет собой пиранокумарин (органическое гетеротрициклическое соединение), выделен из лекарственного растения *Angelica gigas*, структурная формула 7,8-дигидро-2Н,6Н-пирано[3,2-*g*]хромен-2-он, замещенный бета-гидроксигруппой в положении 7 и двумя метильными группами в положении 8. Обладает противоопухолевой, антиметастазной активностью, проявляет мощный противовоспалительный эффект. Декурсинол был синтезирован из корней *Seseli grandivittatum* (жабрицы крупноканальцевой, семейство *Ariaceae*) широко распространенной в Шахбузском районе Нахичеванской АР [1-3].

Кумарины обтусифол и умбеллиферон при энтеральном введении мало токсичны. Обтусифол даже в высоких дозах оказывает слабое противосудорожное действие в моделях максимального электрошока. В литературе описаны результаты исследования по сравнительной оценке антиконвульсантной активности умбеллиферона и обтусифола [8,12].

Диуманкал по химическому составу относится к синтетическим лекарственным веществам со структурной формулой 7,7'-этилендиоксибензопирандион-2,2'. Терапевтическая эффективность, безопасность и фармакокинетические показатели диуманкала были детально изучены в доклинических исследованиях. В кардиологической практике диуманкал успешно применяется как антиангинальное, антиишемическое и антиаритмическое средство [13].

Этилметилгидроксипиридина сукцинат (ЭМГП) представляет собой модифицированную молекулу витамина В6, относится к классу 3-

оскипиридинов. Оказывает антигипоксическое, мембранопротекторное, ноотропное, противосудорожное и анксиолитическое действие [14].

Приведенное исследование сравнительного антигипоксического действия уже используемых и вновь синтезированных производных кумарина позволит внедрить в медицинскую практику отечественные лекарственные препараты в новом качестве. Однако, вышеперечисленные субстанции требуют дальнейших скрининговых фармакологических, фармакокинетических и клинических исследований.

Заключение. В процессе проведенных химикофармакологических исследований установлено, что из числа анализируемых соединений кумарина, наиболее выраженной антигипоксической активностью при ОГемГ обладали вещества обтусифол, ФС №4 и №5; при ОГтГ – обтусифол и умбеллиферон, при ОНГсГ – ФС №4 и умбеллиферон, однако, эффекты всех исследуемых соединений были значимо меньшими, чем таковые у ЭМГП сукцината.

ƏDƏBİYYAT – LITERATURA – REFERENCES

1. Абышев А.З., Агаев Э.М., Абышев Р.А.. Природные и синтетические кумарины и флавоноиды. – Санкт-Петербург-Баку: Прима, 2014. 463 с.
2. Абышев А.З., Нгуен К.Б. Синтетические, ковалентно-комбинированные производные 2-Н-1-бензопиран-2-она // Разработка и регистрация лекарственных средств, 2017, № 4(21), с. 132-138 https://www.pharmjournal.ru/jour/article/view/507?locale=ru_RU.
3. Абышев А.З., Нгуен К.Б. Природные и синтетические тритерпеноиды. – Санкт-Петербург: Арт-Экспресс, 2015. 284 с.
4. ГОСТ 32296-2013. Методы испытаний по воздействию химической продукции на организм человека. Основные требования к проведению испытаний по оценке острой токсичности при внутрижелудочном поступлении методом фиксированной дозы. – М.: Стандартиформ, 2014. 12с.
5. Каширин А.О., Крылова И.Б., Селина Е.Н., Полукеев В.А., и др. Антигипоксическое действие новых синтетических производных 7-алкоксикумарина и 4-аминокумарина при острой гипобарической гипоксии у крыс // Обзоры по клинической фармакологии, 2021, том 19, № 4, с. 413-420. doi:10.17816/RCF194413-420
6. Литасова Е.В., Ильин В.В., Мызников Л.В. и др. Кумарины как основа для разработки лекарственных веществ: да или нет? // Медицинский академический журнал, 2022, №3(22), с. 27-36 doi:10.17816/MAJ87582.
7. Потапович М.В., Метелица Д.И., Шадыро О.И. Антиоксидантная активность оксипроизводных кумарина // Прикладная биохимия и микробиология, 2012, том 48, № 3, с. 282–288 <https://elibrary.ru/item.asp?id=17727121>.
8. Родионова О.М., Сафонова А.Ф., Каширин А.О., В.А. и др. Влияние новых производных кумарина на выживаемость мышей в модельных условиях острой гипоксии // Медицинский академический журнал, 2019, №4(19), с. 103-108 doi:10.17816/MAJ19258
9. Руководство по проведению доклинических исследований лекарственных средств. Ч. 1 / Под ред. А.Н. Миронова. – М.: Гриф и К. 2012. 944 с.
10. Jain P.K., Joshi H. Coumarin: chemical and pharmacological profile // J. Appl. Pharm. Sci. 2012. Vol. 2, No. 6. P. 236–240.
11. Matos M. J. et al. Coumarins – an important class of phytochemicals // Phytochemicals-Isolation, Characterisation and Role in Human Health, 2015. P. 113–140 doi:10.5772/59982.
12. Medina F.G., Marrero J.G., Macias-Alonso M. et al. Coumarin heterocyclic derivatives: chemical synthesis and biological activity // Nat. Prod. Rep. 2015. Vol. 32, No. 10. P. 1472–1507. doi:10.1039/c4np00162a.
13. Nocentini A, Carta F. et al. Synthesis and bioactive evaluation of a novel series of coumarinazoles // Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters. 2014. V. 24. № 15. P. 3605–3608. <https://doi.org/10.1016/j.bmcl.2014.05.029>.
14. Shchulkin A.V., Erohina P.D., Goncharenko A.V. et al. Ethylmethylhydroxypyridine Succinate Is an Inhibitor but Not a Substrate of ABCB1 and SLCO1B1 // Pharmaceuticals (Basel), 2023, №16(11), p.1529. doi:10.3390/ph16111529.

XÜLASƏ

BƏZİ KUMARİN TÖRƏMƏLƏRİNİN SINTEZİ, FİZİKİ-KİMYƏVİ ANALİZİ VƏ FARMAKOLOJİ XÜSUSİYYƏTLƏRİ

¹Abışev A.Z., ²Ağayev E.M., ¹Abışev R.A., ¹İvkin D.Yu.

¹Sankt-Peterburq Kimya-Əczaçılıq Universiteti, Əczaçılıq Kimyası kafedrası, Sankt-Peterburq, Rusiya;
²Ə.Əliyeva adına Azərbaycan Dövlət Həkimləri Təkmilləşdirmə İnstitutu, Əczaçılıq kafedrası, Bakı, Azərbaycan

Məlum kumarin törəmələrinin, yeni sintez edilmiş farmasevtik substansiyaların (FS) və antihipoksant etilmetilhidroksipiridin suksinatın antihipoksik aktivliyi kəskin hipoksiyanın müxtəlif modellərində in vivo tədqiq edilmişdir. Kəskin hemik hipoksiya modelində siçanların saniyələrlə ölçülən ömrü ilə müəyyən edilən daha yüksək

antihipoksik təsirə obtusifol ($971,9 \pm 158,1$ s), FS №4 ($1020,0 \pm 309,2$ s) və №5 ($1031,2 \pm 188,9$ s); kəskin histotoksik hipoksiya modelində obtusifol ($548,9 \pm 110,6$ s) və umbelliferon ($601,2 \pm 113,7$ s); hiperkapniya ilə kəskin normobarik hipoksiya modelində FS №4 ($2465,6 \pm 649,4$ s) və umbelliferon ($2290,0 \pm 781,2$ s) maddələri malik olmuşdur. **Açar sözlər:** kumarin, dekursinol, obtusifol, umbelliferon, diumankal, etilmetilhidroksipiridin suksinat, antihipoksik aktivlik.

SUMMARY

SYNTHESIS, PHYSICOCHEMICAL ANALYSIS AND PHARMACOLOGICAL ACTIVITY OF SOME COUMARIN DERIVATIVES

¹Abyshv A.Z., ²Agayev E.M., ¹Abyshv R.A., ¹Ivkin D.Yu.

¹*Saint Petersburg Chemical-Pharmaceutical University, Department of Pharmaceutical Chemistry, Saint Petersburg, Russia;*

²*Azerbaijan State Advanced Training Institute for Doctors named after A.Aliyev, Department of Pharmacy, Baku, Azerbaijan*

The antihypoxic activity of known coumarin derivatives, new synthesized pharmaceutical substances (PS) and the antihypoxant ethylmethylhydroxypyridine succinate was studied in vivo in various models of acute hypoxia. The most pronounced antihypoxic effect, determined by the survival time of mice in seconds under acute hemic hypoxia, was observed by the substances obtusifol ($971,9 \pm 158,1$ s), PS№4 ($1020,0 \pm 309,2$ s) and №5 ($1031,2 \pm 188,9$ s); under acute histotoxic hypoxia – obtusifol ($548,9 \pm 110,6$ s) and umbelliferone ($601,2 \pm 113,7$ s); under acute normobaric hypoxia with hypercapnia – PS№4 and umbelliferone ($2290,0 \pm 781,2$ s).

Keywords: coumarin, decursinol, obtusifol, umbelliferone, diumancal, ethylmethylhydroxypyridine succinate, antihypoxic activity.

Redaksiyaya daxil olub: 12.08.2024

Çapa tövsiyə olunub: 09.09.2024

Rəyçi: Prof. T.A.Süleymanov