

СРАВНИТЕЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ БИОЛОГИЧЕСКОЙ АКТИВНОСТИ ПРОИЗВОДНЫХ БЕНЗО[D]ТИАЗОЛА IN VIVO И IN SILICO

Липатников К.В.¹, Собин Ф.В.¹, Пулина Н.А.¹, Юшкова Т.А.¹, Краснова А.И.¹, Дозморова Н.В.¹

¹ГБОУ ВПО «Пермская государственная фармацевтическая академия» Министерства здравоохранения Российской Федерации, Пермь, Россия (614990, Пермь, ул. Полевая, 2), e-mail: lkv2901@mail.ru

Проведен компьютерный прогноз биологической активности для новых производных бензо[d]тиазола с использованием программы PASS Online. Выбраны к синтезу соединения, перспективные с точки зрения проявления фармакологического эффекта. Структура полученных веществ подтверждена данными ИК-, ЯМР¹H спектроскопии. Изучена противовоспалительная активность соединений методом каррагенинового отека. Анальгетический эффект определяли методом термического раздражения «горячая пластинка». Исследование сахароснижающего действия проводили с использованием модели аллоксанового диабета. Противомикробная активность изучалась в отношении тест-культур микроорганизмов *St. aureus* ATCC 6538-P и *E. coli* ATCC 25922. Выявлены производные 4-(гет)арил-2-гидрокси-4-оксобут-2-еновых кислот, содержащие фрагмент бензо[d]тиазола, с фармакологическим действием на уровне или выше препаратов сравнения при низкой токсичности. Установлена некоторая взаимосвязь «биологическая активность in silico – биологическая активность in vivo».

Ключевые слова: производные бензо[d]тиазола, биологическая активность, компьютерное прогнозирование.

COMPARATIVE RESEARCH OF BIOLOGICAL ACTIVITY OF BENZO[D]THIAZOLE DERIVATIVES IN VIVO AND IN SILICO

Lipatnikov K.V.¹, Sobin F.V.¹, Pulina N.A.¹, Yushkova T.A.¹, Krasnova A.I.¹, Dozmorova N.V.¹

¹Perm State Pharmaceutical Academy, Perm, Russia (614990, Perm, Polevaya street, 2), e-mail: lkv2901@mail.ru

The computer prediction of biological activity of new benzo[d]thiazole derivatives using software PASS Online was carried out. Promising compounds were selected for synthesis. The structure of obtained compounds was confirmed by IR, ¹H NMR spectroscopy. Anti-inflammatory activity of the compounds was studied by the method of carrageenan edema. The analgesic effect was determined by thermal stimulus «hot plate». Study of hypoglycemic action was conducted using a model of alloxan diabetes. Antimicrobial activity was studied against test-microorganism cultures *St. aureus* ATCC 6538-P and *E. coli* ATCC 25922. Containing benzo[d]thiazole derivatives of 4-(het)aryl-2-hydroxy-4-oxobut-2-enoic acid with pharmacological effects at or above reference drugs with low toxicity were revealed. Some relationship «biological activity in silico - biological activity in vivo» was established.

Keywords: benzo[d]thiazole derivatives, biological activity, computer prediction.

Получение высокоэффективных и малотоксичных биологически активных органических соединений остается одним из приоритетных направлений развития фармацевтической науки в настоящее время. С учетом проводимой государственной политики импортозамещения к 2020 г. предполагается до 50% увеличить присутствие на фармацевтическом рынке отечественных инновационных лекарственных препаратов с оптимальным профилем безопасности. Одним из наиболее интенсивно развивающихся направлений деятельности ученых из различных стран является использование метода in silico для поиска и целенаправленного синтеза новых биологически активных соединений с заданными видами фармакологического действия.

Обширные исследования в области синтеза и определения биологической активности

4-(гет)арил-2-гидрокси-4-оксобут-2-еновых кислот остаются актуальными за счет наличия в исходной матрице кислоты нескольких реакционных центров, позволяющих вводить в структуру различные биологически активные фрагменты. В ряду данных производных ранее были получены запатентованные соединения, содержащие в своей структуре бензо[d]тиазол, обладающие противомикробной, противовоспалительной и гипогликемической активностью [2-4]. Известно, что данный фармакофор содержится в таких лекарственных препаратах, как рилузол, прамипексол, тиарамид, этоксозоламид. Кроме того, установлено, что производные, содержащие этот гетероцикл, обладают противовоспалительным, антимикробным, противовирусным, антигельминтным, противоопухолевым, противосудорожным и другими видами биологического действия [6,8-10]. Таким образом, представляет интерес проведение анализа результатов испытаний *in silico* и *in vivo*, а также выявление некоторых закономерностей «структура — биологическая активность» в ряду производных 4-(гет)арил-2-гидрокси-4-оксобут-2-еновых кислот, содержащих фрагмент бензо[d]тиазола.

Целью работы является сравнительное исследование данных, полученных в программе PASS Online, с результатами фармакологического скрининга новых производных бензо[d]тиазола.

Материалы и методы исследования

На предварительном этапе компьютерный прогноз биологической активности был осуществлен для 89 запланированных к синтезу химических соединений, содержащих в структуре фрагмент бензо[d]тиазола. Критериями оценки степени активности в системе PASS Online служили вероятность проявления активности P_a , а также отношение вероятности проявления активности к вероятности ее отсутствия P_a/P_i [1]. Лишь соединения, предположительно обладающие одним из доступных к изучению видов активности (противовоспалительная, анальгетическая, гипогликемическая, противомикробная), были включены в работу. Таким образом, к синтезу было предложено 34 соединения, установлена их тонкая структура, определены физико-химические, а также спектральные характеристики методами ИК-, ЯМР¹H-спектроскопии. Для проведения фармакологического скрининга полученным соединениям присвоены условные шифры от I до XXXIV.

Острая токсичность наиболее активных соединений изучали на белых нелинейных мышах обоего пола массой 18-22 г с определением LD₅₀ по методу Першина Г.Н. Каждое соединение испытывали на 6 животных. Соединения вводили перорально в виде взвеси в 2% крахмальном растворе однократно, после чего животные находились под наблюдением в течение 14 дней. Контрольным животным вводили эквивалентное количество 2% крахмального раствора [5].

Противовоспалительная активность синтезированных соединений изучалась на

модели острого воспалительного отека, вызванного субплантарным введением 0,1 мл 1% водного раствора каррагинина в заднюю лапу крыс. Вещества вводили перорально в дозе 50 мг/кг в виде взвеси в 2 % крахмальном растворе. О противовоспалительном действии судили по степени торможения отека (в %) в сравнении с контролем (2% крахмальная слизь). Препаратом сравнения являлся диклофенак, вводившийся в дозе 10 мг/кг [5].

Анальгетическую активность определяли на беспородных мышах обоего пола массой 16-22 г по методике термического раздражения «горячая пластинка». Исследуемые вещества вводили перорально в дозе 50 мг/кг в виде взвеси в 2% крахмальной слизи за 30 мин до помещения животных на горячую пластинку. Показателем болевой чувствительности служила длительность пребывания мышей на горячей пластинке до наступления первых признаков оборонительной реакции – облизывание или отдергивание задних лапок. Каждое соединение испытывали на 6 животных. В качестве препарата сравнения использовали метамизол натрия и диклофенак в дозе 50 мг/кг [5].

Изучение гипогликемического действия проводили на модели аллоксанового диабета. Опыты осуществлялись на белых нелинейных крысах обоего пола. Животных лишали пищи за 16 часов до опыта и на время его проведения. Экспериментальную гипергликемию моделировали внутрибрюшинным введением аллоксана тригидрата («Alfa Aesar®») в дозе 170 мг/кг. Концентрацию глюкозы в крови животных определяли глюкозооксидазным методом до введения исследуемых соединений, а также через 120 мин. после него. Степень гипогликемической активности соединений сравнивали с активностью метформина в дозе 50 мг/кг [5].

Противомикробную активность синтезированных соединений устанавливали методом двукратных серийных разведений в жидкой питательной среде по отношению к тест-культурам микроорганизмов *St. aureus* ATCC 6538-P и *E. coli* ATCC 25922. Микробная нагрузка составила $2,5 \times 10^5$ микробных тел/мл. Учет результатов проводили через 18-20 часов термостатирования при температуре 37°C. Для всех исследуемых соединений определяли минимальные ингибирующие концентрации (МИК) в мкг/мл. В качестве растворителя соединений использовали ДМФА, препаратами сравнения служили хлоргексидин и диоксидин [5].

Результаты исследования и их обсуждение

В результате изучения острой токсичности производных бензо[d]тиазола установлено, что LD₅₀ соединений IV, VII и XII составляет 5800, 3800, 4300 мг/кг соответственно и, согласно классификации опасности химической продукции, эти вещества можно отнести к 5 классу опасности [7].

Противовоспалительная активность была изучена у шести производных

бензо[d]тиазола. Результаты *in silico* и *in vivo* приведены в таблице 1. Выявлено, что синтезированные соединения в экспериментальном опыте проявляют противовоспалительное действие различной степени выраженности. Обнаружены соединения I, IV и XVIII, обладающие активностью на уровне препарата сравнения диклофенака, что подтвердило результаты, полученные в программе PASS Online, но была предсказана лишь низкая вероятность нахождения данного фармакологического эффекта. При этом для соединения XX соотношение P_a/P_i было меньше 10. Однако, биологическое действие соединения на первом часу наблюдения сопоставимо с препаратом сравнения.

Таблица 1

Противовоспалительная активность производных бензо[d]тиазола

Шифр соединения	Экспериментальное значение (торможение каррагенинового отека, %)			Прогноз PASS
	1 час	3 часа	5 часов	
I	53,5±2,9	38,2±2,0	38,5±2,8	+
IV	38,8±3,2	62,4±3,8	55,7±3,1	+
XVII	9,49 ± 10,64	21,53 ± 13,01	27,3 ± 11,44	+
XVIII	21,4±1,8	56,98 ± 6,35	68,96 ± 13,53	+
XIX	23,29 ± 4,92	51,6 ± 5,75	32,7 ± 7,84	+
XX	64,3±2,3	41,4±3,1	30,5±2,3	-
диклофенак	40,7±4,5	66,2±4,7	60,6±4,3	+++

+++ - $P_a/P_i \geq 100$; ++ - $10 \leq P_a/P_i < 100$; + - $1 < P_a/P_i < 10$.

Наличие анальгетической активности было исследовано у шести соединений. Полученные данные представлены в таблице 2. Компьютерным прогнозом установлено, что анальгетическое действие могут оказать только три изученных соединения. Тем не менее, выявлены экспериментальные данные о том, что все синтезированные производные бензо[d]тиазола обладают обезболивающим действием. Обнаружены соединения, сопоставимые по силе действия с препаратами сравнения.

Таблица 2

Анальгетическая активность производных бензо[d]тиазола

Шифр соединения	Увеличение латентного периода оборонительного рефлекса через 30 мин / %	Увеличение латентного периода оборонительного рефлекса через 60 мин / %	Прогноз PASS
I	126,6	166,6	-
II	161,1	92,2	+
III	111,9	128,8	-
IV	101,1	202,2	-
V	106,7	140,0	+
VII	28,6	137,5	+
метамизол	145,5	180,0	+++

натрия			
диклофенак	133,3	153,3	+++

+++ - $Pa/Pi \geq 100$; ++ - $10 \leq Pa/Pi < 100$; + - $1 < Pa/Pi < 10$.

Определение гипогликемической активности экспериментально осуществляли у 17 соединений. Результаты приведены в таблице 3. Нами обнаружено, что хелат XX оказывает выраженное гипогликемическое действие, а бромированные производные V-VII сопоставимы по силе действия с эффектом метформина. При этом *in silico* вероятность данной активности показана у всех изученных соединений, что может свидетельствовать о перспективности поиска данного вида биологического действия в ряду производных бензо[d]тиазола.

Таблица 3

Гипогликемическая активность производных бензо[d]тиазола

Шифр соединения	% торможения гипергликемии через 120 мин	Прогноз PASS
I	42,5±2,3	+
II	11,7±2,8	+
III	22,4±1,6	+
IV	29,7±3,7	+
V	49,3±1,3	+
VI	48,8±2,0	+
VII	57,6±2,6	+
VIII	26,7±5,8	+
IX	43,8±7,4	+
X	41,5±2,3	+
XI	37,7±4,4	+
XII	48,3±3,8	+
XIII	13,4±2,8	+
XIV	25,3±1,7	+
XV	20,4±3,6	+
XVI	8,8±2,3	+
XX	41,5±2,3	+
метформин	54,5±2,9	+++

+++ - $Pa/Pi \geq 100$; ++ - $10 \leq Pa/Pi < 100$; + - $1 < Pa/Pi < 10$.

В выборку для изучения антибактериального действия попало 31 производное. Установлено, что по программе PASS Online большинство соединений оказывают низкий антимикробный эффект. Однако в ходе эксперимента было выявлено, что производное IV, содержащее электроноакцепторный заместитель в арильном фрагменте, превышает по активности диоксидин в 31 и 16 раз соответственно для *St. aureus* и *E. coli*. При переходе к незамещенным, метил- и метоксизамещенным производным I, II, III происходит снижение противомикробного действия до уровня диоксидина. У бензо[d]тиазоламинов V, VI наблюдается уменьшение противомикробной активности по сравнению с соединениями I, II, IV. В то же время, у амидов VII, VIII выявлена активность выше диоксидина. При этом

установлено, что для всех соединений с соотношением Pa/Pi меньше 10 отмечается крайне низкая антибактериальная активность, что подтверждает эффективность использования программы PASS Online для предсказания данного вида активности.

Таблица 4

Противомикробная активность производных бензо[d]тиазола

Шифр соединения	МИК, мкг/мл	Прогноз PASS
	St. aureus / E/ coli	
I	62,0/62,0	+
II	62,0/500	+
III	31,0/31,0	+
IV	2,9/4,2	+
V	125/125	++
VI	250/250	++
VII	31,0/31,0	++
VIII	7,8/31,0	++
IX	500/500	-
X	1000/1000	-
XI	1000/1000	-
XII	1000/1000	-
XIII	500/1000	-
XIV	1000/1000	-
XV	1000/1000	-
XVI	1000/1000	-
XX	500/1000	-
XXI	500/1000	-
XXIII	500/1000	-
XXIII	125/125	+
XXIV	250/250	+
XXV	250/250	+
XXVI	125/1000	+
XXVII	500/500	+
XXVIII	500/500	+
XXIX	500/1000	+
XXX	250/250	+
XXXI	1000/1000	+
XXXII	1000/1000	+
XXXIII	500/1000	+
XXXIV	1000/1000	+
диоксидин	62,0/62,0	++
хлоргексидин	125/125	++

+++ - Pa/Pi ≥ 100; ++ - 10 ≤ Pa/Pi < 100; + - 1 < Pa/Pi < 10.

Выводы

1. Исследована биологическая активность тридцати четырех производных бензо[d]тиазола в сравнении in vivo и in silico.

2. Выявлены экспериментально вещества I и IV, обладающие противовоспалительной, анальгетической и противомикробной активностью на уровне или выше препаратов

сравнения.

3. В результате опытных исследований обнаружено соединение VII с гипогликемическим эффектом на уровне препарата сравнения. Вещество VIII проявляет противомикробную активность *in vivo* выше эффекта препаратов сравнения.

Список литературы

1. Планирование *in silico* скрининга и экспериментальное изучение гипогликемических производных циклических гуанидинов / П.М. Васильев, А.А. Спасов, К.В. Ленская [и др.] // Кубанский научный медицинский вестник. – 2014. - № 6(148). – С. 11-15.
2. Пулина, Н.А., Юшков, В.В., Собин, Ф.В., Одегова, Т.Ф., Яценко, К.В., Федоренко, Е.Н. N-(2-бензотиазолил)амид 2-гидрокси-4-оксо-4-(4-хлорфенил)-2-бутеновой кислоты, обладающий противомикробной и противовоспалительной активностью // Патент России № 2396262. 2010. Бюл. № 22.
3. Пулина, Н.А., Юшков, В.В., Юшкова, Т.А., Собин, Ф.В., Краснова, А.И., Залесов, В.В., Вахрин, М.И. 2-гидрокси-4-оксо-4-фенил-2-бутеноат бензотиазолиламмония, обладающий гипогликемической активностью // Патент России № 2412177. 2011. Бюл. № 5.
4. Пулина, Н.А., Юшкова, Т.А., Собин, Ф.В., Юшков, В.В. N-(2-бензотиазолил)амид 3-бром-2,4-диоксо-4-(4-метоксифенил)бутановой кислоты, обладающий гипогликемической активностью // Патент России № 2455293. 2012. Бюл. № 19.
5. Руководство по проведению доклинических исследований лекарственных средств. Часть первая / ред. кол.: А.Н. Миронов, Н.Д. Бунатян, А.Н. Васильев [и др.]. — М.: Гриф и К, 2012. — 944 с.
6. Синтез и биологическая активность новых производных 1,3-бензотиазола / Н.А. Пулина, Ф.В. Собин, Т.А. Юшкова [и др.] // Хим.-фарм. журн. - 2014. - Т. 48, №8. - С. 20-23.
7. Юрасова, А.А., Макарова, А.С., Скобелев, Д.О. Внедрение в Российской Федерации современной модели классификации опасности химической продукции // Токсикол. вест. - 2011. - №1(106). - С. 2-10.
8. Benzothiazole derivatives and its Biological activities: A Review / R. Kumar [и др.] / Research Journal of Pharmaceutical, Biological and Chemical Sciences. - 2012. - Vol. 3, Issue 3. - P. 166-178.
9. Common methods to synthesize benzothiazole derivatives and their medicinal significance: a review / S. Khokra, K. Arora, H. Mehta [и др.] / International Journal of Pharmaceutical Sciences and Research. - 2011. - Vol. 2(6). - P. 1356-1377.
10. Review of the 2-Amino Substituted Benzothiazoles: Different Methods of the Synthesis / J. Malik, F. Manvi, B. Nanjwade [и др.] / Der Pharmacia Lettre. - 2010. - 2(1). - P. 347-359.

Рецензенты:

Молохова Е.И., д.ф.н., профессор, профессор кафедры промышленной технологии с курсом биотехнологии Пермской государственной фармацевтической академии, г. Пермь;

Яковлев И.Б., д.ф.н., профессор, заведующий кафедрой фармакологии Пермской государственной фармацевтической академии, г. Пермь.