

ТОКСИКОЛОГИЯ ЛЕКАРСТВЕННЫХ СРЕДСТВ

ИССЛЕДОВАНИЕ ТОКСИЧНОСТИ ГЕТЕРОЦИКЛИЧЕСКИХ СОЕДИНЕНИЙ С ВЫСОКОЙ АНТИМИКРОБНОЙ АКТИВНОСТЬЮ

О. В. Нечаева¹, Н. Ф. Шуршалова², Е. И. Тихомирова³, О. П. Плотников⁴

Проведена комплексная оценка токсичности новых гетероциклических соединений ряда фенилпентендиона, халконов, полифункционально замещенных эфиров, енаминов и семикарбазонов, обладающих высокой антимикробной активностью, на биотест-объектах и белых лабораторных мышах. Определены препараты с низкими показателями острой токсичности из группы фенилпентендиона (2,4-дихлор-1,3,5-трифенил-2-пентен-1,5-дион), халкона (3-(4-(диметиламино)бензилиден)пентан-2,4-дион), полифункционально-замещенных эфиров (2,2'-ди-(3-(3-метокси-4-гидроксифенил)-2,4-диацетил-5-гидрокси-5-метилциклоген-1-ил)диэтиловый эфир) и енаминов (этил-2-метил-4-(1-пиперидил)-6-(3-нитрофенил)циклогекса-1,3-диенкарбоксилат – диенамин), которые могут рассматриваться как кандидаты в эффективные химиотерапевтические средства для борьбы с возбудителями инфекционных заболеваний.

Ключевые слова: гетероциклические соединения; антимикробная активность; токсичность.

ВВЕДЕНИЕ

В последние десятилетия сохраняет свою актуальность проблема распространения антибиотикорезистентных штаммов условно-патогенных бактерий, решение которой связано с поиском новых высокоэффективных гетероциклических соединений, обладающих антимикробной активностью.

Выявлена высокая антибактериальная активность представителей ряда фенилпентендиона [11], установлено эффективное антимикробное действие в отношении различных групп микроорганизмов и противоопухолевая активность соединений ряда халкона [6, 15], показаны перспективы поиска эффективных антимикробных соединений среди представителей ряда енаминов [4, 7, 14], в медицинской практике находят широкое применение препараты, являющиеся производными семикарбазонов, например, антисептик фурацилин (семикарбазон 5-нитрофурурола) и противотуберкулезный препарат тибон (тиосемикарбазон *n*-ацетамидобензальдегида) [9, 12].

Предварительные исследования позволили нам установить высокую антибактериальную активность в

отношении грамположительных и грамотрицательных бактерий представителей данных классов гетероциклических соединений [5, 10]. Однако современные химиотерапевтические препараты, помимо эффективных антимикробных свойств, должны обладать низкой токсичностью.

Поэтому целью нашей работы явилась комплексная оценка токсичности гетероциклических соединений ряда фенилпентендиона, халкона, полифункционально замещенных эфиров, енамина и семикарбазона, обладающих высокой антибактериальной активностью, в отношении биотест-объектов и лабораторных животных.

МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

В исследованиях использовали гетероциклические соединения, синтезированные на кафедре органической и биоорганической химии Института химии Саратовского государственного университета им. Н. Г. Чернышевского, проявившие высокую антимикробную активность *in vitro*, перечень которых представлен в табл. 1.

Предварительный скрининг исследуемых соединений по показателям острой токсичности проводили с использованием биотест-объектов – низших ракообразных *Daphnia magna* Straus по стандартной методике [13]. Острое токсическое действие различных концентраций исследуемых соединений на дафнии определяли по их смертности (летальности) за определенный период экспозиции. Критерием острой токсичности служила гибель 50 % и более дафний за 48 ч в исследуемой пробе при условии, что в контрольном эксперименте все животные сохраняли свою жизнеспособность.

¹ ГБОУ ВПО “Саратовский ГМУ им. В. И. Разумовского” Минздрава Российской Федерации, Россия, 410012, Саратов, ул. Большая Казачья, 112.

² ФГБОУ ВПО “Саратовский государственный университет им. Н. Г. Чернышевского”, Россия, 410012, Саратов, ул. Астраханская, 83.

³ ФГБОУ ВПО “Саратовский государственный технический университет им. Ю. А. Гагарина”, Россия, 410054, Саратов, ул. Политехническая, 77.

⁴ ФКУЗ Российский научно-исследовательский противочумный институт “Микроб” Роспотребнадзора Российской Федерации, Россия, 410005, Саратов, ул. Университетская, 46.

В экспериментах по определению острого токсического действия устанавливали:

1. Летальную концентрацию исследуемых соединений, вызывающую гибель 100 % тест-организмов в течение 48 ч (LK_{100-48}).

2. Среднюю летальную концентрацию, вызывающую гибель 45 – 50 % тест-организмов в течение 48 ч (LK_{50-48}).

3. Минимальную летальную концентрацию, вызывающую гибель 10 % тест-объектов в течение 48 ч экспозиции (BK_{10-48}).

4. Максимальную безвредную концентрацию соединений, при которой не наблюдалась гибель животных (BK_{0-48}).

Для определения острой токсичности исследуемых соединений рассчитывали процент погибших дафний в опытных пробирках (A , %) по сравнению с контролем:

$$A = \frac{X_K - X_T}{X_K} \cdot 100,$$

где X_K — количество выживших дафний в контроле; X_T — количество выживших дафний в опытных пробирках.

Считали, что при $A \leq 10$ % исследуемые соединения не оказывали острого токсического действия, а при $A \geq 50$ % — обладали острым токсическим действием.

Для исследуемых соединений с показателями $A \leq 10$ % определяли острую токсичность на здоровых половозрелых белых мышах-самцах массой 18 – 20 г однократным введением препаратов в различных дозах [12 – 14]. В работе использовали 80 белых мышей, которые содержались на стандартном рационе вивария ФГБНУ “Саратовский научно-исследовательский ветеринарный институт”. Все эксперименты выполнены в соответствии с требованиями Федерального закона от 01.01.1997 г. “О защите животных от жестокого обращения” и предписаниями Женевской кон-

венции “International Guiding Principles for Biomedical Research Involving Animals” (Geneva, 1990).

В связи с низкой растворимостью соединений в воде их предварительно растворяли в диметилсульфоксиде (ДМСО), а затем готовили рабочие концентрации препаратов (1 и 10 мкг/мл) в физиологическом растворе с конечной концентрацией ДМСО не более 0,1 %. Препараты вводили внутривентриально в объеме 0,2 мл. Животных наблюдали в течение 14 сут, учитывая их физиологическое состояние, а также количество погибших и выживших особей. На основании полученных результатов рассчитывали величину LD_{50} и проводили оценку токсичности изучаемых соединений. Все результаты обработаны методами вариационной статистики с определением средних арифметических величин (M) и средней ошибки средней арифметической (m) [1]. Расчет результатов осуществляли с применением пакета прикладных программ Statistica 6.0 (for Windows; “Stat Soft Inc.”; США), Statgraph (Version 2.6; Coulter), Microsoft Excel 2003 (for Windows XP). Статистические результаты считались достоверными при $p \leq 0,05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Через 24 ч экспозиции все особи дафний в опытных и контрольных растворах исследуемых соединений были живыми, активно плавали, никаких дополнительных морфологических изменений не наблюдалось.

На основании подсчета количества выживших и погибших особей через 48 ч экспозиции во всех опытных и контрольных растворах соединений рассчитывали процент погибших дафний, по отношению к контролю. Полученные результаты представлены в табл. 2.

На основании полученных данных определены показатели острой токсичности для всех исследуемых соединений, которые представлены в табл. 3.

Таблица 1. Гетероциклические соединения, используемые в работе

№ п/п	Лабораторный шифр соединения	Полное название соединения
Ряд фенилпентендиона		
1.	ПНВ-1	2,4-Дихлор-1,3,5-трифенил-2-пентен-1,5-дион
Ряд халконов		
2.	ХА-44	3-(4-(Диметиламино)бензильден)пентан-2,4-дион
3.	ХА-47	Этил-2-(4-гидроксибензильден)-3-оксобутанкарбоксилат
Ряд полифункционально замещенных эфиров		
4.	ПЭ-45	2,2'-Ди-(3-фенил-2,4-диацетил-5-гидрокси-5-метилциклоген-1-ил)диэтиловый эфир
5.	ПЭ-46	2,2'-Ди-(3-(3-метокси-4-гидроксифенил)-2,4-диацетил-5-гидрокси-5-метилциклоген-1-ил)диэтиловый эфир
6.	ПЭ-49	2,2'-Ди-(3-(3-нитрофенил)-2,4-диацетил-5-гидрокси-5-метилциклоген-1-ил)диэтиловый эфир
Ряд енаминов		
7.	Е-4	Этил-2-метил-4-(1-пиперидил)-6-(3-нитрофенил) циклогекса-1,3-диенкарбоксилат – диенамин
Ряд семикарбазонов		
8.	С-9	Диэтил-4-гидрокси-4-метил-2-(4-метоксифенил)-6-семикарбазоноциклогексан-1,3-дикарбоксилат
9.	С-10	Диэтил-4-гидрокси-4-метил-6-семикарбазоно-2-(2-тиенил)циклогексан-1,3-дикарбоксилат

В результате проведенных исследований установлено, что соединения С-9 и С-10 из ряда семикарбазонов проявили высокую токсичность в отношении тест-объекта во всех рабочих концентрациях от 3,2 до 1000 мкг/мл. Поэтому невозможно было определить средние летальные и безопасные концентрации данных соединений. Исследованные соединения из ряда полифункционально замещенных эфиров оказывали различное действие на тест-объект. Так соединения ПЭ-45 и ПЭ-49 оказывали выраженное токсическое действие на дафнии: их ЛК₁₀₀₋₄₈ составила 1000 мкг/мл, ЛК₅₀₋₄₈ – 500 мкг/мл. Поскольку даже при низких концентрациях этих соединений (7,5, 3,2 мкг/мл) наблюдалась гибель 20 % дафний, то их безопасные концентрации по отношению к изучаемому биотест-объекту не установлены.

Для соединения с лабораторным шифром ПЭ-46 значение ЛК₁₀₀₋₄₈ составило 1000 мкг/мл, а ЛК₅₀₋₄₈ – 500 мкг/мл. По показателям жизнеспособности дафний для ПЭ-46 были определены значения БК₁₀₋₄₈, которые располагались в интервале от 15,6 до 30,1 мкг/мл, а также БК₀₋₄₈, значения которых составили 3,2 – 15,6 мкг/мл. Полученные результаты позволили судить о низкой токсичности данного соединения.

Соединения ряда халконов также оказывали неодинаковое влияние на жизнеспособность биотест-объектов. Так соединение ХА-47 характеризовалось как высокотоксичное по отношению к дафниям, поскольку их гибель даже при низких концентрациях препарата была более 20 %, что не позволило рассчитать значения БК₁₀₋₄₈ и БК₀₋₄₈. Для вещества ХА-44 наблюдалось абсолютное летальное острое токсическое действие при концентрации 1000 мкг/мл, среднее летальное действие – при 500 мкг/мл. Кроме того, для ХА-44 установлены значения БК₁₀₋₄₈ в интервале от 15,6 до 30,1 мкг/мл, БК₀₋₄₈ – 3,2 – 7,5 мкг/мл, что позволило отнести его к малотоксичным соединениям.

Наименьшей токсичностью из всех изученных гетероциклических соединений обладали ПНВ-1 ряда фенилпентендионов и Е-4 ряда енаминов, так как они

имели наиболее высокие значения БК₁₀₋₄₈ – 125 – 250 мкг/мл и БК₀₋₄₈ – 3,2 – 60,2 мкг/мл.

Таким образом, все исследованные соединения по отношению к указанному тест-объекту были разделены на 3 группы:

1. Высокотоксичные соединения, для которых не представлялось возможным определить значения БК₁₀₋₄₈ и БК₀₋₄₈ (ПЭ-45, ПЭ-49, ХА-47, С-9 и С-10);
2. Малотоксичные соединения, которые характеризовались низкими значениями БК₁₀₋₄₈ и БК₀₋₄₈ (ХА-44, ПЭ-46);
3. Нетоксичные соединения, которые характеризовались высокими значениями БК₁₀₋₄₈ и БК₀₋₄₈ (ПНВ-1, Е-4).

Предварительное определение острой токсичности с помощью биотестирования позволяет использовать меньшее количество лабораторных животных, что значительно снижает стоимость проводимых исследований.

Из-за высокой токсичности соединений с лабораторными шифрами ПЭ-45, ПЭ-49, ХА-47, С-9 и С-10 для дальнейших исследований не использовали. Для малотоксичных (ХА-44, ПЭ-46) и нетоксичных (ПНВ-1, Е-4) соединений на следующем этапе работы были определены показатели острой токсичности на мышцах-самцах при внутрибрюшинном введении различных доз препаратов. Полученные результаты представлены в табл. 4.

Значения LD₅₀ для всех исследованных соединений были высокими и составили от 420 до 500 мг/кг. Высокие показатели LD₅₀ представителей ряда фенилпентендиона (ПНВ-1), халкона (ХА-44), полифункционально замещенных эфиров (ПЭ-46) и енаминов (Е-4) позволили отнести их к III классу токсичности. Для сравнения можно указать, что LD₅₀ для фурациллина при внутрибрюшинном введении составляет 82,5 мг/кг, а LD₅₀ для фурадонина – 43,3 мг/кг. Таким образом, определены препараты с низкими показателями острой токсичности, которые могут рассматриваться как кандидаты в эффективные химиотерапевтические и антисептические средства с широким спектром антимикробного действия.

Таблица 2. Выживаемость дафний через 48 ч экспозиции в растворах исследуемых соединений

№	Лабораторный шифр соединения	Показатель гибели дафний А, %									Контроль
		концентрация соединений, мкг/мл									
		1000	500	250	125	60,2	30,1	15,6	7,5	3,2	
1	ПНВ-1	100	50	10	10	0	0	0	0	0	0
2	ХА-44	100	90	40	40	20	10	10	0	0	0
3	ХА-47	100	80	20	20	20	20	20	20	20	0
4	ПЭ-45	100	90	40	40	40	40	40	40	20	0
5	ПЭ-46	100	80	20	20	20	10	0	0	0	0
6	ПЭ-49	100	80	20	20	20	20	20	20	20	0
7	Е-4	100	50	10	10	0	0	0	0	0	0
8	С-9	100	100	100	100	90	80	80	40	20	0
9	С-10	100	100	100	100	90	80	80	40	20	0

Таблица 3. Показатели острой токсичности исследуемых соединений (мкг/мл) при использовании в качестве тест-объекта *Daphnia magna* Straus

№	Лабораторный шифр соединения	ЛК ₁₀₀₋₄₈	ЛК ₅₀₋₄₈	БК ₁₀₋₄₈	БК ₀₋₄₈
1	ПНВ-1	1000	500	125 – 250	3,2 – 60,2
2	ХА-44	1000	500	15,6 – 30,1	3,2 – 7,5
3	ХА-47	1000	500	–	–
4	ПЭ-45	1000	500	–	–
5	ПЭ-46	1000	500	30,1	3,2 – 15,6
6	ПЭ-49	1000	500	–	–
7	Е-4	1000	500	125 – 250	3,2 – 60,2
8	С-9	125 – 1000	–	–	–
9	С-10	125 – 1000	–	–	–

Таблица 4. Показатели LD₅₀ исследуемых соединений у белых мышей-самцов

№ п/п	Лабораторный шифр соединения	LD ₅₀ , мг/кг
1	ПНВ-1	420
2	ХА-44	500
3	ПЭ-46	500
4	Е-4	500

ВЫВОД

В результате комплексной оценки токсичности гетероциклических соединений ряда фенилпентендиона (ПНВ-1), халкона (ХА-44), полифункционально замещенных эфиров (ПЭ-46) и енаминов (Е-4) показана их низкая токсичность в отношении разных тест-объектов (дафний и белых лабораторных мышей), которая позволяет отнести их к III классу токсичности.

ЛИТЕРАТУРА

- И. П. Ашмарин, А. А. Воробьев, *Статистические методы в микробиологических исследованиях*, Издательство медицинской литературы, Ленинград (1986).
- В. А. Блинов, И. И. Калужный, *Основы клинической биохимии человека и животных*, Приволжское книжное издательство, Саратов (1996).
- Т. А. Гуськова, *Новые препараты в фармакологии*, № 9, 20 – 30 (2003).

- В. В. Зарубаев, П. М. Анфимов, А. А. Штро и др., *Вопросы вирусол.*, № 6, 30 – 36 (2012).
- Е. А. Зинина, Н. Ф. Шуршалова, О. В. Нечаева и др., *Известия Саратовского университета. Новая серия. Сер. Химия. Биология. Экология*, **12**(2), 8 – 9 (2012).
- С. С. Зыкова, Т. Ф. Одегова, *Вопросы биол., мед. и фарм. химии*, № 2, 37 – 42 (2014).
- Ю. В. Короткий, Н. А. Врынчану, Ю. Н. Максимов, М. О. Лозинский, *Хим.-фарм. журн.*, **45**(1), 21 – 23 (2011); *Pharm.-Chem. J.*, **45**(1), 19 – 21 (2011).
- А. О. Лойт, М. Ф. Савченков, *Токсикологическая оценка новых химических веществ*, Иркутск (1992), сс. 74 – 83.
- М. Д. Машковский, *Лекарственные средства*, Новая Волна, Москва (2005).
- Н. Ф. Пермякова, О. В. Нечаева, Е. И. Тихомирова, *Фундам. исслед.*, № 9, 66-67 (2009).
- Н. В. Пчелинцева, О. В. Федотова, Я. Г. Колеватова, *Пути и формы совершенствования фармацевтического образования. Создание новых физиологически активных веществ*, Воронеж (2007), сс. 161 – 163.
- М. Д. Ревенко, В. И. Присакарь, А. В. Диздарь и др., *Хим.-фарм. ж.*, **45**(6), 33 – 37 (2011); *Pharm.-Chem. J.*, **45**(6), 351 – 354 (2011).
- Руководство по определению методом биотестирования токсичности вод, донных отложений, загрязняющих веществ и буровых растворов*, РЭФИА, НИА-Природа, Москва (2002).
- Э. А. Шокова, В. В. Ковалев, *Хим.-фарм. журн.*, **47**(5), 32 – 48 (2013); *Pharm.-Chem. J.*, **47**(5), 264 – 280 (2013).
- М. Т. Konieczny, W. Konieczny, M. Sabisz, et al., *Chem. Pharm. Bul.*, **55**(5), 817 – 820 (2007).

Поступила 25.11.15

TOXICITY OF HETEROCYCLIC COMPOUNDS WITH HIGH ANTIMICROBIAL ACTIVITY

O. V. Nechaeva¹, N. F. Shurshalova², E. I. Tikhomirova³, and O. P. Plotnikov⁴

¹ V. I. Razumovsky Saratov State Medical University, ul. Bol'shaya Kazach'ya 112, Saratov, 410012 Russia

² Saratov State University, ul. Astrakhanskaya 83, Saratov, 410012 Russia

³ Yury Gagarin State Technical University of Saratov, ul. Politekhnikeskaya 77, Saratov, 410054 Russia

⁴ "Microbe" Russian Research Antiplague Institute, ul. Universitetskaya 46, Saratov, 410005 Russia

Complex assessment of the toxicity of new heterocyclic compounds (belonging to phenylpentenediones, chalcones, polyfunctional substituted esters, enamines, and semicarbazones) possessing high antimicrobial activity has been carried out on biotest objects and white laboratory mice. Preparations with low indices of acute toxicity were found in the groups of phenylpentenediones (2,4-dichloro-1,3,5-triphenyl-2-pentene-1,5-dione), chalcones (3(4-(dimethylamino)benzylidene)pentane-2,4-dione), polyfunctional substituted esters (2,2'-di-(3-(3-methoxy-4-hydroxyphenyl)-2,4-diacetyl-5-hydroxy-5-methylcyclogex-1-yl)-ethyl oxide) and enamines (ethyl-2-methyl-4-(1-piperidyl)-6-(3-nitrophenyl)cyclohexa-1,3-dienecarboxylate-dienamine), which can be considered as potential effective chemotherapeutic means for treating causative agents of infectious diseases.

Keywords: heterocyclic compounds; antimicrobial activity; toxicity.