

ИММУНОФАРМАКОЛОГИЯ

DOI: 10.30906/0869-2092-2022-85-2-21-25

ИММУНОБИОЛОГИЧЕСКАЯ И ПРОТИВОВОСПАЛИТЕЛЬНАЯ АКТИВНОСТЬ НАТРИЕВЫХ СОЛЕЙ ПИРРОЛО[3,4-с]-ПИРАЗОЛ-3-ОНОВ И ПИРАЗОЛ-3-КАРБОКСАМИДОВ В ЭКСПЕРИМЕНТЕ

О. Н. Гейн¹, О. В. Бобровская¹, С. В. Гейн², В. Л. Гейн^{1,*}

Исследовано влияние натриевых солей 5-арил-4-[4-(ацетиламиносульфонил)фенил]-6-(4-бромфенил)-3,5-дигидропирроло[3,4-с]пирозол-3-онов и натриевых солей N-{4-[(1,3-тиазол-2-ил)сульфамойл]фенил}-5-арил-1-фенилпирозол-3-карбоксамидов на поглотительную активность лейкоцитов периферической крови, их микробицидный потенциал, на течение острой воспалительной реакции, изучена их острая токсичность. Полученные результаты свидетельствуют о низкой токсичности исследуемых соединений: для соединений **2а**, **2б**, **2г** ЛД₅₀ находится в дозах больших, чем 2000 мг/кг при внутрибрюшинном введении, для соединения **2в** — ЛД₅₀ > 1300 мг/кг. Установлено, что соединения **2а**, **2б**, **2г** стимулируют поглотительную активность нейтрофильных гранулоцитов, увеличивая количество активных нейтрофилов в среднем более, чем на 60 % ($p < 0,05$) и количество поглощенных объектов на 8,6 % и более ($p < 0,05$). В то же время, производные пирроло[3,4-с]пирозол-3-онов оказывают преимущественно угнетающее влияние на динамику продукции кислородных радикалов лейкоцитами. Введение соединений **2а** и **2г** (50 мг/кг внутрибрюшинно) уменьшает выраженность каррагенинового отёка более чем на 50 % ($p < 0,05$) через 3 ч после введения флогогена с максимальным проявлением эффекта через 5 ч — уменьшение воспаления на 61,54 и 66,99 % ($p < 0,05$) соответственно. На фоне введения соединения **2б** торможение воспаления отмечено через 4 ч на 47,75 % ($p < 0,05$).

Ключевые слова: натриевые соли пирроло[3,4-с]пирозол-3-онов; натриевые соли пирозол-3-карбоксамидов; фагоцитарная активность; продукция активных форм кислорода; противовоспалительная активность; крысы.

ВВЕДЕНИЕ

В настоящее время синтезируется достаточно большое количество новых химических соединений, в том числе органического происхождения. Существует необходимость в том, чтобы продукты органического синтеза были биологически активны, так как поиск новых активных и малотоксичных соединений, которые имели бы перспективы применения в медицинской практике, весьма актуален [10]. В этом плане интерес представляют производные пирозол-3-карбоксамидов и пирроло[3,4-с]-пирозол-3-онов, а также их натриевые соли, среди которых были обнаружены вещества, обладающие биологической активностью [1, 2].

Однако, влияние пирозол-3-карбоксамидов и пирроло[3,4-с]-пирозол-3-онов на отдельные показатели им-

мунной системы ранее не изучалось. Также представляло интерес продолжить исследования отдельных представителей пирозол-3-карбоксамидов и пирроло[3,4-с]-пирозол-3-онов на наличие противовоспалительной активности.

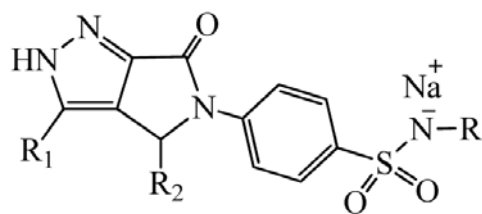
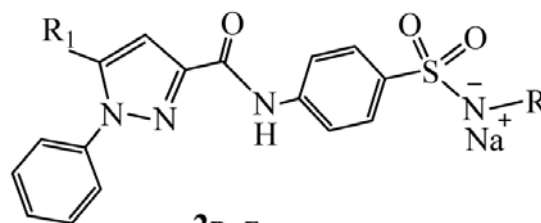
Целью данного исследования явилось изучение влияния натриевых солей 5-арил-4-[4-(ацетиламиносульфонил)фенил]-6-(4-бромфенил)-3,5-дигидропирроло[3,4-с]пирозол-3-онов (**2а** и **2б**) и натриевых солей N-{4-[(1,3-тиазол-2-ил)сульфамойл]фенил}-5-арил-1-фенилпирозол-3-карбоксамидов (**2в** и **2г**) на фагоцитарную активность лейкоцитов периферической крови, их микробицидный потенциал и на течение воспалительной реакции.

МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Взаимодействием 5-арил-4-[4-(ацетиламиносульфонил)фенил]-6-(4-бромфенил)-3,5-дигидропирроло[3,4-с]пирозол-3-онов (**1а**, **б**) и N-{4-[(1,3-тиазол-2-ил)сульфамойл]фенил}-5-арил-1-фенилпирозол-3-карбоксамидов (**1в**, **г**) с эквивалентным количеством 0,2 М раствора метилата натрия в смеси метанол — ДМФА

¹ ФГБОУ ВО Пермская государственная фармацевтическая академия Минздрава РФ, Россия, 614990, Пермь, ул. Полевая 2; * e-mail: geinvl48@mail.ru

² Институт экологии и генетики микроорганизмов — филиал ФГБУН Пермского федерального исследовательского центра Уральского отделения РАН, Россия, 614990, Пермь ул. Голева, 13.

**2а, б****2в, г**

Структурные формулы изучаемых соединений.

$R^1 = 4\text{-BrC}_6\text{H}_4$, $R^2 = 3\text{-CH}_3\text{OC}_6\text{H}_4$ (**2а**); $R^1 = 4\text{-BrC}_6\text{H}_4$, $R^2 = 2\text{-NO}_2\text{C}_6\text{H}_4$ (**2б**); $R^1 = 4\text{-C}_2\text{H}_5\text{OC}_6\text{H}_4$ (**2в**); $R^1 = 4\text{-CH}_3\text{OC}_6\text{H}_4$ (**2г**).

(1:1) были получены исследуемые их натриевые соли (**2а–г**) [1, 2].

Эксперименты в системе *in vivo* проведены на белых нелинейных половозрелых крысах массой 180 – 220 г, а также на белых нелинейных мышах массой 22 – 25 г (питомник лабораторных животных “Рапполово”, Ленинградская обл.).

Все исследовательские работы с лабораторными животными выполняли в соответствии с общепринятыми этическими нормами обращения с животными, принятыми Европейской конвенцией по защите позвоночных животных, используемых для исследовательских и иных научных целей [4].

Острую токсичность соединений **2а–г** изучали, используя экспресс-метод В. Б. Прозоровского [5]. Исследуемые вещества вводили внутривентриально в 2 % крахмальной слизи в дозах 500, 1000, 1260, 1580 и 2000 мг/кг. Для вещества **2в** максимально вводимая внутривентриально доза составила 1300 мг/кг.

Для оценки влияния исследуемых соединений на фагоцитарную активность лейкоцитов периферической крови крыс в системе *in vivo* исследуемые вещества вводили животным внутривентриально в 2 % крахмальной слизи в дозе 100 мг/кг. Образцы крови забирала из сосудов хвоста до введения исследуемых веществ (контроль), а также через 1 ч после введения вещества. Определение фагоцитарной активности лейкоцитов периферической крови проводили модифицированным методом [8]. Результаты учитывали микроскопически (Micros MC₅₀, Австрия). Рассчитывали показатели фагоцитарной активности лейкоцитов: процент фагоцитоза (клетки, захватившие объекты фагоцитоза) и фагоцитарный индекс (количество объектов фагоцитоза, приходящихся на одну фагоцитирующую клетку) для общего лейкоцитарного и дифференцированно для нейтрофильного, моноцитарного фагоцитоза.

Продукцию активных форм кислорода оценивали в реакции люминолзависимой хемилюминесценции (ЛЗХЛ). Реакцию проводили в 96-луночных плоскодонных планшетах (Greiner, Германия), каждая лунка содержала 10⁵ клеток (перитонеальных лейкоцитов) в 100 мкл раствора Хенкса. В качестве индуктора ЛЗХЛ

использовали опсонизированный зимозан в концентрации 150 мкг/мл. В качестве маркера выраженности реакции ЛЗХЛ использовался люминол в концентрации 10⁻⁵ М, свечение которого не избирательно по отношению к различным кислородсодержащим радикалам [11]. Регистрацию результатов проводили в течение 1 ч с интервалом в 5 мин с помощью многофункционального спектрофотометра (TecanTrading AG, Швейцария).

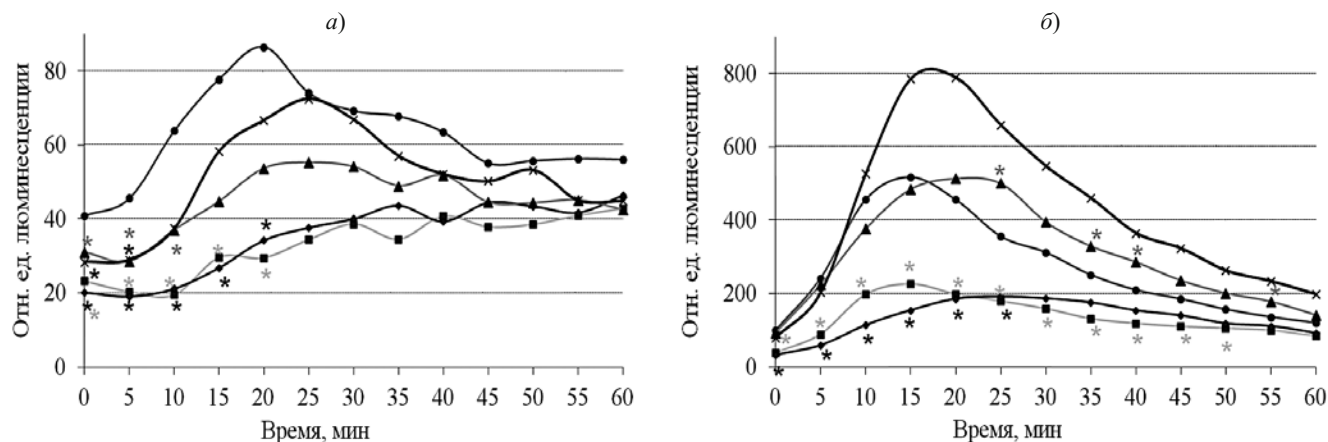
Острую воспалительную реакцию вызывали субплантарным введением 0,1 мл 1 % раствора каррагинина в заднюю лапу животного [6]. Объем стопы у крыс измеряли онкометрически до введения каррагинина (контроль), а затем через 3, 4 и 5 ч после его введения. Исследуемые соединения вводили внутривентриально в виде взвеси в 2 %-ой крахмальной слизи в дозе 50 мг/кг за 30 мин до введения флогогена. Препаратом сравнения служил нимесулид в дозе 50 мг/кг, вводимый внутривентриально в 2 % крахмальной слизи. Противовоспалительный эффект оценивали по показателям прироста объема стопы и торможения отека, которые выражали в процентах к показателям контрольной группы.

Полученные данные обрабатывали методами математической статистики с помощью *t*-критерия Стьюдента. Эффект считали достоверным при $p < 0,05$ по сравнению с контролем [3].

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

При наблюдении за мышами в течение 14 дней после внутривентриального введения исследуемых соединений в изучаемых дозах гибели животных выявлено не было. Следовательно, ЛД₅₀ соединений **2а, б, г** находится в дозах больших, чем 2000 мг/кг, а для **2в** больше, чем 1300 мг/кг. Таким образом, исследуемые вещества по классификации К. К. Сидорова относятся к практически нетоксичным соединениям [7].

При оценке влияния исследуемых соединений на фагоцитарную активность, было установлено стимулирующее влияние натриевых солей пирроло[3,4-*c*]-пиразол-3-онов (**2а, б**), а также соединения **2г**, являющегося натриевой солью пиразол-3-карбоксамидов, на общий лейкоцитарный фагоцитоз по изучаемым пока-



Влияние соединений **2а–г** на спонтанную (*а*) и стимулированную (*б*) продукцию активных форм кислорода лейкоцитами: ● — контроль, ◆ — соединение **2а**, ■ — соединение **2б**, ▲ — соединение **2в**, × — соединение **2г**; * $p < 0,05$ по сравнению с контролем.

зателям (табл. 1). Соединения **2а, б, г** оказывали стимулирующее влияние преимущественно на поглотительную активность нейтрофильных гранулоцитов, увеличивая, как количество активных нейтрофилов, так и число захваченных ими объектов фагоцитоза. Повышение количества активных моноцитов выявлено только на фоне введения **2а**.

Установлено влияние исследуемых соединений на продукцию активных форм кислорода в реакции ЛЗХЛ. Спонтанная продукция активных форм кислорода лейкоцитами на фоне введения **2а** и **2б** была снижена по сравнению с контролем в течение первых 20 мин регистрации (рисунок, *а*). На фоне введения **2в** и **2г** также отмечено угнетение продукции активных форм кислорода лейкоцитами, но на протяжении более короткого времени — до 10-ой минуты исследования.

В стимулированных зимозаном культурах наблюдалось угнетение продукции активных радикалов по

сравнению с контролем на фоне **2б** практически на протяжении всего периода наблюдения (до 50 мин), а на фоне **2а** в течение первых 25 мин наблюдения включительно (рисунок, *б*). Однако, на фоне **2в** интенсивность продукции активных форм кислорода по сравнению с контрольной группой возрастала на 25, 35, 40 и 55 мин исследования. Влияния **2г** на изменение динамики кислородного взрыва по сравнению с контролем выявлено не было.

Как известно, интенсивность продукции активных форм кислорода лейкоцитами позволяет говорить об изменениях их микробицидного потенциала, а следовательно, о способности клеток элиминировать поглощенный патоген. Однако, не менее известно, что активные формы кислорода могут оказывать и повреждающее действие на мембраны клеток, запускать процессы перекисного окисления липидов, участвовать в развитии воспалительной реакции [9].

Таблица 1. Влияние соединений **2а–г** на фагоцитарную активность лейкоцитов ($M \pm m$)

Группа	Нейтрофилы		Моноциты		Лейкоциты	
	Процент фагоцитоза	Фагоцитарный индекс	Процент фагоцитоза	Фагоцитарный индекс	Процент фагоцитоза	Фагоцитарный индекс
Контроль ($n = 8$)	23,72 ± 1,75	1,28 ± 0,01	37,85 ± 6,15	1,38 ± 0,09	27,21 ± 1,92	1,33 ± 0,03
2а ($n = 8$)	38,66 ± 3,04*	1,39 ± 0,04*	61,39 ± 5,96*	1,27 ± 0,07	40,97 ± 2,71*	1,38 ± 0,03
Контроль ($n = 9$)	22,64 ± 2,85	1,15 ± 0,03	27,61 ± 2,93	1,18 ± 0,06	19,68 ± 2,21	1,16 ± 0,03
2б ($n = 9$)	38,57 ± 2,85*	1,41 ± 0,06*	33,13 ± 2,33	1,43 ± 0,15	38,00 ± 2,88*	1,41 ± 0,07*
Контроль ($n = 7$)	21,42 ± 1,89	1,34 ± 0,04	29,05 ± 2,96	1,31 ± 0,12	22,32 ± 2,48	1,33 ± 0,05
2в ($n = 7$)	17,87 ± 3,40	1,24 ± 0,06	32,46 ± 6,76	1,32 ± 0,09	19,22 ± 3,73	1,26 ± 0,06
Контроль ($n = 9$)	22,67 ± 1,98	1,26 ± 0,03	24,68 ± 3,05	1,14 ± 0,06	22,82 ± 1,84	1,24 ± 0,03
2г ($n = 9$)	37,09 ± 3,04*	1,38 ± 0,04*	29,99 ± 3,53	1,29 ± 0,09	36,47 ± 2,75*	1,37 ± 0,04*

* $p < 0,05$ по сравнению с контролем, n — количество животных.

Таблица 2. Противовоспалительная активность соединений 2а–г ($M \pm m$)

Соединение	Прирост объема стопы, %		Торможение отека стопы, %		Прирост объема стопы, %		Торможение отека стопы, %	
	через 3 ч		через 4 ч		через 5 ч			
Контроль	30,25 ± 5,87	–	19,22 ± 2,89	–	12,82 ± 2,27	–		
Нимесулид	9,82 ± 2,93*	67,54	5,18 ± 2,59*	73,06	4,02 ± 1,12*	68,66		
2а	14,50 ± 1,88*	52,07	7,86 ± 1,88*	59,08	4,93 ± 1,72*	61,54		
2б	27,64 ± 3,74 [#]	8,64	10,04 ± 1,79*	47,75	8,45 ± 1,36 [#]	34,04		
2в	22,81 ± 5,74	24,61	16,05 ± 3,34 [#]	16,45	9,03 ± 2,77	29,57		
2г	15,13 ± 1,98*	50,00	8,38 ± 1,42*	56,39	4,23 ± 1,21*	66,99		

* $p < 0,05$ по сравнению с контролем; [#] $p < 0,05$ по сравнению с нимесулидом.

В связи с этим, представляло интерес установить корреляцию между способностью изучаемых соединений влиять на продукцию активных форм кислорода в реакции ЛЗХЛ и наличием у них противовоспалительной активности. Результаты исследований представлены в табл. 2. В ходе проведенных исследований выявлено, что введение соединений **2а** и **2г** уменьшало выраженность каррагенинового отека лапы крыс через 3, 4 и 5 ч, а на фоне введения соединения **2б** — через 4 ч после индукции воспалительной реакции.

Наличие противовоспалительной активности **2г** и производных пирроло[3,4-с]-пиразон-3-онов **2а** и **2б**, возможно, связано с их способностью снижать продукцию активных кислородных радикалов, что согласуется с данными теста ЛЗХЛ в нашем исследовании и подтверждается исследованиями других авторов [12]. Также, опираясь на литературные данные, можно прогнозировать, что уменьшение воспалительной реакции на фоне **2г**, связано с угнетением продукции провоспалительных цитокинов [13].

Полученные результаты позволяют рассматривать производные пирроло[3,4-с]-пиразон-3-онов и пиразол-3-карбоксамидов в качестве перспективных веществ, обладающих иммуномодулирующей активностью и проявляющих противовоспалительное действие.

ВЫВОДЫ

1. Исследуемые вещества при внутрибрюшинном введении обладают низкой токсичностью: ЛД₅₀ для соединений **2а**, **б**, **г** находится в дозах больших, чем 2000 мг/кг, для соединения **2в** — ЛД₅₀ > 1300 мг/кг.

2. Соединения **2а**, **б**, **г** стимулируют поглотительную активность нейтрофильных гранулоцитов, увеличивая количество активных нейтрофилов в среднем более, чем на 60 % ($p < 0,05$) и количество поглощенных объектов более, чем на 8,6 % ($p < 0,05$). При этом, производные пирроло[3,4-с]-пиразол-3-онов (**2а**, **б**) оказывают преимущественно угнетающее влияние на динамику продукции кислородных радикалов лейкоцитами.

3. Противовоспалительная активность выявлена у соединений **2а**, **б**, **г** при внутрибрюшинном введении в дозе 50 мг/кг. Отмечено уменьшение воспалительной реакции на фоне введения **2а**, **г** более чем на 50 % ($p < 0,05$) через 3 ч после введения флогогена с максимальным проявлением эффекта через 5 ч — уменьшение воспаления на 61,54 и 66,99 % ($p < 0,05$) соответственно. На фоне введения соединения **2б** торможение воспаления отмечено через 4 ч на 47,75 % ($p < 0,05$).

ЛИТЕРАТУРА

- О. В. Бобровская, В. Л. Гейн, Г. В. Селиверстов и др., *Ж. общей химии*, **87**(12), 1957 – 1964 (2017); doi: 10.1134 / S1070363217120040.
- В. Л. Гейн, О. В. Бобровская, А. А. Русских и др., *Ж. общей химии*, **89**(4), 542 – 551 (2019); doi: 10.1134 / S0044460X19040073.
- С. Гланц, *Медико-биологическая статистика*, Практика, Москва (1999).
- Европейская конвенция по защите позвоночных животных, используемых в экспериментальных и других научных целях*, Страсбург (1986).
- В. Б. Прозоровский, М. П. Прозоровская, В. М. Демченко, *Фармакол. и токсикол.*, № 4, 497 – 502 (1978).
- Руководство по проведению доклинических исследований лекарственных средств*, А. Н. Миронов (ред.), Гриф и К, Москва (2012).
- К. К. Сидоров, *Токсикология новых промышленных химических веществ*, № 13, 47 – 51 (1973).
- Ю. И. Шилов, В. П. Владыкина, А. Т. Атнагузина, *Пермский мед. журн.*, **15**(2), 3 – 9 (1998).
- J. El-Benna, M. Hurtado-Nedelec, V. Marzaioli, et al., *Immunol. Rev.*, **273**(1), 180 – 193 (2016); doi: 10.1111 / imr.12447.
- C. S. Graebin, F. V. Ribeiro, K. R. Rogério, et al., *Cur. Org. Synth.*, **16**(6), 855 – 899 (2019); doi: 10.2174 / 1570179416666190718153703.
- J. Pečřivová, T. Mačičková, M. Číž, et al., *Physiol. Res.*, № 53, 97 – 102 (2004).
- S. Yousuf, Kh. M. Khan, U. Salar, et al., *Med. Chem.*, **14**(5), 536 – 548 (2018); doi: 10.2174 / 1573406414666180112122001.
- L. Zeng, B. Xi, K. Huang, et al., *Comb. Sci.*, **21**(10), 656 – 665 (2019); doi: 10.1021 / acscmbosci.9b00050.

Поступила 28.12.20

IMMUNOBIOLOGICAL AND ANTI-INFLAMMATORY ACTIVITY OF SODIUM SALTS OF PYRROLO[3,4-*c*]-PYRAZOL-3-ONES AND PYRAZOL-3-CARBOXAMIDES IN EXPERIMENT

O. N. Gein¹, O. V. Bobrovskaya¹, S. V. Gein², and V. L. Gein¹

¹ Perm State Pharmaceutical Academy, Ministry of Health of the Russian Federation, ul. Polevaya 2, Perm, 614990 Russia

² Institute of Ecology and Genetics of Microorganisms, ul. Goleva 13, Branch of the Federal State Research Center, Ural Branch of the Russian Academy of Sciences, Perm, 614990 Russia

The effect of sodium salts of 5-aryl-4-[4-(acetylaminosulfonyl)phenyl]-6-(4-bromophenyl)-3,5-dihydropyrrolo[3,4-*c*]pyrazol-3-ones and sodium salts of N-{4-[(1,3-thiazol-2-yl)sulfamoyl]phenyl}-5-aryl-1-phenylpyrazole-3-carboxamides on the absorptive activity of peripheral blood leukocytes, their microbicidal potential, the course of acute inflammatory reaction, and their acute toxicity was studied. The obtained results indicated low toxicity of the studied compounds: LD₅₀ for compounds **2a**, **2b**, **2d**, was found greater than 2000 mg/kg and for compound **2c** it was > 1300 mg/kg when administered intraperitoneally. It was also found that compounds **2a**, **2b**, and **2d** stimulated the phagocytic activity of neutrophilic granulocytes, increasing the number of active neutrophils by more than 60% on average ($p < 0.05$) and the number of phagocytosed objects by 8.6% or more ($p < 0.05$). At the same time, pyrrolo[3,4-*c*]pyrazol-3-one derivatives have predominantly inhibitory effect on the dynamics of oxygen radical production by leukocytes. The introduction of compounds **2a** and **2d** (50 mg/kg, i.p.) reduces the severity of carrageenan edema by more than 50% ($p < 0.05$) 3 h after the administration of phlogogen with a maximum manifestation of the effect in 5 h, as manifested by decrease in inflammation by 61.54 and 66.99% ($p < 0.05$), respectively. On the background of introduction of compound **2b**, the inhibition of inflammation in 4 h reached 47.75% ($p < 0.05$).

Keywords: sodium salts of pyrrolo[3,4-*c*]pyrazol-3-ones; sodium salts of pyrazole-3-carboxamides; phagocytic activity; production of reactive oxygen species; anti-inflammatory activity; rats.