

© Коллектив авторов, 2016

Л. А. Валеева, Г. Г. Давлятова, Ю. В. Шабалина, А. В. Исакова,
Ф. А. Халиуллин, И. Л. Никитина

СИНТЕЗ И АНТИДЕПРЕССИВНЫЕ СВОЙСТВА ГИДРАЗИДА 2-[3-МЕТИЛ-7-(ТИЕТАНИЛ-3)-1-ЭТИЛКСАНТИНИЛ-8-ТИО]УКСУСНОЙ КИСЛОТЫ

Башкирский государственный медицинский университет, Россия, Уфа, ул. Ленина, 3;
e-mail: bsmu.pharmacology2@yandex.ru

По усовершенствованной нами методике в 2 стадии синтезирован гидразид 2-[3-метил-7-(тиетанил-3)-1-этилксантинил-8-тио]уксусной кислоты. Структура синтезированных соединений подтверждена данными ИК и ЯМР-спектроскопии. Изучена острая токсичность и определена ЛД₅₀, которая для белых беспородных мышей составляет 700 мг/кг. В тестах “повешивание мышей за хвост” (TST) и “принудительное плавание” (FST) установлено, что гидразид 2-[3-метил-7-(тиетанил-3)-1-этилксантинил-8-тио]уксусной кислоты оказывает антидепрессивное действие, наиболее выраженное в дозе 12 мг/кг.

Ключевые слова: ксантины; тиетаны; гидразиды; острая токсичность; антидепрессивный эффект; мыши.

Производные ксантина применяются как психостимулирующие, бронхорасширяющие и антиагрегантные средства [1 – 3]. С целью получения новых биологически активных веществ на кафедре фармацевтической химии БГМУ были синтезированы новые производные ксантина — гидразиды ксантинилтиоуксусных кислот [2]. Наибольший интерес из них представляет гидразид 2-[3-метил-7-(тиетанил-3)-1-этилксантинил-8-тио]уксусной кислоты (III).

Целью настоящей работы явились синтез, определение острой токсичности и изучение антидепрессивных свойств этого гидразида.

Соединение III синтезировали по усовершенствованной нами методике по схеме.

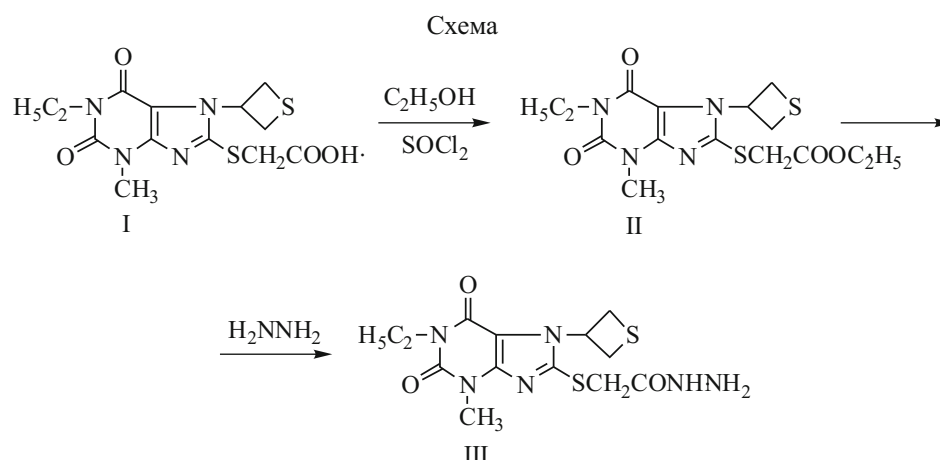
Реакцией этерификации кислоты I с этиловым спиртом в присутствии хлористого тионила с выходом 86 % получен этиловый эфир II. Взаимодействием

эфира II с 60 % раствором гидразингидрата в среде этилового спирта с выходом 85 % синтезирован гидразид III.

Экспериментальная химическая часть

ИК-спектры соединений в таблетках с бромидом калия сняты на приборе “Инфралюм ФТ-02”. Спектры ЯМР ¹H и ¹³C сняты на приборе “Bruker AM-300” с рабочей частотой 300 (¹H) и 75 МГц (¹³C). В качестве растворителя использован дейтерированный хлороформ, в качестве внутреннего стандарта — сигналы растворителя.

Индивидуальность синтезированных соединений определяли методом тонкослойной хроматографии на пластинках “Sorbfil” в системе хлороформ — этиловый спирт (объемное соотношение 1:3). Пятна проявляли парами йода во влажной камере. Данные эле-



ментного анализа синтезированных соединений соответствуют вычисленным значениям.

[(1-Этил-3-метил-2,6-диоксо-7-тетран-3-ил-2,3,6,7-тетрагидро-1H-пурин-8-ил)тио]уксусная кислота (I) синтезирована по методике, описанной в работе [3].

Этил[(1-этил-3-метил-2,6-диоксо-7-тетран-3-ил-2,3,6,7-тетрагидро-1H-пурин-8-ил)тио]ацетат (II). К 40 мл этилового спирта добавляют 0,60 г (5 ммоль) хлористого тионила и 1,78 г (5 ммоль) кислоты I. Реакционную смесь кипятят 1 ч, охлаждают, выпавший осадок отфильтровывают, промывают водой, сушат. Получают 1,65 г (86 %) эфира II. Т.пл. = 103 – 105° С (этиловый спирт). $C_{15}H_{20}N_4O_4S_2$. ИК-спектр (KBr), ν_{max} , cm^{-1} : 1609, 1651, 1698, 1742 (C=C, C=N, C=O). ЯМР 1H ($CDCl_3$), δ , м.д.: 1,19 – 1,31 (м, 6H, 1- CCl_3 и $OSCH_3$); 3,25 – 3,36 (м, 2H, $S(CH_2)_2$); 3,49 (с, 3H, 3- CH_3); 4,01 – 4,14 (м, 4H, SCH_2 и 1- CH_2); 4,20 (к, 2H, J 7,1 Гц, OCH_2); 4,30 – 4,41 (м, 2H, $S(CH_2)_2$); 5,83 – 5,97 (м, 1H, 7-CH). ЯМР ^{13}C ($CDCl_3$), δ , м.д.: 13,28 (1- CH_3); 14,16 (8- CH_3); 29,64 (3- CH_3); 35,06 [$S(CH_2)_2$ и SCH_2]; 36,92 (1- CH_2); 51,87 (7-CH); 62,17 (OCH_2); 108,90 (C^5); 148,82 (C^4); 149,13 (C^2); 150,89 (C^6); 153,92 (C^8); 168,04 (8-CO). Приведенные константы и спектральные характеристики соответствуют литературным данным [2].

2-[(1-Этил-3-метил-2,6-диоксо-7-тетран-3-ил-2,3,6,7-тетрагидро-1H-пурин-8-ил)тио]ацетогидразид (III). Раствор 1,92 г (5 ммоль) эфира II и 1,25 г (15 ммоль)

60 % раствора гидразингидрата в 60 мл этилового спирта кипятят 15 мин. Упаривают в вакууме, добавляют 40 мл воды. Образовавшийся осадок отфильтровывают, промывают водой, сушат. Получают 1,57 г (85 %) гидразида III. Т.пл. = 181 – 183° С (пропиловый спирт). $C_{13}H_{18}N_6O_3S_2$. ИК-спектр, ν_{max} , cm^{-1} : 1645, 1657, 1665, 1696, 1699 (C=C, C=N, C=O, N-H); 3100 – 3380 (N-H). ЯМР 1H ($CDCl_3$), δ , м.д.: 1,24 (т, 3H, J 6,8 Гц, CH_3); 3,24 – 3,35 (м, 2H, $S(CH_2)_2$); 3,53 (с, 3H, 3- CH_3); 3,82 – 3,98 (шир. с, 4H, SCH_2 и NH_2); 4,12 (к, 2H, J 6,8 Гц, 1- CH_2); 4,28 – 4,39 (м, 2H, $S(CH_2)_2$); 5,74 – 5,88 (м, 1H, 7-CH); 8,24 – 8,35 (шир. с, 1H, NH). ЯМР ^{13}C ($CDCl_3$), δ , м.д.: 13,16 (CH_3); 29,72 (3- CH_3); 33,88 (SCH_2); 34,82 [$S(CH_2)_2$]; 36,97 (1- CH_2); 51,94 (7-CH); 109,10 (C^5); 148,88 (C^4); 149,01 (C^2); 150,69 (C^6); 153,79 (C^8); 168,43 (8-CO). Приведенные константы и спектральные характеристики соответствуют литературным данным [2].

Экспериментальная биологическая часть

Опыты проведены на 182 беспородных мышках-самцах массой 20 – 23 г, полученных из ГУП “Иммунопрепарат” (Уфа). Животные содержались в стандартных условиях вивария при естественном свето-темновом режиме, свободном доступе к воде и полнорационному корму (ГОСТ Р50258-92).

При выполнении экспериментов были строго соблюдены все требования Европейской конвенции “О защите позвоночных животных, используемых для экспериментальных или иных научных целей” (Страс-

Таблица 1
Влияние гидразида III на время иммобилизации и индекс депрессивности (ИД) мышей

Группа	Иммобилизация		ИД (FST), Ме [25 %; 75 %]
	(TST), Ме [25 %; 75 %]	(FST), Ме [25 %; 75 %]	
Контроль <i>n</i> = 30	110 [67; 131]	195 [175; 217]	0,97 [0,8; 1,4]
Флуоксетин <i>n</i> = 16 (10 мг/кг)	157 [57; 183]	133 [71; 195]	0,63 * [0,34; 0,69]
Гидразид III (35 мг/кг) <i>n</i> = 16	106 [56; 119]	168 [127; 202]	0,69 * [0,57; 0,81]
Гидразид III (23 мг/кг) <i>n</i> = 16	68 [43; 154]	165 [154; 198]	0,75* [0,5; 1]
Гидразид III (12 мг/кг) <i>n</i> = 16	33* [13; 68]	181 [158; 214]	0,41* [0,23; 0,58]
Гидразид III (7,8-мг/кг) <i>n</i> = 16	136 [108; 137]	174 [148; 200]	0,55* [0,47; 0,67]
Гидразид III (3,7 мг/кг) <i>n</i> = 16	148 [98; 158]	178 [167; 206]	0,58 * [0,47; 0,79]
Гидразид III (1,85 мг/кг) <i>n</i> = 16	68 [63; 111]	172 * [160; 191]	0,67 * [0,54; 0,83]
Гидразид III (0,97 мг/кг) <i>n</i> = 16	50* [40; 54]	151* [117; 165]	0,56* [0,45; 0,68]

* Отличия достоверны по сравнению с контролем ($p < 0,05$ для U -критерия Манна – Уитни).

Таблица 2
Влияние гидразида III на параметры индивидуального поведения мышей

Группа	Двигательная активность	Вход в центр	Ориентировочно-исследовательская активность
Гидразид III (35 мг/кг) <i>n</i> = 16	74 [60; 104]	7,5 [5,5; 12]	29 [20; 34]
Гидразид III (23 мг/кг) <i>n</i> = 16	84 [69; 87]	10 [5; 14]	28 [22; 33]
Гидразид III (12 мг/кг) <i>n</i> = 16	88 [75; 92]	16 [10; 17]	36 [27; 35]
Гидразид III (7,8 мг/кг) <i>n</i> = 16	72 [58; 82]	12 [3; 16]	28 [48; 40]
Гидразид III (3,7 мг/кг) <i>n</i> = 16	65 [41; 93]	14 [5; 20]	32 [22; 45]
Гидразид III (1,85 мг/кг) <i>n</i> = 16	88 [59; 102]	11 [7; 13]	33 [17; 37]
Гидразид III (0,97 мг/кг) <i>n</i> = 16	62 [43; 78]	10 [4; 13]	22 [15; 29]

* Отличия достоверны по сравнению с контролем ($p < 0,05$ для U -критерия Манна – Уитни).

бург, 1986 г.) и Федерального закона Российской Федерации “О защите животных от жестокого обращения” от 01.01.1997 г. Учитывая биологические ритмы, описанные в работах ряда авторов [4, 5], опыты проводились с 12.00 до 18.00.

Исследуемое соединение вводили внутривентриально в виде суспензии за 30 мин до эксперимента. Контрольная группа получала эквивалентное количество изотонического раствора. Острую токсичность гидразиды III определяли при однократном внутривентриальном введении в диапазоне доз от 100 до 1000 мг/кг. Контрольные и опытные группы наблюдались в течение первых суток непрерывно, далее на протяжении 14 сут — 1 раз в день. Для регистрации картины интоксикации учитывали общее состояние, поведенческие реакции, время возникновения и характер судорог и сроки гибели животных. Далее устанавливали зависимость доли погибших животных (%) от дозы испытуемого вещества. Для расчета ЛД₅₀ использовали метод Литчфилда и Уилкоксона [6].

Для изучения антидепрессивной активности использовали 2 классических теста: “подвешивание за хвост” (TST) и “принудительное плавание” в модификации Е. В. Щетинина (FST) [7–9]. Гидразид III вводили в дозах 35, 23, 12, 7,8, 3,7, 1,85 и 0,97 мг/кг (1/20, 1/30, 1/60, 1/90, 1/180, 1/360, 1/720 от ЛД₅₀ соответственно). В качестве препарата позитивного контроля служил флуоксетин в дозе 10 мг/кг (Флуоксетин-Ланнахер, капсулы по 0,02, Ланнахер Хайльмиттель).

Для характеристики антидепрессивного эффекта оценивали время иммобилизации (ИМ TST, ИМ FST) и индекс депрессивности (ИД FST). Визуальную оценку поведения животных проводили с использованием программы “BrainTest”, разработанной на кафедре фармакологии № 1 с курсом клинической фармакологии БГМУ [10].

Для достоверной дифференциации антидепрессивной активности от психостимулирующего использовали тест “открытое поле” (ОП) [11, 12]. В течение 3 мин регистрировали параметры индивидуального поведения. По увеличению и уменьшению двигательной и ориентировочно-исследовательской активности делали вывод о психостимулирующем или психоседативном действии.

Статистический анализ проводили с помощью программы Statistica 6.1, используя непараметрические *U*-критерий Манна – Уитни и *H*-критерий Крускала – Уоллиса. Отличия считали достоверными при $p < 0,05$ [13].

Результаты и их обсуждение

После однократного внутривентриального введения гидразиды III опытным группам животных в диапазоне доз от 100 до 1000 мг/кг, отмечалась однотипная клиническая картина интоксикации. Животные умирали в первые часы после введения изучаемого вещества. Вначале интоксикация выражалась в повышении двигательной активности, актов и длительности грумин-

га, вертикальном положении хвоста, учащении частоты сердечных сокращений, дыхания, а затем животные умирали при клонико-тонических судорогах. У оставшихся в живых животных признаки отравления исчезали к концу первых суток. ЛД₅₀ гидразиды III составила 700 мг/кг. Таким образом, в соответствии с классификацией токсичности веществ при введении под кожу и брюшную полость животного по К. К. Сидорову вещество относится к 4 классу токсичности, т.е. является малотоксичным.

В TST (табл. 1) в группах животных, получивших однократную инъекцию III в дозах 12 и 0,97 мг/кг, статистически значимо на 70 и 54 % снижалось время иммобилизации по сравнению с контролем.

В FST (табл. 1) соединение III во всех исследуемых дозах (35, 23, 12, 7,8, 3,7, 1,85 и 0,97 мг/кг) статистически значимо снижал ИД (на 28, 23, 57, 43, 40, 31 и 43 % соответственно), а в дозах 1,85 и 0,97 мг/кг — также время иммобилизации (на 23 и 12 % соответственно) по сравнению с контролем.

При этом гидразид III в дозе 12 мг/кг проявил максимальную антидепрессивную активность, снижая ИД на 57 % по сравнению с контролем, в то время как флуоксетин снижал ИД на 32 %. Так же нужно отметить, что гидразид III уже в минимальной изучаемой дозе 0,97 мг/кг снижало ИД на 43 % по сравнению с контролем, что может свидетельствовать о высокой активности молекулы.

В тесте ОП (табл. 2) параметры индивидуального поведения опытных животных оставались на уровне контрольных значений. Полученные результаты позволяют сделать вывод, что снижение времени иммобилизации обусловлено не психостимулирующим, а антидепрессивным действием гидразиды III.

Таким образом, по усовершенствованной нами методике в 2 стадии синтезирован гидразид III. Определена ЛД₅₀ гидразиды III, которая для белых беспородных мышей составляет 700 мг/кг. Следовательно, вещество относится к малотоксичным соединениям. В тестах “подвешивание за хвост” и “принудительное плавание” выявлена антидепрессивная активность гидразиды III, сопоставимая с препаратом сравнения флуоксетином.

ЛИТЕРАТУРА

1. М. Д. Машковский, *Лекарственные средства*, Новая волна, Москва (2008), сс. 124 – 419.
2. Д. З. Муратаев, Ю. В. Шабалина, Ф. А. Халиуллин, *Башкирский хим. ж.*, **19**(1), 220 – 222 (2012).
3. Ф. А. Халиуллин, Д. З. Муратаев, Ю. В. Шабалина, *Башкирский хим. ж.*, **18**(3), 58 – 59 (2011).
4. Л. А. Валеева, О. Ю. Годоражи, *Мед. вестник Башкортостана*, **4**(2), 186 – 188 (2009).
5. Э. М. Нурғалина, Л. А. Валеева, *Психофармакол. биол. наркол.*, **8**(1 – 2 – 2), 2372 – 2373 (2008).
6. М. А. Беленький, *Элементы количественной оценки фармакологического эффекта*, Медгиз, Ленинград (1963), сс. 81 – 95.
7. Е. В. Щетинин, В. А. Батулин, Э. Б. Арушанян и др., *Ж. высш. нервной деятельности*, **5**, 958 – 964 (1989).

8. Руководство по проведению доклинических исследований лекарственных средств, часть 1, Миронов А. Н. (ред.), Министерство здравоохранения и социального развития РФ, ФГБУ "Научный центр экспертизы средств медицинского применения, Москва (2012).
9. L. Steru, R. Chermat, B. Thierry, et al., *Psychopharmacology (Berl.)*, **85**(3), 367 – 370 (1985).
10. Программа для ЭВМ Braintest, Габидуллин Р. А., Никитина И. Л., Иванова О. А., Алехин Е. К., Свидетельство о государственной регистрации программы для ЭВМ № 2008610170.
11. В. Я. Гельман, С. И. Кременевская, *Физиол. ж. СССР*, **76**(4), 553 – 556 (1990).
12. Я. Буреш, О. Бурешова, Д. П. Хьюстон, *Методики и основные эксперименты по изучению мозга и поведения*, Высшая школа, Москва (1991), сс. 119 – 122.
13. Р. Х. Хафизьянова, И. М. Бурькин, Г. Н. Галеева, *Математическая статистика в экспериментальной и клинической фармакологии*, Медицина, Казань (2006), сс. 125 – 140.

Поступила 10.12.15

SYNTHESIS AND ANTIDEPRESSANT PROPERTIES OF 2-[3-METHYL-7-(THIETANYL-3)-1-ETHYLXANTHINYL-8-THIO]ACETIC ACID HYDRAZIDES

L. A. Valeeva*, G. G. Davlyatova, Yu. V. Shabalina, A. V. Isakova, F. A. Khaliullin, and I. L. Nikitina

Bashkir State Medical University, Ufa, Bashkortostan, 450000 Russia

* e-mail: bsmu.pharmacology2@yandex.ru

Hydrazide of 2-[3-methyl-7-(3-thietanyl)-1-ethylxanthinyl-8-thio]acetic acid has been synthesized according to modified two-stage methodology. A reaction of 2-[3-methyl-7-(3-thiethanyl)-1-ethylxanthinyl-8-thio]acetic acid and ethyl alcohol in the presence of thionyl chloride was used to obtain ethyl ether of 2-[3-methyl-7-(3-thiethanyl)-1-ethylxanthinyl-8-thio]acetic acid, which interacted with hydrazine hydrate in the presence of ethyl alcohol to yield hydrazide of 2-[3-methyl-7-(3-thiethanyl)-1-ethylxanthinyl-8-thio]acetic acid. The structures of synthesized compounds have been confirmed by IR and NMR spectroscopy techniques. The acute toxicity of the synthesized hydrazide was studied on outbred albino mice and the LD50 was estimated at 700 mg/kg. Using the tail suspension test and forced swim test, it was found that 2-[3-methyl-7-(3-thiethanyl)-1-ethylxanthinyl-8-thio]acetic acid hydrazide produced antidepressant effect that was most expressed at a dose of 12 mg/kg.

Keywords: xanthines; thiethanes; hydrazides; acute toxicity; antidepressant effect; mice.