

© Коллектив авторов, 2007

Р. М. Кондратенко¹, Л. А. Балтина², Л. С. Громакова¹, Л. А. Балтина^{1, 2},
Л. М. Халилов², Х. М. Насыров¹, Г. А. Толстиков²

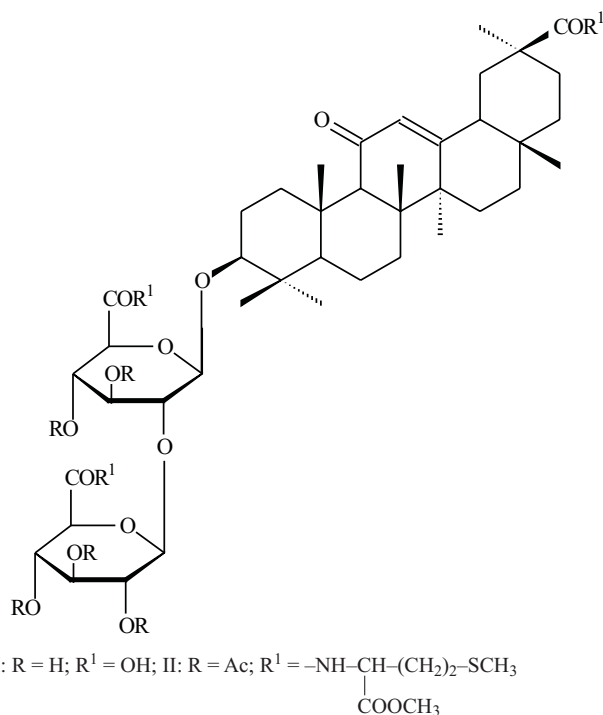
ПРОТИВОВОСПАЛИТЕЛЬНАЯ И ПРОТИВОЯЗВЕННАЯ АКТИВНОСТЬ КОНЬЮГАТА ПЕНТА-О-АЦЕТИЛГЛИЦИРРИЗИНОВОЙ КИСЛОТЫ С МЕТИЛОВЫМ ЭФИРОМ МЕТИОНИНА

¹ Башкирский государственный медицинский университет;

² Институт органической химии Уфимского научного центра РАН

Изучены фармакологические свойства конъюгата пента-О-ацетилглицирризиновой кислоты с метиловым эфиром метионина. Противовоспалительная (ПВ) активность оценивалась на моделях воспаления лапок мышей и крыс, вызванных формалином, термическим воздействием, агаром Дифка, трипсином, гистамином и брадикинином в сравнении с глицирризиновой кислотой (I), бутадионом и преднизолоном. Установлено, что данное соединение обладает выраженным ПВ действием, превосходящим активность I. ПВ активность конъюгата сочетается с высоким противоязвенным (ПЯ) действием, превосходящим активность I. Конъюгат способствует заживлению как острых (гистаминовых и серотониновых), так и хронических (резерпиновых и уксуснокислых) язв слизистой оболочки желудка крыс и является малотоксичным веществом.

Глицирризиновая кислота (I) — основной сапонин экстракта корней солодки голой (*Glycyrrhiza glabra* L.) и уральской (*Glycyrrhiza uralensis* Fisher) (*Leguminosae*) характеризуется широким спектром фармакологической активности (противовоспалительными, противоязвенными, антидотными, антиоксидантными, антиаллергическими, противовирусными свойствами) [1].



Ранее нами был осуществлен синтез ряда производных I, содержащих фрагменты аминокислот и их эфиров, среди которых были найдены соединения с противовоспалительными и противоязвенными свойствами

[2, 3]. В продолжение этих работ мы осуществили синтез и изучили фармакологические свойства конъюгата пента-О-ацетилглицирризиновой кислоты с метиловым эфиром метионина формулы II.

Конъюгат II синтезировали по методике [2] взаимодействием трихлорангидрида пента-О-ацетилглицирризиновой кислоты с гидрохлоридом метилового эфира D,L-метионина в среде сухого хлористого метилена в присутствии триэтиламина при комнатной температуре, выход 57 % после хроматографической очистки на силикагелевой колонке. Структура полученного соединения подтверждена ИК, УФ и ПМР-спектрами и элементным анализом.

Экспериментальная фармакологическая часть

Острую токсичность (ЛД₅₀) конъюгата II при введении в желудок определяли на белых беспородных мышях массой 18 – 20 г по методу Литчфилда-Уилкоксона [4].

Противовоспалительную активность конъюгата II в сравнении с эффектом I, бутадиона и преднизолона изучали на моделях воспаления лапок мышей массой 18 – 20 г и крыс массой 180 – 200 г, вызванных 3 % раствором формалина, термическим воздействием, агаром Дифка, 0,25 % раствором трипсина, 0,1 % раствором гистамина и 0,005 % раствором брадикинина.

Формалиновое, гистаминовое и брадикининовое воспаление вызывали у крыс согласно [5], субплантарным введением 0,05 мл флоггена. Агар Дифка вводили субплантарно в той же дозе мышам. Конъюгат II вводили в желудок в дозах 240 мг/кг (1/15 от ЛД₅₀) и 100 мг/кг, I — в дозе 100 мг/кг [6], преднизолон и бутадион — в лечебных дозах за 2 ч до моделирования

Противовоспалительное действие конъюгата пента-О-ацетилглицирризиновой кислоты с метиловым эфиром метионина (II) на формалиновой модели воспаления у крыс

Соединение, доза	Средний прирост воспаленной лапки онкометрически (мл) через						
	1 ч	3 ч	6 ч	12 ч	24 ч	48 ч	72 ч
Конъюгат II, 240 мг/кг (n = 7)	0,50 ± 0,04 <i>p</i> < 0,001*	0,33 ± 0,05 <i>p</i> < 0,001	0,33 ± 0,05 <i>p</i> < 0,05	0,10 ± 0,02 <i>p</i> < 0,001	0,06 ± 0,02 <i>p</i> < 0,001	0	0
I, 100 мг/кг (n = 7)	0,52 ± 0,05 <i>p</i> < 0,05	0,38 ± 0,04 <i>p</i> < 0,05	0,35 ± 0,05 <i>p</i> < 0,05	0,25 ± 0,04 <i>p</i> < 0,05	0,16 ± 0,06 <i>p</i> < 0,05	0,10 ± 0,04 <i>p</i> < 0,05	0
Бутадион, 25 мг/кг (n = 7)	0,39 ± 0,04 <i>p</i> < 0,01	0,21 ± 0,04 <i>p</i> < 0,001	0,10 ± 0,02 <i>p</i> < 0,001	0	0	0	0
Преднизолон, 10 мг/кг (n = 7)	0,45 ± 0,06 <i>p</i> < 0,001	0,36 ± 0,05 <i>p</i> < 0,001	0,38 ± 0,04 <i>p</i> < 0,05	0,18 ± 0,06 <i>p</i> < 0,001	0,18 ± 0,05 <i>p</i> < 0,05	0,08 ± 0,02 <i>p</i> < 0,05	0
Контроль (физиологический раствор) (n = 7)	0,80 ± 0,09	0,76 ± 0,10	0,66 ± 0,10	0,48 ± 0,06	0,48 ± 0,09	0,18 ± 0,05	0

* по сравнению с контролем

Противовоспалительное действие конъюгата пента-О-ацетилглицирризиновой кислоты с метиловым эфиром метионина (II) на гистаминовой модели воспаления у крыс

Соединение и доза	Объем лапки (в мл) через:				
	1 ч	3 ч	6 ч	12 ч	24 ч
Конъюгат II, 100 мг/кг (n = 8)	0,41 ± 0,03 <i>p</i> < 0,001*	0,41 ± 0,07 <i>p</i> < 0,001	0,12 ± 0,02 <i>p</i> < 0,001	0,12 ± 0,03 <i>p</i> < 0,001	0,02 ± 0,01 <i>p</i> ≥ 0,05
I, 100 мг/кг (n = 8)	0,40 ± 0,05 <i>p</i> < 0,001	0,31 ± 0,03 <i>p</i> < 0,001	0,15 ± 0,02 <i>p</i> < 0,001	0,12 ± 0,03 <i>p</i> < 0,001	0,02 ± 0,01 <i>p</i> < 0,05
Бутадион, 12,5 мг/кг (n = 8)	0,43 ± 0,13 <i>p</i> < 0,05	0,16 ± 0,07 <i>p</i> < 0,001	0,08 ± 0,08 <i>p</i> < 0,001	0	0
Преднизолон, 10 мг/кг (n = 8)	0,21 ± 0,05 <i>p</i> < 0,001	0,13 ± 0,03 <i>p</i> < 0,001	0,08 ± 0,03 <i>p</i> < 0,001	0,11 ± 0,03 <i>p</i> < 0,001	0
Контроль (физиологический раствор) (n = 8)	0,71 ± 0,08	0,90 ± 0,11	0,76 ± 0,07	0,44 ± 0,17	0,23 ± 0,01

* по сравнению с контролем

отека, контрольная группа животных получала физиологический раствор (0,1 мл/10 г). Величину отека регистрировали онкометрически в динамике через

30 мин, 1, 3, 6, 12, 24, 48 и 72 ч после введения флогена.

Термический ожог (модель асептического воспаления) вызывали погружением задней лапки мышей на 10 с в воду, нагретую до 55 °С. О противовоспалительной активности исследуемых препаратов судили по разнице массы обожженной и здоровой лапки.

Таблица 3

Противовоспалительное действие конъюгата пента-О-ацетилглицирризиновой кислоты с метиловым эфиром метионина (II) на брадикининовой модели воспаления у крыс

Соединение, доза	Объем лапки (в мл) через:		
	0,5 ч	2 ч	6 ч
Конъюгат II, 100 мг/кг (n = 8)	0,21 ± 0,03 <i>p</i> < 0,001*	0,12 ± 0,04 <i>p</i> < 0,05	0,04 ± 0,01 <i>p</i> < 0,001
I, 100 мг/кг (n = 8)	0,20 ± 0,04 <i>p</i> < 0,001	0,17 ± 0,04	0,06 ± 0,03 <i>p</i> < 0,001
Бутадион, 15 мг/кг (n = 8)	0,33 ± 0,07	0,27 ± 0,03	0,16 ± 0,04
Преднизолон, 10 мг/кг (n = 8)	0,41 ± 0,03	0,18 ± 0,04	0,09 ± 0,01 <i>p</i> < 0,001
Контроль (физиологический раствор) (n = 8)	0,48 ± 0,04	0,30 ± 0,06	0,28 ± 0,09

* по сравнению с контролем

Антитрипсиновое действие конъюгата II определяли по разнице массы воспаленной и здоровой лапки мышей через 2 сут после субплантарного введения 0,05 мл раствора трипсина. За 2 ч до введения трипсина и далее каждые сутки вводили в желудок конъюгат II, а также I в дозе 100 мг/кг, преднизолон — 10 мг/кг, бутадион — 25 мг/кг.

Противоязвенную активность конъюгата II изучали на крысах на моделях острых и хронических язв. Моделями острых язв служили гистаминовые и серотониновые язвы и язвы, вызванные перевязкой пилорического отдела желудка.

Гистаминовые и серотониновые язвы вызывали у крыс путем однократного внутрибрюшинного введения свежеприготовленных растворов гистамина в дозе 30 мг/кг и серотонина 0,1 % в дозе 10 мг/кг [7]. За 2 ч

Таблица 4
Противовоспалительное действие конъюгата пента-О-ацетилглицерризиновой кислоты с метиловым эфиром метионина (II) на термической модели воспаления у мышей

Соединение	Доза, мг/кг	Средний прирост массы обожженной лапки, мг	Уровень значимости, P
Конъюгат II (n = 6)	100	58,00 ± 3,05	< 0,05
	150	50,00 ± 2,24	< 0,001
I (n = 6)	100	51,00 ± 4,62	< 0,001
Бутадион (n = 6)	25	45,60 ± 4,19	< 0,001
	20	44,00 ± 2,28	< 0,001
	12,5	67,00 ± 6,32	> 0,05
Преднизолон (n = 6)	10	67,00 ± 7,20	> 0,05
Контроль (физиологический раствор) (n = 6)	0,1 мл/10г	77,00 ± 2,24	

до введения гистамина и серотонина животные однократно получили внутрь соединение II или I в дозе 200 мг/кг.

Влияние конъюгата II на возникновение язв, вызванных перевязкой пилорического отдела желудка крыс, изучали после предварительной лапаротомии под хлороформным наркозом. До перевязки пилорического отдела животные получали внутрь в течение 2 дней соединение II в дозе 200 мг/кг. Через 24 ч после перевязки пилоруса животных забивали и изучали

Таблица 5
Противовоспалительное действие конъюгата пента-О-ацетилглицерризиновой кислоты с метиловым эфиром метионина (II) на модели воспаления, вызванного трипсином, у мышей

Соединение, доза	Средний прирост массы лапки, мг	Уровень значимости, p
Конъюгат II, 100 мг/кг (n = 8)	24,6 ± 5,2	< 0,05
I, 100 мг/кг (n = 8)	27,3 ± 3,2	< 0,05
Бутадион, 25 мг/кг (n = 8)	27,5 ± 3,5	< 0,05
Преднизолон, 10 мг/кг (n = 8)	62,2 ± 6,5	–
Контроль (физиологический раствор) (n = 8)	53,8 ± 10,7	–

слизистую оболочку желудка, подсчитывая число язв визуально.

В качестве моделей хронических язв были выбраны резерпиновые и уксуснокислые язвы [8].

Резерпиновые язвы у крыс вызывали внутрибрюшинным введением 2 мг/кг резерпина в течение 3 дней. Животные в последующем ежедневно получали внутрижелудочно конъюгат II или I в дозе 200 мг/кг, контрольная группа — физиологический раствор. Далее животные вскрывались через 3, 7, 15 и 20 дней.

Следующей моделью хронических язв служили язвы, вызванные однократным введением в подсерозный слой желудка 0,05 мл 5 % раствора уксусной кислоты. Конъюгат II в последующем ежедневно вводили

Таблица 6
Противовоспалительное действие конъюгата пента-О-ацетилглицерризиновой кислоты с метиловым эфиром метионина (II) на модели воспаления, вызванного агаром Дифка, у мышей

Соединение и доза	Объем лапки (в мл) через:				
	0,5 ч	2 ч	6 ч	24 ч	48 ч
Конъюгат II, 100 мг/кг (n = 8)	0,20 ± 0,03 <i>p</i> < 0,001*	0,20 ± 0,03 <i>p</i> < 0,001	0,20 ± 0,03 <i>p</i> < 0,001	0,04 ± 0,002 <i>p</i> < 0,001	–
Бутадион, 12,5 мг/кг (n = 8)	0,32 ± 0,05 <i>p</i> < 0,001	0,31 ± 0,03 <i>p</i> < 0,001	0,22 ± 0,03 <i>p</i> < 0,001	0,22 ± 0,03 <i>p</i> < 0,001	–
Преднизолон, 10 мг/кг (n = 8)	0,20 ± 0,04 <i>p</i> < 0,001	0,29 ± 0,05 <i>p</i> < 0,001	0,22 ± 0,24 <i>p</i> < 0,001	0,05 ± 0,002 <i>p</i> < 0,001	–
Контроль (физиологический раствор) (n = 8)	0,42 ± 0,01	0,55 ± 0,04	0,40 ± 0,03	0,27 ± 0,03	0,09 ± 0,01

* по сравнению с контролем

Таблица 7
Защитное действие конъюгата пента-О-ацетилглицерризиновой кислоты с метиловым эфиром метионина (II) на моделях язв желудка, вызванных гистамином и серотонином у крыс

Соединение, доза	Гистаминовые язвы		Серотониновые язвы	
	Количество язв	Число крыс с язвами / число крыс в группе	Количество язв	Число крыс с язвами / число крыс в группе
Конъюгат II, 200 мг/кг	2,8 ± 0,3	5/10	2,2 ± 0,5	4/1
I, 200 мг/кг	4,4 ± 0,1	6/10	4,8 ± 0,8	6/10
Контроль (физиологический раствор)	11,0 ± 1,6	10/10	9,6 ± 1,4	10/10

Таблица 8
Защитное действие конъюгата пента-О-ацетилглицирризиновой кислоты с метиловым эфиром метионина (II) на модели язв, вызванных перевязкой пилорического отдела желудка у крыс

Соединение, доза	Количество язв		
	мелких	больших	всего
Конъюгат II, 200 мг/кг (n = 7)	8,0 ± 1,9 <i>p</i> ≤ 0,05*	0,9 ± 0,5 <i>p</i> ≤ 0,05	9,0 ± 2,05 <i>p</i> ≤ 0,05
Контроль (физиологический раствор) (n = 7)	17,3 ± 4,0	2,7 ± 0,7	20,0 ± 4,8

* по сравнению с контролем

в желудок в дозе 200 мг/кг, контрольная группа животных получала физиологический раствор. Животные вскрывались через 3, 7, 12 и 20 дней.

ЛД₅₀ конъюгата II при введении в желудок составляет 3600 мг/кг, что позволяет отнести это соединение к малотоксичным веществам [9].

На формалиновой модели воспаления конъюгат II по противовоспалительному действию (к 24 ч) активнее преднизолона (*p* < 0,05) и соединения I (*p* < 0,05), но уступает по действию бутадииону (табл. 1).

Соединение II достоверно уменьшает гистаминовый отек аналогично действию I, хотя по эффективности уступает преднизолону и бутадииону (табл. 2).

На моделях воспаления, вызванных брадикинином (табл. 3), термическим ожогом (табл. 4), трипсином (табл. 5), конъюгат II проявляет максимальный противовоспалительный эффект, сравнимый с соединением I, при этом преднизолон уступает по действию соединению II.

Защитное действие конъюгата II на модели воспаления, вызванного агаром Дифка, сходно с таковым преднизолона и более выражено, чем у бутадииона (табл. 6).

Опыты показали, что конъюгат II в дозе 200 мг/кг, как было описано ранее для I [6], обладает выраженным противоязвенным действием на моделях язвенных поражений, вызванных гистамином и серотонином (табл. 7).

Таблица 9
Защитное действие конъюгата пента-О-ацетилглицирризиновой кислоты с метиловым эфиром метионина (II) на резерпиновой модели язв желудка у крыс

Соединение, доза	Дни исследований							
	3 день		7 день		5 день		20 день	
	Кол-во язв	Число крыс с язвами / число крыс в группе	Кол-во язв	Число крыс с язвами / число крыс в группе	Кол-во язв	Число крыс с язвами / число крыс в группе	Кол-во язв	Число крыс с язвами / число крыс в группе
Конъюгат II, 200 мг/кг	5,2 ± 0,4	3/6	0	0/6	0	0/6	0	0/6
I, 200 мг/кг	8,3 ± 0,8	4/6	4,7 ± 0,8	2/6	0	0/6	0	0/6
Контроль (физиологический раствор)	18,0 ± 1,6	6/6	16,8 ± 2,0	6/6	15,6 ± 1,9	6/6	13,2 ± 2,3	5/6

Таблица 10
Защитное действие конъюгата пента-О-ацетилглицирризиновой кислоты с метиловым эфиром метионина (II) на уксуснокислой модели язв желудка у крыс

Соединение, доза	Среднее количество язв			
	3-й день	7-й день	12-й день	20-й день
Конъюгат II, 200 мг/кг (n = 6)	6,1 ± 1,5 <i>p</i> < 0,05*	6,4 ± 1,2 <i>p</i> < 0,05	2,6 ± 0,1 <i>p</i> < 0,05	0,60 ± 0,02 <i>p</i> < 0,05
Контроль (n = 5)	11,2 ± 1,3 <i>p</i> < 0,05	7,0 ± 1,3 <i>p</i> < 0,05	4,3 ± 1,1 <i>p</i> < 0,05	1,9 ± 0,7 <i>p</i> < 0,05

* по сравнению с контролем

Предварительное введение в желудок конъюгата II способствовало уменьшению количества как больших, так и малых язв желудка у крыс, вызванных перевязкой пилоруса (табл. 8).

Конъюгат II, подобно соединению I, оказывает выраженное противоязвенное действие на модели резерпиновых язв (табл. 9).

На модели уксуснокислых язв желудка конъюгат II также проявляет противоязвенное действие (табл. 10), начиная с 3-го дня после вызывания язв. К 20-му дню в группе животных, получавших соединение II, язвы обнаруживались только у одной особи из 6, в то время как в контрольной группе язвы сохранялись у 4 животных из 6.

На основании полученных данных можно заключить, что конъюгат II обладает противовоспалительным и противоязвенным действием, превосходящим в ряде случаев активность соединения I.

Экспериментальная химическая часть

Синтез трипептида пента-О-ацетилглицирризиновой кислоты с метиловым эфиром метионина II. К раствору 8,9 г (0,008 моль) трихлорангидрида пента-О-ацетилглицирризиновой кислоты в 350 мл сухого CH₂Cl₂ при перемешивании без доступа влаги прибавляют 7,6 г (0,038 моль) гидрохлорида метилового эфира метионина, 9,5 мл сухого триэтиламина и выдерживают с периодическим перемешиванием при 20 – 22 °С 48 ч. Реакционную смесь промывают 5 %

соляной кислотой, водой, раствором Na_2CO_3 , водой и сушат MgSO_4 . Упариванием растворителя в вакууме получают 10,9 г сырого конъюгата II, который хроматографируют на колонке с силикагелем, элюируя хлороформом и смесью хлороформа – этанола, 50:1 (v/v). Хроматографически однородные фракции с $R_f = 0,64$ (CHCl_3 –EtOH, 7:1) объединяют и получают 7,2 г (57 %) целевого продукта II, который перекристаллизовывают из водного EtOH. Т. пл. 140 – 142 °С (с разл.); $[\alpha]_D^{20} + 32^\circ$ (с 0,03; CHCl_3). ИК-спектр, ν_{max} , cm^{-1} (вазелиновое масло): 3500 – 3300 (NH); 1690; 1525; 1240 (KONH); 1665 (C=O); 1750 (COOR); 1310 (SCH_3). ПМР-спектр (100 МГц, CDCl_3 , δ , м. д.): 0,8 – 1,3 (все с, 21H, 7 CH_3); 1,9 – 2,0 (все с, 15H, 5Ac); 3,7 (с, 3H, COOCH₃); 5,56 (с, 1H, =C¹²-H); 4,0 – 5,3 (м, 1H, H1', H1'', H2', H2'', H3', H3'', H4', H4'', H5', H5''). $\text{C}_{70}\text{H}_{105}\text{N}_3\text{O}_{24}\text{S}_3$.

Работа выполнена при финансовой поддержке гранта Президента РФ № НШ 1488.2003.3

ЛИТЕРАТУРА

1. Г. А. Толстикова, Л. А. Балтина, Э. Э. Шульц, А. Г. Покровский, *Биоорганическая химия*, **23**(9), 691 – 709 (1997).
2. Л. А. Балтина, В. А. Давыдова, И. Г. Чикаева и др., *Хим.-фарм. журн.*, **22**(6), 694 – 697 (1988).
3. В. А. Давыдова, Ф. С. Зарудий, Л. А. Балтина и др., *Хим.-фарм. журн.*, **29**(1), 41 – 44 (1995).
4. М. Л. Беленький, *Элементы количественной оценки фармакологического эффекта*, Ленинград (1963), с. 152.
5. Ф. П. Тринус, Н. А. Мохорт, Б. М. Клебанов, *Нестероидные противовоспалительные средства*, Здоров'я, Киев (1975), сс. 204 – 216.
6. Л. А. Балтина, Р. М. Кондратенко, С. Р. Мустафина и др., *Хим.-фарм. журн.*, **35**(1), 38 – 41 (2001).
7. С. В. Аничков, И. С. Заводская, *Фармакотерапия язвенной болезни*, Ленинград, Медицина (1965), с. 187.
8. А. А. Никулин, С. И. Буданцева, *Фармакол. и токсикол.*, **36**(5), 564 – 567 (1973).
9. И. Ф. Измеров, И. В. Саноцкий, Л. Л. Сидоров, *Параметры токсикометрии промышленных ядов при однократном воздействии*, Москва (1977).

Поступила 04.11.04

ANTIINFLAMMATORY AND ANTIULCER ACTIVITY OF A PENTA-O-ACETYLGLYCYRRHIZIC ACID CONJUGATE WITH METHIONINE METHYL ESTER

R. M. Kondratenko¹, L. A. Baltina², L. S. Gromakova¹, L. A. Baltina^{1,2}, L. M. Khalilov², Kh. M. Nasyrov¹, and G. A. Tolstikov²

¹ Bashkir State Medical University, Ufa, Bashkortostan, Russia;

² Institute of Organic Chemistry, Ufa Scientific Center, Russian Academy of Sciences, Ufa, Bashkortostan, Russia

Pharmacological properties of a penta-O-acetylglycyrrhizic acid conjugate with methionine methyl ester have been studied. The antiinflammatory (AA) activity was estimated on the inflammation models in mice and rats induced by formalin, thermal action, Difco agar, trypsin, histamine, and bradykinin in comparison to glycyrrhizic Acid (GA), butadion, and prednizolone. It is established that the conjugated compound possesses a pronounced AA activity, being more active in comparison to GA. The new compound combines AA activity with a high antiulcer action, which is also more pronounced than that GA. The conjugate ensures the healing of both acute (histamine and serotonin models) and chronic (reserpine and acetic acid models) in rat stomach mucosa and is a low-toxicity compound.