

О.М. Щербак<sup>1</sup>, І.Д. Андреева<sup>1</sup>, В.В. Казмірчук<sup>1</sup>, М.С. Погоріла<sup>1</sup>, Л.Т. Бойко<sup>2</sup>

## Дослідження гострої токсичності нових похідних 4Н-піридо [4',3':5,6]пірано [2,3-d]піримідину

<sup>1</sup>ДУ «Інститут мікробіології та імунології ім. І.І. Мечникова НАМН України», м. Харків,<sup>2</sup>Харківська медична академія післядипломної освіти

**Ключові слова:** похідні  
4Н-піридо[4',3':5,6]пірано[2,3-d]  
піримідину, гостра токсичність.

**Ключевые слова:** производные  
4Н-пиридо[4',3':5,6]пирано[2,3-d]  
пиримидина, острая токсичность.

**Key words:** derivatives  
of 4H-pyrido[4',3':5,6]pyrano[2,3-d]  
pyrimidine, acute toxicity.

В експериментах на лабораторних мишах досліджено токсичні ефекти похідних 4Н-піридо[4',3':5,6]пірано[2,3-d]піримідину. Встановлено належність нових синтетичних сполук до IV класу токсичності – малотоксичні речовини. Доведено перспективність подальших токсикофармакологічних досліджень похідних 4Н-піридо[4',3':5,6]пірано[2,3-d]піримідину з метою створення на їх основі нових протимікробних лікарських засобів.

В експериментах на лабораторних мишах изучены токсические эффекты производных 4Н-пиридо[4',3':5,6]пирано[2,3-d]пиримидина. Установлено, что новые синтетические соединения относятся к IV классу токсичности – малотоксичные вещества. Доказана перспективность дальнейших токсикофармакологических исследований производных 4Н-пиридо[4',3':5,6]пирано[2,3-d]пиримидина с целью создания на их основе новых противомикробных лекарственных средств.

In experiments on mice the toxic effects of derivatives of 4H-pyrido [4',3':5,6]pyrano[2,3-d] pyrimidine were examined. It is established that the new synthetic compounds belong to the IV class of toxicity - low-toxic substances. The perspectives for further toxicological and pharmacological studies of derivatives of 4H-pyrido[4',3':5,6]pyrano[2,3-d]pyrimidine to provide a new antimicrobial drugs on their basis was proved.

Лікування та профілактика інфекційних і гнійно-запальних захворювань є одним з пріоритетних напрямків у більшості країн світу [1,2]. Провідна роль у лікуванні інфекцій належить антибіотикам [1,3], але їх широке застосування призводить до появи антибіотикостійких патогенів. В умовах розповсюдження антибіотикорезистентності актуальним стає пошук принципово нових антибактеріальних засобів [4]. Попередніми дослідженнями доведено, що перспективними у плані пошуку високоактивних речовин з протимікробними властивостями є синтетичні конденсовані нітрогеновмісні сполуки з піримідиновим фрагментом, зокрема, нові похідні 4Н-піридо [4',3':5,6] пірано[2,3-d] піримідину [5].

У зв'язку зі збільшенням кількості лікарських засобів та їх високою активністю, що може супроводжуватись виникненням різних за проявом і ступенем тяжкості побічних реакцій, постає проблема дослідження безпеки потенційних ліків [6,7]. Однією з вимог до потенційних лікарських засобів є співвідношення між їх ефективністю та токсичністю [8]. Більшість небажаних проявів можна передбачити, виходячи з експериментальних досліджень, що значною мірою дозволяють гарантувати безпечність клінічних випробувань і наступного медичного застосування нових лікарських засобів [8,9]. Вивчення безпеки потенційних ліків, зокрема гострої токсичності, є одним з найважливіших необхідних етапів розробки нових препаратів [8,10].

### Мета роботи

Визначення параметрів гострої токсичності нових похідних 4Н-піридо[4',3':5,6]пірано[2,3-d]піримідину

в експериментах *in vivo* на лабораторних тваринах (мишах) при внутрішньоочеревинному введенні.

Дослідження є фрагментом науково-дослідної роботи «Протимікробна активність нових конденсованих нітрогеновмісних сполук та перспективи створення на їх основі профілактичних і лікувальних засобів» АМН 99/2011(№ держреєстрації 0111U004733).

### Матеріали і методи дослідження

Дослідження проведено відповідно Наказу МОЗ України №944 від 14.12.2009 р. «Про затвердження порядку проведення доклінічного вивчення лікарських засобів та експертизи матеріалів доклінічного вивчення лікарських засобів» і діючих нині методичних рекомендацій [9,11].

Досліджено 4 найбільш перспективні, за нашими попередніми даними [5], похідні 4Н-піридо[4',3':5,6] пірано[2,3-d]піримідину, синтезовані на кафедрі органічної хімії Національного фармацевтичного університету МОЗ України, зокрема похідної *N*-арилацетамідів сполуки 125, похідної тіонів сполуки 133, 4-алкілсульфанілпохідної сполуки 136 і похідної ацетамідів сполуки 149. Експерименти проведено на 158 нелінійних білих мишах обох статей, масою тіла 18–22 г, віком 2–2,5 місяці, які перебували у стандартних санітарних умовах віварію ДУ «ІМІ ім. І.І. Мечникова НАМН України». Усі роботи з тваринами проводили згідно ОСТ 42 1-88 «Тварини лабораторні. Технологічний процес», з дотриманням основних положень Конвенції Ради Європи про охорону хребетних тварин, що використовуються в експериментах та з іншими науковими цілями, від 18.03.1986 р., Директиви ЄС №609 від 24.11.1986 р. і МОЗ України №281 від 01.11.2000 р.

Досліджувані речовини розчиняли у диметилсульфоксиді (ДМСО) та вводили тваринам одноразово вранці натщесерце внутрішньоочеревинно в об'ємі 0,5 мл. Головним критерієм гострої токсичності була загибель тварин. Спостереження за станом тварин, що залишились живими, проводили протягом 14 діб після введення речовин. У 1-й день експерименту тварини перебували під безперервним наглядом. Протягом спостережень враховували зовнішній стан тварин, особливості поведінки, інтенсивність і характер рухової активності, оцінювали прийом корму і води, функціонування життєво важливих органів і систем, визначали масу тварин, реєстрували терміни розвитку інтоксикації та загибелі тварин.

Дослідження гострої токсичності похідних 4Н-піридо[4',3':5,6]пірано [2,3-d]піримідину проводили у 3 етапи. На першому визначали орієнтовний діапазон середньосмертельних доз ( $LD_{50}$ ) досліджуваних речовин, розчинника ДМСО та препарату порівняння флуконазолу [8]. Експерименти першого етапу проведено на 25 мишах. Досліджувані речовини вводили у 4-х дозах, кожна наступна з яких була більша за попередню у 10 разів, тобто кожна з досліджуваних речовин вводили у наступних дозах: 1,0; 10,0; 100,0 та 1000,0 мг/кг маси тіла. Розчинник ДМСО вводили мишам у дозах 1,0; 10,0; 100,0; 1000,0 мг/кг та 10000,0 мг/кг маси тіла. Кожну дозу речовин нового синтезу, а також препарату порівняння флуконазолу та розчинника ДМСО вводили внутрішньоочеревинно одній тварині.

На другому етапі визначали  $LD_{50}$  досліджуваних речовин у першому наближенні. Дослідження 2 етапу проведено на 37 мишах. Кожну випробувану дозу речовин нового синтезу, а також препарату порівняння флуконазолу та розчинника ДМСО вводили внутрішньоочеревинно одній тварині. У ряді досліджуваних доз кожна наступна доза була більша за попередню у 1,5 рази. За орієнтовну  $LD_{50}$  приймали найменшу дозу, що викликала загибель тварин. На підставі результатів 1-го етапу досліджень обрано наступну шкалу доз нових синтетичних сполук і препарату порівняння флуконазолу: 100, 150, 225, 340, 510, 760 мг/кг маси тіла. За результатами попереднього етапу для розчинника ДМСО обрано наступну шкалу доз у межах 1000,0–10000,0 мг/кг маси тіла: 1000, 1500, 2250, 3400, 5100, 7600, 10000 мг/кг маси тіла.

На третьому етапі досліджень проводили точніше визначення параметрів гострої токсичності нових синтетичних конденсованих нітрогеновмісних сполук за допомогою табличного експрес-методу визначення середніх ефективних мір впливу на біологічні об'єкти за В.Б. Прозоровським [12], згідно з яким досліджувані речовини використовували у дозах, які розташовані за логарифмічною шкалою з інтервалом 0,1. У кожному експерименті враховували послідовність реакцій, тобто кількість тварин, що загинули при кожній наступній дозі. Згідно з отриманими послідовностями реакцій для кожної досліджуваної речовини за відповідними таблицями, в яких усі можливі вірогідні результати  $LD_{50}$  та їх помил-

ки розраховані заздалегідь за програмою пробіт-аналізу, визначали  $LD_{50}$  та їх стандартні похибки.

Експерименти 3-го етапу проведено на 96 мишах. Досліджували 4 послідовно розташовані дози по 4 спостереження на кожен дозу. Дози обирали на основі другого етапу досліджень. При визначенні параметрів гострої токсичності похідної *N*-арилацетамідів сполуки 125 і похідної тіонів сполуки 133 в експериментах використовували наступні округлені дози згідно з логарифмічною шкалою: 320, 400, 500, 630, 800 мг/кг маси тіла. Для 4-алкілсульфанілпохідної сполуки 136, похідної ацетамідів сполуки 149 та препарату порівняння флуконазолу шкала доз: 500, 630, 800, 1000 мг/кг маси тіла, для розчинника ДМСО – шкала доз 8000, 10000, 12600, 15800 мг/кг маси тіла. Визначали середньосмертельну дозу та її стандартну помилку ( $LD_{50} \pm m$ ).

### Результати та їх обговорення

Мета першого етапу дослідження гострої токсичності нових похідних 4Н-піридо[4',3':5,6]пірано[2,3-d] піримідину полягала в орієнтовному визначенні діапазону їх  $LD_{50}$ . Загибель тварин спостерігали після введення сполук і флуконазолу у дозі 1000,0 мг/кг маси тіла. У дозах 100,0 мг/кг маси тіла й менше нові речовини та препарат порівняння флуконазол не викликали загибелі тварин. Тобто, значення  $LD_{50}$  досліджуваних сполук і флуконазолу знаходилось у межах від 100,0 до 1000,0 мг/кг маси тіла.

У всіх тварин, що загинули, смерть наступала протягом першої доби. При введенні досліджуваних речовин у дозі 1000,0 мг/кг маси тіла у тварин спостерігали в'ялість, зниження рухової активності, зниження або втрату рефлексів, зниження реакції на подразники, спонтанне сечовиділення, клонічні судоми, після яких тварини гинули. Смерть тварин після введення похідної *N*-арилацетамідів сполуки 125 спостерігали через 4 години, похідної тіонів сполуки 133 – через 55 хвилин, 4-алкілсульфанілпохідної сполуки 136 – через 2,5 години та похідної ацетамідів сполуки 149 – через 6 годин.

У тварини, яка отримала флуконазол у дозі 1000,0 мг/кг маси тіла, спостерігали симптоми гострого отруєння: зниження рухомості, зменшення частоти дихання, ціаноз, птоз, сльозотечія, слинотечія, нетримання сечі, втрата рефлексів, клонічні судоми, після яких тварина загинула. Смерть миші настала через 2 години після введення флуконазолу.

Після введення розчинника ДМСО смерть тварини наставала лише у випадку, коли його вводили у дозі 10000,0 мг/кг маси тіла. У дозі 1000,0 мг/кг маси тіла розчинник не викликав загибелі тварин. Тобто значення  $LD_{50}$  розчинника ДМСО знаходилось у межах від 1000,0 до 10000,0 мг/кг маси тіла. У тварини відзначали порушення координації рухів, підвищена рефлексорна збудливість, агресія, повільне ускладнене дихання, бокове положення, клонічні судоми, після яких тварина загинула. Смерть спостерігали через 5 годин після введення 10000,0 мг/кг маси тіла ДМСО.

Тварини, що залишились живими, були активними через 6–24 години. При спостереженні протягом наступних 2-х тижнів стан тварин залишався задовільним.

У результаті 2-го етапу досліджень гострої токсичності нових речовин встановлено, що найменшою дозою похідної *N*-арилацетамідів сполуки 125 та похідної тіонів сполуки 133, що викликала загибель тварин після внутрішньоочеревинного введення, була доза 510,0 мг/кг маси тіла. У дозі 760,0 мг/кг маси тіла сполуки 125 та 133 також викликали загибель тварин. При введенні сполуки 133 у дозі 340,0 мг/кг маси тіла у тварини відзначено токсичні явища: сонливість, зменшення рухової активності, незначне порушення координації рухів, тимчасова відмова від їжі впродовж 12 годин, незначне уповільнення частоти дихання. При введенні сполуки 125 у дозі 340,0 мг/кг маси тіла у тварини спостерігали зазначені симптоми, але ступінь їх прояву був меншим. Тварини залишились живими, їх стан повернувся до норми протягом 1-ї доби. При спостереженні протягом наступних 2-х тижнів стан тварин залишався задовільним. Результати 2-го етапу досліджень гострої токсичності дозволили прийняти за  $LD_{50}$  для похідної *N*-арилацетамідів сполуки 125 та похідної тіонів сполуки 133 у першому наблизенні у мишей при внутрішньоочеревинному введенні дозу 510,0 мг/кг маси тіла.

Найменшою дозою 4-алкілсульфанілпохідної сполуки 136, похідної ацетамідів сполуки 149, а також препарату порівняння флуконазолу, що викликала загибель тварин після внутрішньоочеревинного введення, була доза 760,0 мг/кг маси тіла. Клінічна картина гострого отруєння та час загибелі тварин після введення сполук 136, 149 та флуконазолу у дозі 760,0 мг/кг маси тіла були подібними тим, що спостерігали на 1-му етапі досліджень.

При введенні зазначених речовин нового синтезу у дозі 510,0 мг/кг маси тіла у тварини спостережено токсичні явища, подібні тим, що виявили при введенні сполук 125 та 133 у дозі 340,0 мг/кг маси тіла, зокрема сонливість, кволість, незначне порушення координації рухів, тимчасова відмова від їжі протягом 6 годин.

При введенні флуконазолу у дозі 510,0 мг/кг маси тіла у тварини спостерігали мінімальні токсичні явища у вигляді зниження рухової активності, уповільнення частоти дихання, зниження рефлексів, тимчасової відмови від їжі. Тварини залишились живими, а їх стан повернувся до норми протягом 1-ї доби. При спостереженні протягом наступних 2-х тижнів стан тварин залишався задовільним.

Результати 2-го етапу досліджень гострої токсичності дозволили прийняти за  $LD_{50}$  для 4-алкілсульфанілпохідної сполуки 136, похідної ацетамідів сполуки 149 і препарату порівняння флуконазолу у першому наблизенні у мишей при внутрішньоочеревинному введенні дозу 760,0 мг/кг маси тіла. Гострий токсичний ефект досліджуваних речовин нового синтезу у мишей був мінімальним, якщо їх доза не перевищувала 340,0 мг/кг маси тіла для сполук 125 і 133, та 510,0 мг/кг маси тіла – для сполук 136, 149 та флуконазолу.

Найменшою дозою розчинника ДМСО, що викликала загибель тварини після внутрішньоочеревинного введення, була доза 10000,0 мг/кг маси тіла. Клінічна картина гострого отруєння та час загибелі тварини після введення ДМСО у дозі 10000,0 мг/кг маси тіла була аналогічною тим, що спостерігали на 1-му етапі дослідження. Розчинник, введений у дозі 760,0 мг/кг маси тіла, викликав у тварини загальне збудження, незначне збільшення спонтанної рухової активності, невеликі короточасні посликування кінцівок, ці симптоми зникли протягом 4 годин, і тварина залишилась живою. При подальшому спостереженні за твариною протягом 14 діб не відзначено будь-яких патологічних змін загального стану. Результати 2-го етапу досліджень гострої токсичності дозволили прийняти за  $LD_{50}$  для розчинника ДМСО у першому наблизенні у мишей при внутрішньоочеревинному введенні дозу 10000,0 мг/кг маси тіла.

На третьому етапі досліджень параметрів гострої токсичності нових сполук за допомогою табличного експрес-методу проведено точніше визначення  $LD_{50}$  та їх стандартних похибок.

Клінічна картина гострого отруєння досліджуваними речовинами, флуконазолом, ДМСО та час загибелі тварин в експериментах 3-го етапу були подібними таким, що спостерігались на двох попередніх етапах.

В експериментах зі сполукою 125 послідовність реакцій, зокрема кількість тварин, що загинули при застосуванні даної низки доз, виглядала так: 1, 0, 2, 3. За відповідною таблицею визначено  $LD_{50}$  та її помилку для похідної *N*-арилацетамідів сполуки 125, що становить  $600\pm 55$  мг/кг маси тіла. У дослідях зі сполукою 133 послідовність реакцій наступна: 0, 3, 4, 3. Згідно з відповідними таблицями,  $LD_{50}$  для похідної тіонів сполуки 133 становить  $490\pm 82$  мг/кг маси тіла. Для сполуки 136 послідовність реакцій мала вигляд: 1, 0, 3, 4. Отже, за відповідними таблицями  $LD_{50}$  для 4-алкілсульфанілпохідної сполуки 136 становить  $707\pm 62$  мг/кг маси тіла. В експериментах зі сполукою 149 послідовність реакцій виглядала так: 1, 0, 3, 4. За відповідною таблицею  $LD_{50}$  похідної ацетамідів сполуки 149 становить  $820\pm 65$  мг/кг маси тіла.

У дослідях з препаратом порівняння флуконазолом послідовність реакцій наступна: 0, 2, 3, 2. Згідно з відповідними таблицями,  $LD_{50}$  флуконазолу становить  $800\pm 136$  мг/кг маси тіла.

В експериментах з розчинником ДМСО послідовність реакцій мала вигляд: 0, 2, 3, 2. Отже,  $LD_{50}$  ДМСО становить  $20200\pm 3400$  мг/кг маси тіла. Отримані результати відповідають даним спеціалізованої літератури [13], згідно яких  $LD_{50}$  ДМСО у мишей при внутрішньоочеревинному введенні становить 20000 мг/кг маси тіла, що згідно з класифікацією речовин за токсичністю [8] відповідає VI класу – відносно нешкідливі речовини.

Отже, за результатами проведених досліджень параметрів гострої токсичності нових похідних 4Н-піридо[4',3':5,6]пірано[2,3-d]піримідину встановлено,

що при однократному внутрішньоочеревинному введенні досліджуваних сполук мишам LD<sub>50</sub> перебувала у діапазоні (490±82)–(820±65) мг/кг маси тіла. З урахуванням шляху введення відповідно класифікації речовин за токсичністю [8] усі досліджені сполуки віднесено до IV класу небезпеки (малотоксичні речовини).

При порівнянні токсичних ефектів досліджених речовин нового синтезу встановлено, що сполука 149, LD<sub>50</sub> якої дорівнює 820±65 мг/кг маси тіла, характеризується меншим ступенем токсичності, ніж інші досліджені речовини. При порівняльній оцінці токсичності досліджуваних речовин нового синтезу з флуконазолом встановлено, що за визначеними параметрами гострої токсичності похідна ацетамідів сполука 149 співвідноситься з існуючим протигрибковим препаратом флуконазолом, LD<sub>50</sub> якого становить 800±136 мг/кг маси тіла.

## Висновки

1. При одноразовому внутрішньоочеревинному введенні мишам досліджуваних похідних 4Н-піридо[4',3':5,6]пірано[2,3-d]піримідину спостерігались дозозалежні явища гострого отруєння тварин, їх LD<sub>50</sub> перебувала у діапазоні (490±82)–(820±65) мг/кг маси тіла.

2. За експериментально визначеними параметрами гострої токсичності досліджені нові похідні 4Н-піридо[4',3':5,6]пірано[2,3-d]піримідину, згідно класифікації речовин за токсичністю, належать до IV класу – малотоксичні речовини.

**Перспективи подальших досліджень.** Отримані результати свідчать про найбільшу перспективність подальших токсикофармакологічних досліджень похідної ацетамідів сполуки 149 з метою створення на її основі протигрибкового лікарського засобу

## Література

1. Березняков И.Г. Инфекции и антибиотики / И.Г. Березняков. – Х.: Константа, 2004. – 448 с.
2. Рачинский И.Д. Проблемы инфекции в современной клинике внутренних болезней / И.Д. Рачинский // Вісник СумДУ. – 2001. – №11 (32). – С. 79–84.
3. Вікторов О.П. Антибіотики: проблеми безпеки під час медичного застосування / О.П. Вікторов // Здоров'я України. – 2008. – №21. – С. 42.
4. Глобальная стратегия ВОЗ по сдерживанию устойчивости к противомикробным препаратам / WHO/CDS/CSR/DRS/2001.2a. – Режим доступу: <http://www.antibiotic.ru/files/pdf/execsumr.pdf>
5. Щербак О.Н. Потенциал производных 4Н-пиридо[4',3':5,6]пирано[2,3-d]пиримидина на пути преодоления распространения антибиотикорезистентности / Щербак О.Н., Андреева И.Д., Казмирчук В.В., Евсюкова В.Ю. // Клиническая микробиология и антимикробная химиотерапия. – 2011. – Т. 13, №2. – Прил. 1. – С. 39.
6. Безопасность лекарств: Руководство по фармаконадзору / Под ред. А.П. Викторова, В.И. Мальцева, Ю.Б. Белоусова. – К.: Моррион, 2007. – 240 с.
7. Зборовский А.Б. Неблагоприятные побочные эффекты лекарственных средств / А.Б. Зборовский, И.Н. Тюренков, Ю.Б. Белоусов. – М.: ООО «Медицинское информационное агентство», 2008. – 656 с.
8. Експериментальне вивчення токсичної дії потенційних лікарських засобів / В.М. Коваленко, О.В. Стефанов, Ю.М. Максимов, І.М. Трахтенберг // Доклінічні дослідження лікарських засобів: Метод. реком. / За ред. О.В. Стефанова. – К.: ВД «Авіцена», 2001. – С. 74–97.
9. Про затвердження порядку проведення доклінічного вивчення лікарських засобів та експертизи матеріалів доклінічного вивчення лікарських засобів: наказ МОЗ України від 14.12.2009 № 944 – Режим доступу <http://zakon.rada.gov.ua/cgi-bin/laws/main.cgi?nreg=z0053-10/>
10. Лойт А.О. Профилактическая токсикология: Рук. для токсикологов-экспериментаторов / А.О. Лойт, М.Ф. Савченков. – Иркутск Изд-во Иркут. ун-та, 1996. – 279 с.
11. Методические указания по изучению общетоксического действия фармакологических средств / Е.В. Арзамасцев, Т.А. Гуськова, И.В. Березовская и др. // Руководство по экспериментальному (доклиническому) изучению новых фармакологических веществ – М., 2000. – С.18–26.
12. Прозоровский В.Б. Статистическая обработка результатов фармакологических исследований / В.Б. Прозоровский // Психофармакология и биологическая наркология. – 2007. – Т. 7, Вып. 3–4. – С. 2090–2120.
13. Оаз С. Химия органических соединений серы / С. Оаз; пер. с япон. А.Ф. Коломиец, Н.Д. Чкаников. – М., 1975. – С. 223–278.

## Відомості про авторів:

Щербак О.М., аспірант ДУ «Інститут мікробіології та імунології ім. І.І. Мечникова АМН України», наук. співроб. лабораторії протимікробних засобів.

Андреева І.Д., к. мед. н., провідний наук. співроб. лабораторії протимікробних засобів ДУ «Інститут мікробіології та імунології ім. І.І. Мечникова АМН України».

Казмирчук В.В., к. мед. н., ст. наук. співроб., зав. лабораторією протимікробних засобів ДУ «Інститут мікробіології та імунології ім. І.І. Мечникова АМН України».

Погоріла М.С., наук. співроб. ДУ «Інститут мікробіології та імунології ім. І.І. Мечникова АМН України».

Бойко Л.Т., асистент кафедри клінічної лабораторної діагностики ХМАПО.

## Адреса для листування:

Щербак Ольга Миколаївна. 6100,1 м. Харків, пр-т Гагаріна, буд. 45-А, кв. 182.

Тел.: (066) 788 34 32.

E-mail: medkrim76@mail.ru