

УДК 547.1+547.284'288'288+547.82

## Аналоги димефосфона: фармакологический аспект

В. Ф. Миронов,<sup>a\*</sup> Б. И. Бузыкин,<sup>b</sup> Р. С. Гараев,<sup>b</sup> Д. А. Татаринов,<sup>a</sup> Л. Р. Кашапов,<sup>b</sup>  
Р. В. Честнова,<sup>a</sup> В. Н. Набиуллин,<sup>a</sup> А. В. Ильясов,<sup>a</sup> В. В. Зобов<sup>a</sup>

<sup>a</sup>Институт органической и физической химии им. А. Е. Арбузова  
Казанский научного центра Российской академии наук,  
Российская Федерация, 420088 Казань, ул. Акад. Арбузова, 8.  
E-mail: mironov@iopc.ru

<sup>b</sup>Казанский государственный медицинский университет  
Министерства здравоохранения и социального развития Российской Федерации,  
Российская Федерация, 420012 Казань, ул. Бутлерова, 49.  
E-mail: garaev@mail.ru

<sup>c</sup>Республиканский клинический противотуберкулезный диспансер,  
Российская Федерация, 420029 Казань, Сибирский тракт, 27а.  
E-mail: guz.rkpd@tatar.ru

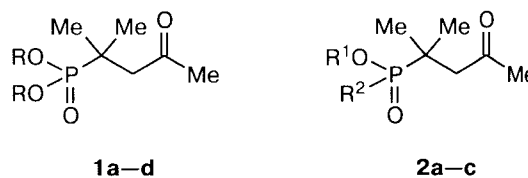
Изучены некоторые фармакологические свойства Р—С-аналогов и азааналогов лекарственного препарата «димефосфон» — диметилового эфира (2-метил-4-оксопент-2-ил)фосфоновой кислоты — одного из первых фосфорорганических лекарств, не обладающих антихолинэстеразной активностью. Замена двух фрагментов Р—О—С в диалкиловых эфирах (2-метил-4-оксопент-2-ил)фосфоновой кислоты на фрагменты Р—С при переходе к диалкил-(2-метил-4-оксопент-2-ил)фосфиноксидам приводит к резкому снижению острой токсичности последних для теплокровных животных. Токсичность азааналогов димефосфона и изученных (γ-оксоалкил)фосфиноксидов зависит от природы вводимого вместо атома кислорода азафрагмента. Выявлена высокая противовоспалительная активность пиридилоилгидразонов димефосфона, что повышает интерес к соединениям этого типа как перспективным туберкулостатикам.

**Ключевые слова:** димефосфон, диметил-(2-метил-4-оксопент-2-ил)фосфонат, фосфиноксид, оксим, пиридилоилгидразон, никотиноилгидразон, изоникотиноилгидразон, изониазид, гидразид никотиновой кислоты, бензгидразид, 4-нитробензгидразид, ацилгидразон, ароилгидразон, биологическая активность, острая токсичность, противотуберкулезная активность, противовоспалительная активность.

Одно из первых фосфорорганических лекарств, не обладающих антихолинэстеразной активностью, препарат димефосфон, выпускается предприятием «Татхимпрепараты». Оно используется с 1983 г. в качестве антиацидотического средства при ацидозах различной этиологии, вазоактивного средства при нарушениях мозгового кровообращения, при заболеваниях органов дыхания как средство монотерапии и в комплексе с другими лекарствами<sup>1–3</sup>. Несмотря на хорошо изученные фармакологические свойства этого препарата, до сих пор продолжают работы по изучению его новых свойств<sup>4</sup> и по созданию новых лекарственных форм на его основе<sup>5</sup>, что значительно расширяет сферу его применения.

Препарат димефосфон представляет собой водный раствор диметилового эфира (2-метил-4-оксопент-2-ил)фосфоновой кислоты (кетон **1a**, далее — димефосфон; известен также в авторском названии как диметил-(1,1-диметил-3-оксобутил)фосфонат<sup>1–3</sup>), который относится к β-фосфорилированным кетонам и поэтому представляет интерес как матрица в синте-

зе новых потенциально биологически активных соединений. Принцип создания аналогов известных лекарств широко используется в фармакологии наряду с другими методами.



**1:** R = Me (**a**), Et (**b**), Pr (**c**), Bu (**d**)

**2:** R<sup>1</sup> = R<sup>2</sup> = Me (**a**), R<sup>1</sup> = Me, R<sup>2</sup> = Et (**b**), R<sup>1</sup> = R<sup>2</sup> = Et (**c**)

Авторы препарата димефосфон<sup>1</sup> также синтезировали и первые его аналоги: они варьировали природу заместителей в эфирном фрагменте димефосфона или вместо оксогруппы вводили оксимный фрагмент. Подробно была изучена биологическая активность различных алкиловых эфиров (2-метил-4-оксопент-2-ил)фосфоновой кислоты (**1a–d**) и показано, что

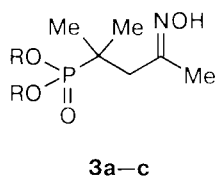
увеличение длины алкильного фрагмента при сохранении диэтилового эфира более чем в 2.5 раза, а дибутилового эфира было показано, что алкил-(2-метил-4-оксопент-2-ил)фосфиноксид (2a–c) подобно оксопент-2-ил)фосфиноксидному радикалу в эфирном фрагменте. Замена Р—О—С к эфирам приводит к заметному снижению токсичности, даваемый эффект Р—О—С на фоне не только уменьшения дозы фосфора, но и его способность вступать в реакцию.

В качестве примеров соединений **1a–c** были исследованы оксопент-2-ил)фосфиноксид, а также возрастает роль оксопент-2-ил)фосфиноксидной группы в эфирном фрагменте. Новый аналог **3a** отличается от **1a** тем, что вместо оксогруппы, хотя другие фрагменты близки. Подобно оксопент-2-ил)фосфиноксиду, вызывают угнетение активности, повышение рефлексивности, спазмолитические и седативные (типа») и димефосфон.

R = Me (**a**), Et (**b**), Pr (**c**), Bu (**d**)

Учитывая изложенное, можно предположить, что замена оксогруппы на оксимную в фрагменте димефосфона приводит к снижению токсичности. В работе по синтезу аналогов димефосфона — фосфиноксидов (2a–c) мы использовали оксопент-2-ил)фосфиноксиды (**4a–j**) мы использовали оксопент-2-ил)фосфиноксиды в лабораторных условиях<sup>8–13</sup> для изучения фармакологически активных соединений, содержащих оксопент-2-ил)фосфиноксидную группу. В работе по синтезу аналогов димефосфона — фосфиноксидов (**4a–j**) мы использовали оксопент-2-ил)фосфиноксиды в лабораторных условиях<sup>8–13</sup> для изучения фармакологически активных соединений, содержащих оксопент-2-ил)фосфиноксидную группу. В зависимости от природы заместителей в эфирном фрагменте димефосфона или вместо оксогруппы вводили оксимный фрагмент. Подробно была изучена биологическая активность различных алкиловых эфиров (2-метил-4-оксопент-2-ил)фосфоновой кислоты (**1a–d**) и показано, что

е длины алкильной цепочки в эфирном е приводит к усилению острой токсичности нении большинства полезных свойств<sup>1</sup>. Так, эфир (**1b**) токсичнее димефосфона бо- в 2.5 раза, дипропиловый (**1c**) — в 6 раз, овый (**1d**) — почти на порядок. Тогда же азано<sup>1</sup>, что токсичность алкиловых эфиров метил-4-оксопент-2-ил)фосфиновых кислот подобным образом зависит от длины алкиль- кака как в эфирном, так и в алкилфосфо- фрагменте. Переход от диалкилфосфонатов фирам фосфиновых кислот **2a–c** приводит му снижению токсичности (табл. 1). Наблю- эффект обусловлен заменой фрагмента на фрагмент P–C и может быть объяснен уменьшением объема заместителя при ато- ра, но и тем, что у эфиров **2a–c** снижается вступать в реакции фосфорилирования. втве первых N-аналогов димефосфона и эфи- были изучены оксими диалкил-(2-метил-4- 2-ил)фосфонатов (**3a–c**). Их токсичность арастает с увеличением длины алкильной эфирном фрагменте (см. табл. 1)<sup>6,7</sup>. Оксим- ог **3a** токсичнее димефосфона почти в два другие фармакологические свойства у них оподобно димефосфону оксими **3a–c** вызы- тение центральной нервной системы и по- рефлексорной возбудимости. Противовес- ные и антидотные свойства оксима **3a** («ме- димефосфона сопоставимы<sup>1,6</sup>.



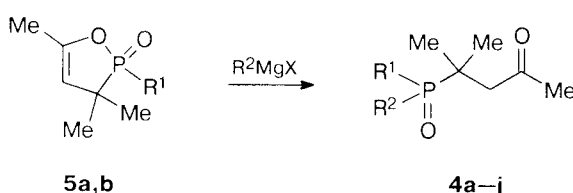
3a–c

Et (b), Pr (c)

вая изложенные данные, мы предположи- амена двух фрагментов P–O–C в эфирах рагмент P–C приведет к еще большему сни- жности планируемых P–C-аналогов ди- на — диалкил-(2-метил-4-оксопент-2-ил)- оксидов (**4a–j**). Для синтеза фосфиноксидов использовали разработанную в нашей лабо- <sup>13</sup>удобную методологию синтеза функцио- ванных фосфиноксидов из фосфорных ге- ов, содержащих не менее одной связи P–C –O. Так, при использовании в качестве ис- роизводных 3,3,5-триметил-2-R-1,2-окса- -2-оксидов (**5a,b**) (схема 1) была получена руппа новых (γ-оксоалкил)фосфиноксидов нисле и аналогов диалкил-(2-метил-4-оксо- )фосфонатов **1**; для некоторых из них в пер- ды была определена острая токсичность для вных животных (см. табл. 1).

симости от природы заместителя R<sup>1</sup> в ис- х оксафосфоленах **5** можно синтезировать

Схема 1

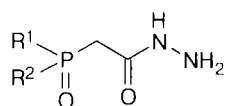


Соедине- ние	R <sup>1</sup>	R <sup>2</sup>	Соедине- ние	R <sup>1</sup>	R <sup>2</sup>
<b>4a</b>	Et	Et	<b>4g</b>	Bn	Bn
<b>4b</b>	Pr	Pr	<b>4h</b>	Ph	Ph
<b>4c</b>	Bu	Bu	<b>4i</b>	2-MeOC <sub>6</sub> H <sub>4</sub>	2-MeOC <sub>6</sub> H <sub>4</sub>
<b>4d</b>	C <sub>5</sub> H <sub>11</sub>	C <sub>5</sub> H <sub>11</sub>	<b>4j</b>	Et	2-MeOC <sub>6</sub> H <sub>4</sub>
<b>4e</b>	C <sub>6</sub> H <sub>13</sub>	C <sub>6</sub> H <sub>13</sub>	<b>5a</b>	Cl	—
<b>4f</b>	C <sub>8</sub> H <sub>17</sub>	C <sub>8</sub> H <sub>17</sub>	<b>5b</b>	Et	—

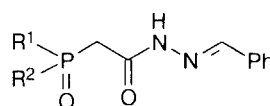
(γ-оксоалкил)фосфиноксиды **4** и с двумя различны- ми заместителями (когда в исходном фосфацикле есть еще и эндоциклическая связь P–C, R<sup>1</sup> = Alk, Ar или гетероцикл)<sup>9,11</sup>, и с одинаковыми (R<sup>1</sup> = Cl)<sup>8–10,12–14</sup>. С хорошим выходом этим способом были получе- ны диалкил- (**4a–f**)<sup>9,10,13</sup>, дибензил- (**4g**)<sup>13</sup>, диарил- (**4h,i**)<sup>13</sup>, диаллил-, дитиенил- и смешанные (алкил)(арил)(γ-оксоалкил)фосфиноксиды<sup>9</sup>, в том числе и соединение **4j**.

Острая токсичность диалкил-(2-метил-4-оксо- пент-2-ил)фосфиноксидов (**4a–e**), изученная нами на белых беспородных мышах, зависит от природы алкильного фрагмента при атоме фосфора и быстро увеличивается с его размером (см. табл. 1). При этом симбатности свойств у соответствующих представи- телей обеих групп, содержащих одинаковый алкиль- ный фрагмент, не наблюдается. Если диэтилфосфин- оксид **4a** почти в 2.5 раза менее токсичен, чем соот- ветствующий диэтиловый эфир **1b**, то у пропиловых аналогов **1c** и **4b** токсичность уже примерно одинако- ва, а дибутилфосфиноксид **4c** токсичнее дибутилого- во эфира **1d** более чем в 2 раза.

Замена даже только одной алкильной группы в ди- алкил-(2-метил-4-оксопент-2-ил)фосфиноксиде на арильный фрагмент еще более увеличивает ток- сичность. Так, переход от диэтилфосфиноксида **4a** к фосфиноксиду **4j**, у которого одна этильная группа заменена на 2-метоксифенильную, повышает токсич- ность почти в 20 раз. Подобное влияние природы за- местителей при атоме фосфора на токсические свой- ства отмечалось ранее и в другой группе функцио- нализированных фосфиноксидов типа **6** и **7**, содержа- щих функциональные группы близкой электронной природы<sup>15,16</sup>.



6a–c



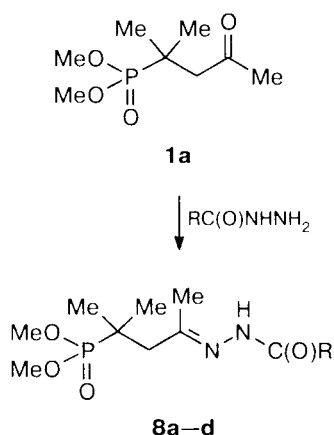
7a,b

R<sup>1</sup> = R<sup>2</sup> = Ph (**6a**, **7a**), Et (**6b**), R<sup>1</sup> = ClCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>O, R<sup>2</sup> = 4-MeC<sub>6</sub>H<sub>4</sub> (**6c**, **7b**)

Факт снижения токсичности при переходе от гидразидов к гидразонам хорошо согласуется с известными приемами снижения токсичности широко используемого противотуберкулезного препарата изониазид (тубазид и другие синонимы), который по химической сущности является гидразидом 4-пиридинкарбоновой (изоникотиновой) кислоты. Многие изоникотиноилгидразоны, например фтивазид, салюзид, инга-17 и ларусан, ранее были предложены как анти-туберкулезные препараты с меньшей токсичностью, чем у изониазида<sup>17,18</sup>, хотя их антимикобактериальная активность уступала активности изониазида. Например, для ларусана минимальная ингибирующая концентрация (МИК) составляет  $1.57 \text{ мкг} \cdot \text{мл}^{-1}$  по сравнению с  $0.1\text{--}0.6 \text{ мкг} \cdot \text{мл}^{-1}$  для изониазида. Для фтивазида МИК оценивается около  $1 \text{ мкг} \cdot \text{мл}^{-1}$ , а его токсичность составляет менее  $100 \text{ мг} \cdot \text{кг}^{-1}$  (см. лит.<sup>17</sup>).

Изониазид относится к достаточно токсичным препаратам, а фтивазид, салюзид, инга-17 и ларусан, как и он, обладают рядом нежелательных побочных эффектов, поэтому поиск соединений с антимикобактериальной активностью среди разнообразных изоникотиноилгидразонов с различным успехом продолжается и в настоящее время<sup>19</sup>. Развитием этого направления стал синтез арил- и ацилгидразонов **8a–d** на основе димефосфона **1a** (схема 2), а также новых пиридилоилгидразонов **9a–c** на основе фосфин-оксидов **4b,c** (схема 3). (2-Метил-4-оксопент-2-ил)-диэтилфосфиноксид **4b** был выбран для синтеза пиридилоилгидразонов **9a,c** для сравнения его свойств со свойствами производных димефосфона **8a,b**, поскольку стерические объемы метоксильного заместителя и этильной группы близки.

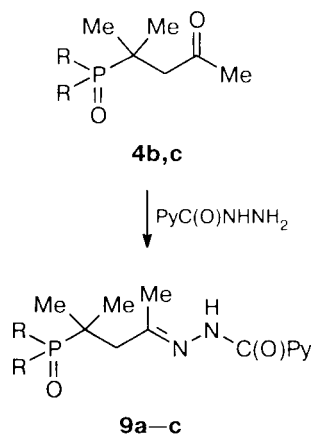
Схема 2



**8**: R = 4-Py (**8a**), 3-Py (**b**), Ph (**c**), 4-C<sub>6</sub>H<sub>4</sub>NO<sub>2</sub> (**d**)

Как и ожидалось, токсичность изоникотиноилгидразона димефосфона (**8a**) оказалась намного ниже, чем токсичность изониазида, и сопоставима с токсичностью димефосфона, который можно отнести к третьему классу опасности — «вещества умеренно

Схема 3



**4**: R = Et (**b**), Pr (**c**)

**9**: R = Et (**a, b**), Pr (**c**); Py = 4-Py (**a, c**), 3-Py (**b**)

опасные» и даже малотоксичные<sup>20</sup> (см. табл. 1). При внутрибрюшинном введении мышам или крысам токсичность гидразона **8a** в 13 раз меньше, чем у изониазида, а при пероральном введении только в 10 раз меньше. Увеличение его токсичности при пероральном введении по сравнению с внутрибрюшинным введением объясняется тем, что он, как и все ацилгидразоны<sup>21</sup>, в кислой среде желудка, по-видимому, способен частично гидролизоваться до исходных димефосфона и более токсичного изониазида. Переход от гидразида никотиновой кислоты к никотиноилгидразону димефосфона (**8b**) также сопровождается снижением острой токсичности, хотя и в меньшей степени (в 5 раз), чем это наблюдается для 4-пиридилоильного аналога **8a** (см. табл. 1).

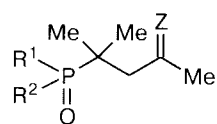
Пиридилоилгидразоны димефосфона **8a,b** в отличие от **1a** оказывают мышечнорасслабляющее действие и проявляют противосудорожную активность<sup>22</sup>, но не вызывают симптомов нейротоксического действия при остром отравлении экспериментальных животных и не обладают гепатотоксическими свойствами. В отличие от действия токсических доз димефосфона, они не приводят к наркозоподобному состоянию животных. Следовательно, они оказывают фармакологический эффект как единое соединение без распада на исходные компоненты.

Одним из неприятных свойств изониазида является его высокая гепатотоксичность, первые сведения о которой появились уже в 1969 г.<sup>23</sup> Частота возникновения клинически выраженного гепатита вследствие монотерапии изониазидом у взрослых в среднем составляет 0.6%. Комбинированное применение изониазида и рифампицина увеличивает частоту побочного эффекта до 2.73% (см. лит.<sup>24</sup>). Для уменьшения такого эффекта вместе с изониазидом одновременно назначают гепатопротекторы. Желательнее провести поиск новых соединений, сопоставимых по антимикобактериальной активности с «эталонными препаратами», но не обладающих гепатотоксичностью. В связи с этим мы изучили

еще и влияние изониазида на функцию печени.

В первые 20 дней введения изониазида животным в дозе 100 мг/сутки в течение 30 суток введения не наблюдалось никаких изменений в поведении, агрессивности, аппетите, сечением сывороточных ферментов, сечением гемоглобина и гематокрита. В течение 30 суток введения не наблюдалось никаких изменений в поведении, агрессивности, аппетите, сечением сывороточных ферментов, сечением гемоглобина и гематокрита.

Курсовое введение изониазида в дозе 100 мг/сутки в течение 30 суток в крысам не вызвало никаких изменений в поведении, агрессивности, аппетите, сечением сывороточных ферментов, сечением гемоглобина и гематокрита.



**1a–d, 2a–c, 3a–c,  
4a–e, 8a–d, 9a–c**

**Таблица 1.** Токсичность ( $LD_{50}/\text{мг} \cdot \text{кг}^{-1}$ ) димефосфона и его аналогов<sup>a</sup>

Соединение	R <sup>1</sup>	R <sup>2</sup>	Z	LD <sub>50</sub>	Ссылка
1a	OMe	OMe	O	3000±155, 2300–2500 <sup>b</sup> , 2475 <sup>c</sup>	1
1b	OEt	OEt	O	1050±45	1
1c	OPr	OPr	O	520±25	1
1d	OBu	OBu	O	390±20	1
2a	OMe	Me	O	4800±157	1
2b	OMe	Et	O	3200±45	1
2c	OEt	Et	O	1450±80	1
3a	OMe	OMe	NOH	1600±74	6, 7
3b	OEt	OEt	NOH	785±32	6, 7
3c	OPr	OPr	NOH	260±17	6, 7
4a	Et	Et	O	2514±82	— <sup>b</sup>
4b	Pr	Pr	O	661±31	— <sup>b</sup>
4c	Bu	Bu	O	167±7	— <sup>b</sup>
4j	Et	2-MeOC <sub>6</sub> H <sub>4</sub>	O	130±16	— <sup>b</sup>
6a	Ph	Ph	—	315±25	15, 16
6b	Et	Et	—	5400±235	15, 16
6c	ClCH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> O	4-Me <sub>2</sub> C <sub>6</sub> H <sub>4</sub>	—	960±35	15, 16
7a	Ph	Ph	—	5200±310	16
7b	ClCH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> O	4-Me <sub>2</sub> C <sub>6</sub> H <sub>4</sub>	—	4960±210	16
8a	OMe	OMe	NNHC(O)Py-4	2005±59, 2064±64, 1550 <sup>d</sup>	— <sup>b</sup>
8b	OMe	OMe	NNHC(O)Py-3	1788±31, 2326±48 <sup>b</sup>	22
9a	Et	Et	NNHC(O)Py-4	3073.7±87	— <sup>d</sup>
9b	Et	Et	NNHC(O)Py-3	2164.2±43	— <sup>d</sup>
9c	Pr	Pr	NNHC(O)Py-4	1702.7±81.8	— <sup>d</sup>
Изониазид, 4-PyC(O)NHNH <sub>2</sub>				151±7, 172.3, 133	25, 26 — <sup>d</sup>
Изониазид на фоне димефосфона				235.5±8	— <sup>d</sup>
3-PyC(O)NHNH <sub>2</sub>				300±7	— <sup>d</sup>

<sup>a</sup> Препарат вводили беспородным мышам обоих полов внутривенно. <sup>b</sup> Перорально. <sup>c</sup> Использовали крыс. <sup>d</sup> Результаты данной работы.

влияние пиридилоилгидразонов **8a, b** и изониазида на функции печени при их курсовом (30 суток) введении.

Первые 20 суток ежедневного введения пиридилоилгидразонов **8a, b** и изониазида (параллельно с другим гидразоном) каких-либо изменений в поведении животных отмечено не было. Начиная с 21-х суток введения у крыс появилась некоторая тревожность, агрессивность, обусловленная, вероятно, токсическим действием вводимых агентов на центральную нервную систему.

Курсовое введение всех трех исследуемых препаратов крысам не выявило статистически значимых изменений в массе тела животных во всех

четырёх группах в одинаковые промежутки времени. Расчет относительной массы печени, почек и надпочечников не выявил достоверных отличий в испытываемых группах. Повышение относительной массы наблюдалось только для селезенки в группе крыс, получавших изоникотиноилгидразон **8a** (весовой коэффициент  $3.90 \pm 0.86$  г) и изониазид ( $3.59 \pm 0.76$  г) по сравнению с контролем ( $2.58 \pm 0.41$  г).

В группах крыс при курсовом применении гидразона **8a** и изониазида отмечается тенденция к снижению уровня эритроцитов и гемоглобина. Статистически значимых различий в других показателях красной крови (тромбоцитов, СОЭ) при введении гидразонов **8a, b** не выявлено.

Из биохимических показателей крови особый интерес представляют общий билирубин, аланинаминотрансфераза (АЛТ), аспаратаминотрансфераза (АСТ),  $\gamma$ -глутамилтранспептидаза (ГГТ), так как их уровень отражает непосредственное влияние или отсутствие влияния на функцию печени.

Биохимический анализ крови выявил достоверное повышение уровня АСТ только в группе изоникотиноилгидраzone **8a** ( $203.1 \pm 25.9$  Ед  $\cdot$  л $^{-1}$ ) относительно контроля ( $142.6 \pm 22$  Ед  $\cdot$  л $^{-1}$ ). Для изомерного гидраzone **8b** отмечена лишь тенденция к повышению уровня АСТ, хотя она и сопоставима с таковой для изониазида. Оба гидраzone **8a, b** не влияют на уровень АЛТ, в отличие от изониазида, который существенно снижает ее содержание. Повышение уровня ГГТ до  $6.6 \pm 1.4$  Ед  $\cdot$  л $^{-1}$  при действии гидраzone **8a** более выражено, чем при действии изониазида  $5.2 \pm 1.3$  Ед  $\cdot$  л $^{-1}$  (контроль —  $2.6 \pm 1.7$  Ед  $\cdot$  л $^{-1}$ ), в то время как для гидраzone **8b** он ниже уровня контроля на  $\sim 1.0$  Ед  $\cdot$  л $^{-1}$ .

Биохимический анализ крови выявил достоверное увеличение содержания общего билирубина в группе изониазида ( $5.2 \pm 0.9$  мкмоль  $\cdot$  л $^{-1}$ ) и никотиноилгидраzone **8b** ( $60 \pm 0.8$  мкмоль  $\cdot$  л $^{-1}$ ) относительно контрольной группы ( $2.9 \pm 0.8$  мкмоль  $\cdot$  л $^{-1}$ ). Изоникотиноилгидраzone **8a** не влияет на обмен общего билирубина и глюкозы, а гидраzone **8b** достоверно увеличивает лишь содержание глюкозы относительно контрольной группы ( $6.2 \pm 0.7$  и  $5.3 \pm 0.5$  ммоль  $\cdot$  л $^{-1}$  соответственно,  $p < 0.05$ ). Уровень креатинина не отличался во всех группах. Изониазид и пиридиноилгидраzone **8a, b** вызывают сопоставимое небольшое снижение содержания мочевины по сравнению с контролем (для **8a**  $6.5 \pm 0.6$  и  $9.4 \pm 1.2$  ммоль  $\cdot$  л $^{-1}$  соответственно). Наблюдается статистически значимое снижение общего белка в группе изониазида по сравнению с контролем ( $61.1 \pm 4.6$  и  $67.9 \pm 2.4$  г  $\cdot$  л $^{-1}$  соответственно,  $p < 0.05$ ).

На основании проведенных экспериментов можно сделать предварительный вывод, что никотиноилгидраzone димефосфона **8b** в отличие от изониазида не обладает гепатотоксическими свойствами.

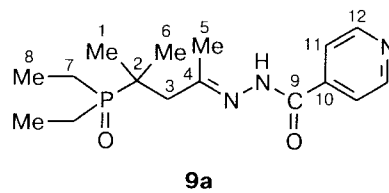
Нами также проведена оценка противовоспалительной активности гидраzone **8a** и его предполагаемых метаболитов: изониазида, димефосфона и их комбинации при соблюдении равных условий эксперимента.

Результаты сопоставления противовоспалительной активности димефосфона, гидраzone **8a** и изониазида в 0.5 максимально-переносимой дозы (МПД) показали, что эффективность этих веществ в отношении каррагенинового отека различается: димефосфон в дозе  $1000$  мг  $\cdot$  кг $^{-1}$  угнетал развитие отека лапки крысы на 39.1%, гидраzone **8a** ( $800$  мг  $\cdot$  кг $^{-1}$ ) — на 66.3%, а изониазид не проявил такой активности. Интересно отметить, что при уменьшении дозы гидраzone **8a** его противовоспалительная активность снижается не симбатно: в дозе  $400$  мг  $\cdot$  кг $^{-1}$  она составила только 31.5%, а в дозе  $200$  мг  $\cdot$  кг $^{-1}$  — 55.4%. Для объяснения наблюдаемого эффекта необходимо провести дополнительные исследования.

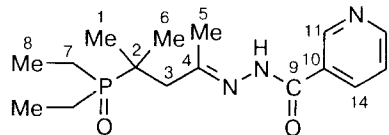
Поскольку в организме животных могут создаваться условия гидролиза гидраzone **8a** до исходных соединений, то мы отдельно изучили противовоспалительную активность комбинации изониазида ( $160$  мг  $\cdot$  кг $^{-1}$ ) с димефосфоном ( $240$  мг  $\cdot$  кг $^{-1}$ ). Это соотношение препаратов может возникнуть при распаде молекулы гидраzone **8a**, введенного в дозе  $400$  мг  $\cdot$  кг $^{-1}$ . Применение растворов указанной смеси изониазида и димефосфона дает даже более высокий противовоспалительный эффект (66.3%) по сравнению с индивидуальным димефосфоном (52.2%).

Синтез пиридиноилгидраzoneв диалкил-(2-метил-4-оксопент-2-ил)фосфиноксидов (**9a—c**) проводили подобно синтезу ацилгидраzoneв димефосфона **8a—d** (см. схему 3).

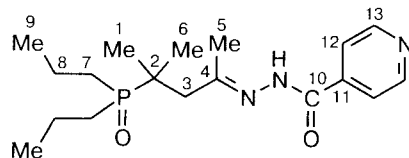
Чистоту полученных соединений контролировали методом ТСХ на пластинках «Silufol», их структура установлена с использованием нескольких физико-химических методов: ИК-спектроскопии, спектроскопии ЯМР, масс-спектрометрии. Гидраzone **9a—c**, как и гидраzone димефосфона **8a, b** — хорошо кристаллизующиеся и растворимые в воде вещества.



9a



9b



9c

[4-(2-Изоникотиноилгидраzone)-(2-метилпент-2-ил)]диэтилфосфиноксид (**9a**) оказался наименее токсичным из всех полученных нами ацилгидраzoneв типа **8** и **9**. Он в 20 раз менее токсичен, чем изониазид, и менее токсичен, чем исходный фосфиноксид **4b** (см. табл. 1). Его дипропильный аналог **9c** вследствие удлинения алкильной цепочки токсичнее почти в 2 раза, но он в 25 раз менее токсичен, чем его кетонный предшественник **4c**. Для изомерного никотиноилгидраzone **9b** наблюдается подобная картина. Он в 7 раз менее токсичен, чем исходный гидразид никотиновой кислоты, и лишь немного токсичнее своего кетона **4a** (см. табл. 1).

По характеру токсичности пиридиноилгидраzone (2-метил-4-пент-2-ил)фосфиноксидов **9a—c**, как

и гидраzoneв друг от друга. Через наблюдалось и затруднено асфиксии.

В отличие 4-пиридино **9a—c** по характеру димефосфона **8a** сического действия ментальных ж

Данные л по изучению пент-2-ил)фо 4-оксопент-2 (оксимов, аци зированных ф следующие вы тура—свойств группы в фос рованных фос (2) объем зам соединениях, по сравнению турой (так, ди 2-ил)диэтилфо мерно равны группы (ОМе ми свойствам N-аналогов); соединения (на лот) илиденов Р—С-аналогов токсичности п

Изучение б тиноилгидраzone бактерий тубе пользуя станд МGIT 960 (В тельную среду бавкой ВАСТЕ

Как видно введение в мо мента димефо личивает анти сам димефосф туберкулеза за животных и сп вности микоба ных противот к рифампици от введения и наблюдается п да никотинов и 4-нитробен вой кислоты, обладает акти V. tuberculosis H ставляет 6.25 м

гидразоны димефосфона **8a,b**, мало отличаются друг от друга. Через 4–6 мин после инъекции у животных наблюдалось снижение двигательной активности и затрудненное дыхание. Животные погибают на фоне аноксии.

В отличие от изониазида<sup>25,26</sup>, 4-диалкил-(2-метил-пиридиноилгидразонепент-2-ил)фосфиноксиды в зависимости от характера токсичности, как и гидразоны димефосфона **8a,b**, не вызывают симптомов нейротоксического действия при остром отравлении экспериментальных животных.

Данные литературы<sup>1</sup> и полученные результаты изучения токсичности эфиров (2-метил-4-оксопент-2-ил)фосфоновой кислоты, диалкил-(2-метил-4-оксопент-2-ил)фосфиноксидов и их N-аналогов (диметил-, ацилгидразонов) и других функционализированных фосфиноксидов<sup>15,16</sup> позволяют сделать следующие выводы, отражающие зависимость «структура–свойство»: (1) увеличение длины алкильной группы в фосфорильном фрагменте функционализированных фосфиноксидов повышает их токсичность; (2) объем заместителей при атоме фосфора в таких соединениях, по-видимому, играет более важную роль по сравнению с их электронной и химической структурой (так, димефосфон **1a** и (2-метил-4-оксопент-2-ил)диэтилфосфиноксид **4b**, имеющие по две группы (OMe и Et) соответственно, обладают близкими свойствами, как и соответствующие пары их N-аналогов); (3) введение в молекулу токсичного соединения (на примере гидразидов карбоновых кислот или илденевого фрагмента димефосфона или его N-аналогов) приводит к резкому снижению острой токсичности получающихся ароилгидразонов.

Изучение бактериостатической активности никотиноилгидразонов **8a,b** и **9a–c** в отношении микобактерий туберкулеза штамма H<sub>37</sub>Rv проводили, используя стандартную ростовую систему BACTEC MGIT 960 (Becton Dickinson). Использовали питательную среду Мидлбрук 7 H9 с обогатительной дозой BACTEC MGIT.

Как видно из данных, приведенных в таблице 2, введение в молекулу изониазида илденевого фрагмента димефосфона (переход к гидразону **8a**) не увеличивает антимикобактериальную активность, хотя димефосфон повышает эффективность лечения туберкулеза за счет стимуляции иммунного ответа животных и способности снижать развитие устойчивых микобактерий туберкулеза к действию основных противотуберкулезных препаратов, например изониазиду<sup>1</sup>. Значительно больший эффект наблюдается при введении илденевого фрагмента димефосфона на примере малоактивного гидразида никотиновой кислоты или неактивных бензо- и 4-нитробензгидразидов. Гидразид никотиновой кислоты, хотя и уступает изониазиду, но все же обладает активностью по отношению к штамму туберкулеза H<sub>37</sub>Rv: по данным работы<sup>27</sup> активность составляет 6.25 мкг·мл<sup>-1</sup> по сравнению с 1.25 мкг·мл<sup>-1</sup>

**Таблица 2.** Минимальная ингибирующая концентрация (МИК/мкг·мл<sup>-1</sup>) пиридиноилгидразонов димефосфона **8a,b**, ароилгидразонов димефосфона **8c,d** и пиридиноилгидразонов диалкил-(2-метил-4-оксопент-2-ил)фосфиноксидов **9a–c**

Соединение	R <sup>1</sup>	R <sup>2</sup>	R <sup>3</sup>	МИК
<b>8a</b>	OMe	OMe	4-Py	10.0
<b>8b</b>	OMe	OMe	3-Py	1.0
<b>8c</b>	OMe	OMe	Ph	10.0
<b>8d</b>	OMe	OMe	4-O <sub>2</sub> NC <sub>6</sub> H <sub>4</sub>	10.0
<b>9a</b>	Et	Et	4-Py	1.0
<b>9b</b>	Et	Et	3-Py	5.0
<b>9c</b>	Pr	Pr	4-Py	5.0
<b>10</b>	Pr	Pr	NNHSO <sub>2</sub> C <sub>6</sub> H <sub>4</sub> Me	20.0
Изониазид, 4-PyC(O)NHNH <sub>2</sub>				0.5
3-PyC(O)NHNH <sub>2</sub>				10.0
H <sub>2</sub> NNHSO <sub>2</sub> C <sub>6</sub> H <sub>4</sub> Me				>20

*Примечание.* Использовали прибор BACTEC MGIT 960.

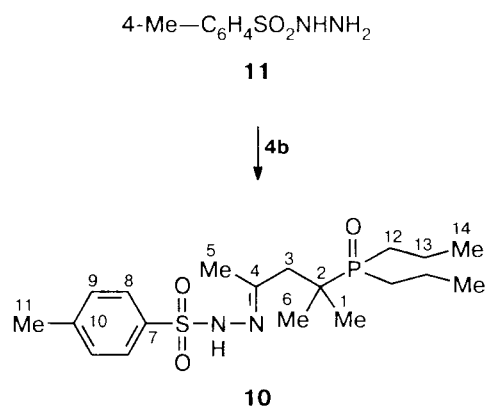
для изониазида; по отношению к изученному нами штамму соответственно 10.0 и 0.5 мкг·мл<sup>-1</sup> (см. табл. 2). Для пары никотиноилгидразид и его гидразон **8b** наблюдается симбатное изменение свойств: резкое уменьшение токсичности (см. табл. 1) и повышение противотуберкулезной активности на порядок. Обнаруженный эффект значительно превосходит эффект изомерной пары изониазид и его гидразон **8a** (см. табл. 1 и 2), хотя низкая токсичность и хорошая водорастворимость последнего делает его также перспективным для дальнейших исследований.

Гидразиды бензойной и 4-нитробензойной кислот, как известно<sup>28</sup>, не обладают противотуберкулезной активностью. В наших опытах бензоилгидразон димефосфона (**8c**) и 4-нитробензоилгидразон димефосфона (**8d**) показали заметную антимикобактериальную активность (МИК обоих 10 мкг·мл<sup>-1</sup>). Следовательно, можно сделать вывод, что введение в молекулу гидразида карбоновой кислоты фрагмента димефосфона позволяет проявлять получающемуся гидразону антимикобактериальные свойства, т.е. проявлять всей молекуле свойства как единого фармакофора.

Следует отметить, что этот вывод, по-видимому, справедлив только для гидразонов на основе гидразидов карбоновых кислот. Так, антимикобактериальная активность тозилгидразона дипропил-(2-метил-4-оксопент-2-ил)фосфиноксида (**10**), полученного на основе тозилгидразида (**11**) (схема 4), оказалась довольно слабой, как и у исходного гидразида (см. табл. 2).

Пиридиноилгидразоны диалкил-(2-метил-4-оксопент-2-ил)фосфиноксидов **9a–c** по антимикобактериальной активности также несколько уступают изониазиду, активность которого определена на тех же самых образцах штамма *M. tuberculosis* H<sub>37</sub>Rv (см. табл. 2). Наиболее перспективными для дальнейшего изучения, учитывая низкую острую токсичность, являются изоникотиноилгидразоны диэтил- и дипропил-

Схема 4



фосфиноксидов **9a,c**. Активность первого из них (МИК 1 мкг·мл<sup>-1</sup>) достаточна близка таковой для изониазида.

Для сравнения нами была изучена антибактериальная и противогрибковая активность некоторых диалкил-(2-метил-4-оксопент-2-ил)фосфиноксидов с использованием штаммов *Staphylococcus aureus* (золотистый стафилококк), *Bacillus cereus* (грамположительная, спорообразующая почвенная аэробная бактерия), *Escherichia coli* (кишечная палочка), *Pseudomonas aeruginosa* (синегнойная палочка), *Enterococcus faecalis* (фекальный энтерококк), *Aspergillus niger* (вид высших плесневых грибов из рода *Aspergill*), *Trichophyton mentagrophytes* (гриб, дерматофит) и *Candida Albicans* (диплоидный грибок, форма дрожжеподобных грибов). В качестве эталона сравнения использовали хлорамфеникол (левомецетин) — антибиотик широкого спектра действия, который высокоэффективен при лечении брюшного тифа, пищевых токсикоинфекций, риккетсиозов, дизентерии и других заболеваний. Было установлено, что диалкил-, дибензил- и диарил-(2-метил-4-оксопент-2-ил)-фосфиноксиды **4c–j** не обладают ни бактерицидной, ни фунгицидной активностью. Бактериостатическая и фунгистатическая активность этих соединений также очень слабая. У диарил- (**4i,j**), дибензил- (**4h**)

и даже у дипропил- и дибутылфосфиноксидов **4c,d** МИК значительно выше 500 мг·л<sup>-1</sup>. Лишь увеличение длины алкильного фрагмента, связанного с атомом фосфора, в соединениях **4e–g** приводит к появлению бактериостатической активности (табл. 3). При этом только при введении в молекулу радикалов C<sub>8</sub>H<sub>17</sub> (фосфиноксид **4g**) бактериостатическая активность его в отношении грамположительных бактерий *Staphylococcus aureus* и *Bacillus cereus* превышает активность антибиотика хлорамфеникола (МИК 62.5 мг·мл<sup>-1</sup>, табл. 3) в 8 раз.

Результаты микробиологических испытаний пиридиноилгидразонов **9a–c** и тозилгидразона **10** на антибактериальную и противогрибковую активности показали, что они, так же как и соответствующие исходные β-фосфорилкетоны, не обладают антимикробным действием (МИК > 500 мг·л<sup>-1</sup>) по отношению к изученным микробам (см. табл. 3).

Таким образом, высокая антимицобактериальная активность (см. табл. 2) в отношении микобактерий туберкулеза пиридиноилгидразонов **8a,b** и **9a–c** является специфичной именно для *Mycobacterium tuberculosis*.

Для получения сопоставимых данных мы дополнительно провели в одинаковых условиях сравнительное изучение антимикробной активности димефосфона, изониазида, зоникотиноил- и никотиноилгидразонов димефосфона (**8a,b**) в опытах *in vitro* в отношении бактерий *Pseudomonas aeruginosa* (синегнойная палочка), *Escherichia coli*, *Salmonella Paratyphi B*, *Staphylococcus aureus* и грибка *Candida Albicans*. Использовали 10%-ные исходные растворы всех соединений. Полученные результаты приведены в таблице 4.

При контакте изученных соединений с микроорганизмами в течение 1 ч бактерицидное действие оказывал только димефосфон в разведении 1 : 50 исходного 10%-ного раствора в отношении *Ps. Aeruginosa* и *St. Aureus*, а изониазид — в разведении 1 : 50 — только в отношении *C. albicans*. При выдерживании в течение 1 суток все изученные соединения в разведении 1 : 50 и 1 : 100 оказывали губительное воздействие на все тест-объекты за исключением никотиноил-

Таблица 3. Минимальные ингибирующие концентрации (МИК) диалкил-(2-метил-4-оксопент-2-ил)фосфиноксидов **4b–f**<sup>a</sup>

Соединение	МИК/мг·л <sup>-1</sup>							
	<i>Sa</i> <sup>b</sup>	<i>Ba</i> <sup>c</sup>	<i>Ec</i> <sup>d</sup>	<i>Pa</i> <sup>e</sup>	<i>Ef</i> <sup>f</sup>	<i>An</i> <sup>g</sup>	<i>Tm</i> <sup>h</sup>	<i>Ca</i> <sup>i</sup>
<b>4b</b>	>500	>500	>500	>500	>500	>500	>500	>500
<b>4c</b>	>500	>500	>500	>500	>500	>500	>500	>500
<b>4d</b>	250	250	>500	>500	>500	>500	>500	>500
<b>4e</b>	250	250	>500	>500	>500	>500	>500	>500
<b>4f</b>	7.8	7.8	>500	>500	>500	>500	>500	>500
Хлорамфеникол	62.5	62.5	125	250	—	—	—	—

Примечание. <sup>a</sup> Для диарил- и дибензил-(2-метил-4-оксопент-2-ил)фосфиноксидов **4h–j** по отношению ко всем микробам МИК > 500 мг·л<sup>-1</sup>. <sup>b</sup> *Staphylococcus aureus*. <sup>c</sup> *Bacillus cereus*. <sup>d</sup> *Escherichia coli*. <sup>e</sup> *Pseudomonas aeruginosa*. <sup>f</sup> *Enterococcus faecalis*. <sup>g</sup> *Aspergillus niger*. <sup>h</sup> *Trichophyton mentagrophytes*. <sup>i</sup> *Candida Albicans*.

Таи  
рас  
кот  
—  
Ми  
орг.

*S. pe*

*E. co*

*Ps. ai*

*St. au*

*C. albi*

гидразона **8**  
ведении 1 :  
нии 1 : 100С  
вомикробно  
*Ps. Aeruginosa*  
шении бакте  
рации и он б

Таким об  
соединения (  
ли контактс  
ние таких ко  
фона теорети  
ция 1 : 100 в  
препаратов 1С  
носимой для  
ние их в каче  
резорбтивного  
вряд ли возмо  
илгидразонов,  
вернозных пол  
антимицобакте  
путствующей  
тивно, хотя это

Изложенны  
вать следующи  
циях 1 : 50 и 1  
ное действие на  
*Ps. Aeruginosa*,  
в течение 24 ч;  
(ноилгидразон д  
микробной акти  
(3) противоми  
выше, чем у изо

**Таблица 4.** Рост микроорганизмов (знак +) или его отсутствие (цифра 0) после выдержки культуры с водными растворами димефосфона **1a**, его пиридиноилгидразонов **8a, b** и изониазида в течение 2 и 24 ч (в скобках); контрольная среда — вода

Микро- организм	Разведение 10%-ного раствора	Процесс				Вода (контроль)
		Димефосфон ( <b>1a</b> )	<b>8a</b>	<b>8b</b>	Изониазид	
<i>S. paratyphi B</i>	1 : 50	+ (0)	+ (0)	+ (0)	+ (0)	+ (+)
	1 : 100	+ (0)	+ (0)	+ (0)	+ (0)	+ (+)
	1 : 1000	+ (+)	+ (+)	+ (+)	+ (+)	+ (+)
	1 : 10000	+ (+)	+ (+)	+ (+)	+ (+)	+ (+)
<i>E. coli</i>	1 : 50	+ (0)	+ (0)	+ (0)	+ (0)	+ (+)
	1 : 100	+ (0)	+ (0)	+ (0)	+ (0)	+ (+)
	1 : 1000	+ (0)	+ (+)	+ (+)	+ (+)	+ (+)
	1 : 10000	+ (+)	+ (+)	+ (+)	+ (+)	+ (+)
<i>Ps. aeruginosa</i>	1 : 50	0 (0)	+ (0)	+ (0)	+ (0)	+ (+)
	1 : 100	+ (0)	+ (+)	+ (0)	+ (0)	+ (+)
	1 : 1000	+ (0)	+ (+)	+ (+)	+ (+)	+ (+)
	1 : 10000	+ (+)	+ (+)	+ (+)	+ (+)	+ (+)
<i>St. aureus</i>	1 : 50	0 (0)	+ (0)	+ (0)	+ (0)	+ (+)
	1 : 100	+ (0)	+ (0)	+ (0)	+ (0)	+ (+)
	1 : 1000	+ (0)	+ (0)	+ (0)	+ (0)	+ (+)
	1 : 10000	+ (+)	+/(?)	+ (+)	+ (+)	+ (+)
<i>C. albicans</i>	1 : 50	+ (0)	+ (0)	+ (0)	0 (0)	+ (+)
	1 : 100	+ (0)	+ (0)	+ (+)	+ (0)	+ (+)
	1 : 1000	+ (0)	+/(?)	+ (+)	+ (+)	+ (+)
	1 : 10000	+ (+)	+ (+)	+ (+)	+ (+)	+ (+)

гидразона **8a**, оказавшегося неэффективным в разведении 1 : 100 в отношении *C. albicans*. В разведении 1 : 1000 только димефосфон проявил противомикробное действие на штаммы бактерий *E. coli*, *Ps. Aeruginosa*, *St. Aureus* и грибка *C. albicans*. В отношении бактерии *S. paratyphi B* в указанной концентрации и он был неэффективен.

Таким образом, при высоких концентрациях все соединения (**8a, b**, димефосфон и изониазид) проявили контактное противомикробное действие. Создание таких концентраций в крови для **8a, b** и димефосфона теоретически возможно. Например, концентрация 1 : 100 в крови может создаваться при введении препаратов 1000 мг · кг<sup>-1</sup>. Такая доза является переносимой для этих препаратов. При этом использование их в качестве противомикробного средства для резорбтивного действия в практическом отношении вряд ли возможно. Однако использование пиридиноилгидразонов димефосфона **8a, b** для промывания кавернозных полостей у больных туберкулезом с целью антимикробного действия и ликвидации сопутствующей банальной инфекции вполне перспективно, хотя это требует дальнейших исследований.

Изложенные выше результаты позволяют сделать следующие выводы: (1) изониазид в концентрациях 1 : 50 и 1 : 100 *in vitro* оказывает бактерицидное действие на микроорганизмы *S. paratyphi B*, *E. Coli*, *Ps. Aeruginosa*, *St. aureus*, *C. albicans* при действии в течение 24 ч; (2) изоникотиноилгидразон и никотиноилгидразон димефосфона (**8a** и **8b**) по противомикробной активности сопоставимы с изониазидом; (3) противомикробная активность димефосфона выше, чем у изониазида и пиридиноилгидразонов ди-

мефосфона **8a, b**; (4) пиридиноилгидразоны димефосфона **8a, b** и пиридиноилгидразоны Р—С-аналогов димефосфона **9a—c** проявляют специфическую антимикробную активность: они весьма активны по отношению к микобактериям туберкулеза, но не активны по отношению к большой группе других грамположительных и грамотрицательных бактерий и некоторых грибов; (5) 2-диалкоксифосфорил- или 2-диалкилфосфорил-(2-метилпент-4-илиденовые) фрагменты являются новыми фармакофорными группами, их введение в молекулы пиридиноил- и ароилгидразидов приводит к увеличению или появлению антимикробной активности при резком снижении токсичности.

#### Экспериментальная часть

Спектры ЯМР записаны на приборе «Bruker Avance-400» (400 МГц, <sup>1</sup>H; 161.0 МГц, <sup>31</sup>P; 100.6 МГц, <sup>13</sup>C) в CDCl<sub>3</sub> относительно остаточных сигналов растворителя. ИК-спектры получены на приборе «Bruker Vector-22» для суспензий веществ в вазелиновом масле или тонкой пленки между пластинами KBr.

[4-(2-Изоникотиноилгидразоно)-(2-метилпент-2-ил)диэтилфосфиноксид (**9a**). Смесь 5.9 г (0.0292 моля) (1-метил-4-оксопент-2-ил)диэтилфосфиноксида (**4b**) и 4 г (0.0292 моля) гидразида изоникотиновой кислоты и 50 мл бензола нагревали в круглодонной колбе, снабженной насадкой Дина—Старка и магнитной мешалкой в течение 1.5 ч, затем растворитель удалили перегонкой. Полученное масло постепенно переходило в порошкообразную массу, которую промыли абсолютным диэтиловым эфиром, порошок отфильтровали и высушили в вакууме (12 Торр, 60 °С). Получили 8.8 г (93%), изоникотингидразона **9a** в виде белого порош-





С, 57.00; Н, 8.28; N, 6.97; P, 7.75; S, 8.00.  $O_2PS$ . Вычислено (%): С, 56.98; Н, 8.30; N, 6.99; P, 7.75; S, 8.00.

**о токсичность соединений 4a—e, 8a,b и 9a—c** определяли на белых беспородных мышах обоего пола при внутримышечном способе введения<sup>29</sup>. Результаты исследования батывали по методу Беренса<sup>30</sup>. Мышам шести (шесть животных в каждой) вводили водные растворы препаратов, приготовленные стерильно непосредственно перед введением.  $\gamma$ -Фосфорилированные кетоны пиридиноилгидразоны **8a,b** и **9a—c** хорошо растворимы. Равные дозы соединений (250 мг) вводили с интервалами между ними. После введения соответствующих доз вели наблюдение за поведением животных, регистрировали число погибших. Обработку полученных результатов проводили графическим методом. Результаты представлены в таблице 1.

Эффекты интоксикации у мышей при введении диалкил-4-оксопент-2-ил)фосфиноксидов **4—c** и смеалкил-(арил)фосфиноксида **4j** были однотипными: угнетение дыхания и угнетение двигательной активности. Диалкил-(2-метил-4-оксопент-2-ил)фосфиноксиды оказывают влияния на ориентировочную реактивную активность.

Характер токсичности пиридиноилгидразоны диалкил-4-оксопент-2-ил)фосфиноксидов **8a,b** и, соответственно, диалкил-(2-метил-4-оксопент-2-ил)фосфиноксидов **9a—c** мало отличаются друг от друга: несколько минут после инъекции **8a,b** в токсических дозах у животных наблюдалось угнетение дыхания, падение двигательной активности, снижение тонуса, конечности теряли способность удерживать тело, но животные не переходили в боковое положение, в отличие от указанных соединений, димефосфон, соответственно<sup>1—3</sup>, при действии в токсических дозах вызывало подобное состояние животных. В случае гидразона **8a,b** также наблюдалось резкое снижение двигательной активности, затрудненное дыхание и повышенный тонус. Перехода в боковое положение также нет. Животные в этих случаях погибали на фоне асфиксии.

**Изучение токсичности изониазида** (возлепродукт гидролиза гидразонов **8a, 9a,c**) проведено на мышах при внутрибрюшинном способе введения (250 мг·кг<sup>-1</sup>, так как по данным литературы<sup>18</sup> его  $LD_{50}$  составляет  $151 \pm 6.9$  мг·кг<sup>-1</sup>). В указанной концентрации изониазид оказывает местно-раздражающее действие, симптомы «корчи» (втягивание живота, периодические подергивания тела), а через 55—65 мин у мышей развиваются клонико-тонические судороги.

При выявлении наиболее перспективного соединения пиридиноилгидразонов **9a—c** сравнивали соотношение токсичности и активности, т.е.  $LD_{50}/МИК$  (см. табл. 1). Используемого в качестве контроля изониазида это соотношение составляет 356. Для соединений **9c** и **9b** это соотношение соответственно 340 и 430, т.е. очень близко к контролю изониазида. У соединения-лидера — изониазида (2-метил-4-оксопент-2-ил)диэтилгидразона (**9a**) — соотношение  $LD_{50}/МИК$  составляет 3000. Гидразоны **9a—c**, как и пиридиноилгидразон-осфона **8a,b**, в отличие от изониазида, не вызывают нарушения функций центральной нервной системы при остром отравлении экспериментальных жи-

**риалы и методы изучения гепатотоксичности.** Изучение токсичности соединений **8a,b** и изониазид вводили 30 белым крысам массой 120—180 г внутрибрюшинным способом ежедневно в одно и то же время суток

(18-00—19-00) в течение 30 суток. Для каждого пиридиноилгидразона **8a,b** животные были распределены на три группы по 10 крыс в каждой: 1-я группа получала соответствующий гидразон **8a** или **8b** в дозе 250 мг·кг<sup>-1</sup>, 2-я — изониазид (100 мг·кг<sup>-1</sup>), 3-я группа — дистиллированную воду (контроль). Растворы препаратов готовили непосредственно перед введением путем растворения кристаллов в стерильной дистиллированной воде. Выбор дозы изониазида обусловлен анализом литературы по моделированию токсического изониазидного гепатита, где чаще всего прибегают к вышеуказанной дозе (100 мг·кг<sup>-1</sup>)<sup>31</sup>. Доза 250 мг·кг<sup>-1</sup> для гидразонов **8a,b** — эквимольная по пиридиноилгидразоновому фрагменту (возможное выделение изониазида при гидролизе пиридиноилгидразонов). Постоянно наблюдали за общим состоянием животных и их поведением. Каждые пять суток регистрировали массу подопытных крыс. В конце эксперимента животных забивали кровопусканием. Кровь от каждого животного отбиралась последовательно в две пробирки: в центрифужную (с последующим центрифугированием в режиме 3000 об·мин<sup>-1</sup> в течение 10 мин для получения сыворотки), и в вакутейнеры\* с сухим антикоагулянтом. Сыворотка использовалась для определения биохимических показателей, кровь с антикоагулянтом — для гематологических исследований. После забоя животных тщательно выделяли их внутренние органы (печень, почки, селезенку, надпочечники) и определяли их относительную массу (отношение массы органа (в мг) к массе тела (в г)). Для парных органов вычисляли среднюю массу.

Среди показателей красной крови на гематологическом анализаторе оценивали содержание эритроцитов, лейкоцитов, тромбоцитов, уровень гемоглобина, СОЭ. Из биохимических показателей определяли активность ферментов печени — аланинаминотрансферазы (АЛТ), аспаратамино-трансферазы (АСТ),  $\gamma$ -глутамилтранспептидазы (ГГТ), уровень глюкозы, мочевины, креатинина, общего билирубина и общего белка. Статистическую обработку результатов опыта проводили с использованием *t*-критерия Стьюдента<sup>30</sup>. Полученные результаты изложены при обсуждении гематологических свойств пиридиноилгидразонов **8a,b**.

**Изучение микобактериостатической активности** пиридиноилгидразонов диалкил-(2-метил-4-оксопент-2-ил)фосфиноксидов **9a—c** в отношении микобактерий туберкулеза штамма H<sub>37</sub>Rv проводили в Казанском тубдиспансере министерства здравоохранения Республики Татарстан, используя стандартную радиометрическую ростовую систему ВАСТЕС MGIT 960 (Becton Dickinson).

Содержимое пробирки MGIT — это питательный бульон, благодаря которому достигается ускоренный рост микобактерий. Пробирка содержит 7 мл стерильного питательного бульона Мидлбрук 7Н9, в который перед использованием вносится обогатительная добавка ВАСТЕС MGIT OADC (олеиновая кислота, альбумин, декстроза и каталаза). Для предотвращения контаминации необходимо добавить MGIT PANTA.

Кроме жидкой среды, в пробирке содержится бескислородный флюорохром — пентагидрат трис(4,7-дифенил-1,10-фенантролин)хлорид рутения, помещенный на дно пробирки и покрытый силиконом. Во время бактериального роста внутри пробирки происходит поглощение свободного кислорода и его замещение углекислым газом. По мере расходования свободного кислорода прекращается ингибирование флюорохрома. Флюоресценция становится видимой

\* Пробирки пластиковые (полиэтилентерефталат) силиконизированные с дозированным вакуумом, для исследования сыворотки крови.

при облучении пробирки УФ-светом и автоматически регистрируется фотодатчиками, встроенными в прибор. Интенсивность свечения прямо пропорциональна уровню расходования кислорода и регистрируется в единицах роста (GU). Система BACTEC MGIT 960 расценивает пробирку как положительную, если количество живых микроорганизмов в ней достигло 100 000 на 1 мл среды (GU > 75). Пробирка инкубируется при температуре 37 °С с последующим анализом.

Для определения бактериостатического действия соединений **8—10**, а также веществ сравнения (изониазид, гидразид никотиновой кислоты, тозилгидразид) готовили исходные растворы в воде и добавляли в пробирки MGIT в количествах, обеспечивающих получение конечной концентрации 0,1 мкг·мл<sup>-1</sup> среды. Опыты проводили методом серийных разбавлений на штамме *M. tuberculosis* H<sub>3</sub>-Rv. Культуру лабораторного штамма взвешивали на электронных весах и навеску в количестве 10 мг помещали в фарфоровую ступку, тщательно растирали и готовили суспензию культуры по бактериальному стандарту мутности — 100 млн микробных тел в 1 мл (10 ед.). Полученную суспензию в количестве 0,1 мл засеивали в пробирки BBL, содержащие жидкую питательную среду и 5,0 мл раствора исследуемого соединения (для каждого разведения) и устанавливали в прибор. Наличие роста микобактерий или отсутствие такового прибор регистрировал ежедневно в течение 11 или 41 суток. Минимальную ингибирующую концентрацию (МИК) определяли как наименьшую концентрацию, при которой рост *M. Tuberculosis* задерживался на 1 сутки по сравнению с изониазидом.

В качестве контроля использовали индивидуальные пробирки со средой радиометрической системы BACTEC MGIT 960 с культурой микроорганизмов без содержания химических соединений, а также с физиологическим раствором. Всегда для сравнения проводили аналогичные исследования с изониазидом. МИК изониазида по отношению к использованному штамму составил 0,5 мкг·мл<sup>-1</sup>. Все пробирки инкубировали при 37 °С в приборе. Результаты приведены в таблице 2.

**Сравнительные эксперименты по изучению антимикробной активности** иридинолидазидов димефосфона **8a, b**, димефосфона и изониазида изучали *in vitro* на штаммах бактерий *Escherichia coli*; *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*, *Salmonella paratyphi B* и грибка из рода кандида — *Candida Albicans*. Соединения разводили так, чтобы их конечные концентрации (1 : 50, 1 : 100, 1 : 1000 и 1 : 10000) получались в пробирках, содержащих по 1 мл взвеси суточной культуры микроорганизмов, после смешивания с 1 мл каждого испытуемого раствора. Через 2 и 24 ч с помощью платиновой петли делали высевы в пробирки, содержащие по 5 мл питательной среды. Пробирки термостатировали при 37 °С. Индикатором антимикробной активности служило отсутствие роста в пробирке. Контролем служили посе́вы микробных культур, контактировавшие с аналогичным объемом дистиллированной воды. Полученные данные приведены в табл. 3, 4

**Острую воспалительную реакцию** воспроизводили субпеллантарным введением крысам 0,1 мл 1%-ного раствора каррагинена (сульфатированный полисахарид из ирландского морского мха)<sup>32</sup>. Выраженность воспалительной реакции оценивали через 3 ч после индукции воспаления по изменению объема лапы (плетизмометрически). В исследовании использовано 80 белых крыс (семь опытных групп и одна контрольная группа, по 10 животных в каждой группе в каждом эксперименте). Водные растворы веществ

вводили внутривенно за 1 ч до введения каррагинена в следующих дозах: **8a** 800, 400 и 200 мг·кг<sup>-1</sup>; димефосфона 240 мг·кг<sup>-1</sup>; раствор смесь димефосфона (240 мг·кг<sup>-1</sup>) и изониазида (160 мг·кг<sup>-1</sup>); изониазида (42,5 мг·кг<sup>-1</sup>) и контроль (дистиллированная вода, 0,1 мл). Противовоспалительный эффект, оцениваемый по уменьшению отека, выражали в процентах к контролю.

### Список литературы

1. А. О. Визель, Р. С. Гараев, *Димефосфон. Новый аспект фармакологического подхода к соединениям фосфора*, Печать-сервис-XXI-век, Казань, 2011, 189 с.
2. В. Г. Малышев, И. В. Федоскин, *Применение димефосфона в медицине (фармаколитические, патогенетические и клинические аспекты)*, Наука, Москва, 2008, 172 с.
3. В. Г. Малышев, И. В. Федоскин, *Влияние димефосфона на гомеостаз организма*, Наука, Москва, 2007, 172 с.
4. (a) М. В. Сундукова, А. Р. Мутина, О. С. Дружинина, А. И. Скоринкин, *Журн. мембран. клеточн. биол.*, 2010, **27**, 202 [M. V. Sundukova, A. R. Mutina, A. I. Skorinkin, O. S. Druginina, *Biochemistry (Moscow) Supplement. Series A: Membrane and Cell Biology*, 2010, **27**, 226]; (b) V. V. Syakaev, E. Kh. Kazakova, J. E. Morozova, Y. V. Shalaeva, S. K. Latypov, A. I. Konovalov, *J. Colloid Interface Sci.*, 2012, **370**, 19; (c) И. Х. Валеева, А. Ф. Титоренко, В. Н. Хазиахметова, Л. Е. Зиганшина, *Экспер. и клин. фармакол.*, 2011, **74**, 13 [I. Kh. Valeeva, A. F. Titarenko, L. E. Ziganshina, *Eksp. i Klinich. Farmakolog.*, 2011, **74**, 13].
5. (a) Л. Д. Раснецов, Я. Ю. Шварцман, О. К. Яшинова, Н. Б. Мельникова, О. В. Петрякова, И. В. Гуляев, Пат. РФ № 2322240 (2008), *Бюл. изобрет.*, 2008, № 11 [L. D. Rasnetsov, I. Y. Shartsman, O. K. Yashinova, N. B. Melnikova, O. V. Petrakova, I. V. Gulaev, Pat. RF No. 2322240]; (b) А. Е. Большакова, А. Л. Боришпольский, Г. Ю. Князькин, Н. Б. Мельникова, И. В. Подухин, О. В. Подухин, И. П. Пьянзина, Пат. РФ № 2442591 (2012), *Бюл. изобрет.*, 20.02.2012; (c) С. Г. Фаттахов, Д. Н. Мингалеев, М. А. Сафин, В. С. Резник, И. Н. Зялялов, М. Я. Трemasов, А. И. Коновалов, А. А. Визель, Пат. РФ № 2281939 (2006), *Бюл. изобрет.*, 2006, № 26; (d) Р. Ф. Тумакаев, Пат. РФ № 391106 (2008), *Бюл. изобрет.*, 2008, № 11; (e) Р. Ф. Тумакаев, Д. С. Гусева, Р. С. Гараев, *Экспер. и клин. фармакол.*, 2010, **73**, 41 [R. F. Tumakaev, D. S. Guseva, R. S. Garaev, *Eksp. i Klinich. Farmakolog.*, 2010, **73**, 41 (in Russian)].
6. Р. С. Гараев, Л. Н. Зялялюдинова, А. Г. Овчинникова, А. О. Визель, Л. И. Щукина, в «Сб. аннотир. отчетов по НИР, выполненных членами АН РТ по плану приоритетных фундамент. и прикл. исслед. АН РТ на период 2001—2005. Этап 2004 г.», Изд-во ФЭН АН Республики Татарстан, Казань, 2005, **1**, № 2, с. 92.
7. Р. С. Гараев, Л. Н. Зялялюдинова, А. Г. Овчинникова, Л. Р. Кашанов, А. О. Визель, Л. И. Щукина, в сб. «*Материалы научно-практической конференции, посвященной памяти профессора Я. В. Костина*», Изд-во «Общество, здоровье, лекарство», Саранск, 2005, с. 37.
8. В. Ф. Миронов, Д. А. Татаринов, Т. А. Баронова, А. И. Коновалов, А. А. Костин, В. И. Крыштоб, Пат. РФ № 2374260 (2009), *Бюл. изобрет.*, 2009, № 23.
9. D. A. Tatarinov, V. F. Mironov, T. A. Baronova, A. A. Kostin, D. V. Krivolapov, V. I. Buzykin, I. A. Litvinov, *Mendeleev Commun.*, 2010, **20**, 86.
10. Д. А. Татаринов, В. Ф. Миронов, А. А. Костин, Т. А. Баронова, Б. И. Бузыкин, *Журн. общ. химии*, 2010, **80**,

1211 [D. A. Baronova, 2010, **80**, 11]. Д. А. Татаринов, Баронова, 1103 [D. A. Baronova, 2010, **46**, 1]. Д. А. Татаринов, Т. А. Баронова, *Sulfur, Silic* 13. Д. А. Татаринов, Добрынин, Бузыкин, 534. [D. A. Dobrynin, V. F. Mironov, **49**, 516]. 14. Т. А. Баронова, Добрынин, «Успехи химии со дня», ч. 2, с. 74. 15. И. И. Семина, Байчурин, журн., 2002 Tikhonova, *Pharm. Chem* 16. И. И. Семина, Байчурин, Р. С. Гараев, Semina, E. V. V. A. Pavlov, *Pharm. Chem* 17. А. В. Сыроев, Байшев, Т. 18. Г. П. Беспалов, *концентрация Химия, Ленинград* 19. (a) S. Rollas, (b) R. Sinha, J. Jain, *Med. J. A. Bijeve, I (d) I. Lessigii*

- [D. A. Tatarinov, V. F. Mironov, A. A. Kostin, T. A. Baronova, V. I. Buzykin, *Russ. J. Gen. Chem. (Engl. Transl.)*, **80**, 1211].
- Татаринов, В. Ф. Миронов, А. А. Костин, Т. А. Баронова, В. И. Бузыкин, *Журн. орган. химии*, 2010, **46**, 1103].
- [D. A. Tatarinov, V. F. Mironov, A. A. Kostin, T. A. Baronova, V. I. Buzykin, *Russ. J. Org. Chem. (Engl. Transl.)*, **46**, 1103].
- Tatarinov, V. F. Mironov, A. A. Kostin, A. V. Nemtarev, Baronova, V. I. Buzykin, Yu. G. Elistratova, *Phosphorus, Silicon. Rel. Elem.*, 2011, **186**, 694.
- Татаринов, А. А. Костин, Т. А. Баронова, А. В. Мухоморов, Е. В. Миронова, Д. В. Криволапов, Б. И. Бузыкин, В. Ф. Миронов, *Журн. орган. химии*, 2013, **49**, 1103].
- D. A. Tatarinov, A. A. Kostin, T. A. Baronova, A. V. Mironov, E. V. Mironova, D. V. Krivolapov, V. I. Buzykin, Mironov, *Russ. J. Org. Chem. (Engl. Transl.)*, 2013, **49**, 1103].
- Баронова, А. В. Немтарев, В. Ф. Миронов, А. В. Мухоморов, Б. И. Бузыкин, *Тезисы II Всерос. научн. конф. «Химическая синтез и комплексообразования», посвящ. 95-летию со дня рожд. проф. Н. С. Простакова*, Москва, 2012, с. 74.
- Семина, Е. В. Шиловская, Н. А. Тихонова, А. З. Ваичурина, Р. И. Тарасова, Р. С. Гараев, *Хим.-фарм. журн.*, 2002, **36**, 3 [I. I. Semina, E. V. Shilovskaya, N. A. Tikhonova, A. Z. Baichurina, R. I. Tarasova, R. S. Garaev, *Chem. J. (Engl. Transl.)*, 2002, **36**, 55].
- Семина, Е. В. Шиловская, Р. И. Тарасова, А. З. Ваичурина, В. А. Павлов, Н. А. Тихонова, И. Х. Валева, Р. С. Гараев, *Хим.-фарм. журн.*, 2002, **36**, № 4, 3 [I. I. Semina, E. V. Shilovskaya, R. I. Tarasova, A. Z. Baichurina, V. A. Pavlov, N. A. Tikhonova, I. Kh. Valeeva, R. S. Garaev, *Chem. J. (Engl. Transl.)*, 2002, **36**, 172].
- Сыроешкин, Н. А. Степанова, П. И. Попов, А. В. Плещинский, Т. В. Плетнева, *Суд.-мед. эксперт.*, 2009, 28.
- Беспамятнов, Ю. А. Кротов, *Предельно допустимые концентрации химических веществ в окружающей среде*, Ленинград, 1985, с. 157.
- Rollas, Ş. G. Küçükgüzel, *Molecules*, 2007, **12**, 1910; (b) Sinha, U. V. Singh Sara, R. L. Khlosa, J. Stables, *Med. Chem. Res.*, 2011, **20**, 1499; (c) M. Georgieva, I. Nikolova, *Pharmacia*, 2012, **59**, 10; (d) Lessigiarska, I. Pajeva, P. Prodanova, *Med. Chem.*, 2012, **8**, 462; (e) Beena, D. S. Rawat, *Med. Res. Rev.*, 2013, **33**, 693; (f) S. Ellis, D. S. Kalinowski, L. Leotta, M. L. H. Huang, P. Jelfs, V. Sintchenko, D. R. Richardson, J. A. Triccas, *Mol. Pharmacol.*, 2014, **85**, 269.
20. (a) ГОСТ 12.1.007-76. *Вредные вещества. Классификация и общие требования безопасности*; (b) А. А. Кулаков, Н. В. Кремлев, *Практикум по общей токсикологии*, Изд-во «Экоцентр», Казань, 2004, 116 с.
21. Ю. П. Китаев, Б. И. Бузыкин, *Гидразоны*, Наука, Москва, 1974, 416 с.
22. (a) Б. И. Бузыкин, В. Н. Набиуллин, Р. С. Гараев, Р. В. Честнова, Л. Р. Кашапов, Р. Ш. Валиев, В. Ф. Миронов, *Хим.-фарм. журн.*, 2013, **47**, 84 [B. I. Buzykin, V. N. Nabiullin, R. S. Garaev, R. V. Chestnova, L. R. Kashapov, R. Sh. Valiev, V. F. Mironov, *Pharm. Chem. J.*, 2013, **47**, 35]; (b) Р. С. Гараев, Б. И. Бузыкин, Л. Р. Кашапов, В. Н. Набиуллин, Л. Р. Ульянина, Д. А. Ильин, *Материалы IV съезда фармакологов России «Инновации в современной фармакологии»*, Изд-во Фолиум, Казань, 2012, с. 45; (c) Л. Р. Кашапов, Р. В. Честнова, Б. И. Бузыкин, Р. С. Гараев, В. Н. Набиуллин, Р. Ш. Валиев, *Там же*, с. 84.
23. L. Scharer, J. P. Smith, *Ann. Intern. Med.*, 1969, **71**, 1113.
24. M. A. Steele, R. F. Burk, R. M. Dez Prez, *Chest.*, 1991, **99**, 465.
25. (a) W. M. Benson, P. L. Stefko, M. D. Roe, *Amer. Rev. Tubercul.*, 1952, **65**, 376.
26. (a) С. П. Булавин, *Фармакологическая характеристика тубазиды*, Бюлл. ВИЭВ, Москва, 1982, (48), 61; (b) М. П. Бельский, М. А. Витолина, *Изв. АН Латв. ССР*, 1954, **2**, 96—104.
27. R. V. Sidhaye, A. E. Dhanawade, K. Manasa, G. Aishwarya, *Curr. Pharma Res.*, 2011, **1**, 135.
28. F. H. Herbert, *J. Org. Chem.*, 1952, **17**, 1653.
29. Р. У. Хабриев, *Руководство по экспериментальному (доклиническому) изучению новых фармакологических веществ*, Медицина, Москва, 2005, 832 с.
30. Л. М. Бельский, *Элементы количественной оценки фармакологического эффекта*, Медгиз, Ленинград, 1963, 152 с.
31. M. Chitra, N. Muthusudha, R. Sasikala, *Ancient Sci. Life*, 2003, **23**, 79.
32. C. A. Winter, E. A. Risley, G. W. Nuss, *Proc. Soc. Exp. Biol. Ther.*, 1962, **111**, 544.

Поступила в редакцию 24 марта 2014;  
после доработки — 5 мая 2014