

Zakład Farmakologii. Instytut Patologii Klinicznej. Akademia Medyczna w Lublinie
Kierownik: prof. dr hab. n. med. Zdzisław Kleinrok

Krystyna KOLASA, Grażyna RAJTAR,
Zdzisław KLEINROK

**Wstępne badania farmakologiczne ośrodkowego działania pochodnych
fenylowych i piperydynometylowej benzoksazolonu-2**

Предварительные фармакологические исследования центрального действия
дериватов фениловых и пиперидинометиловой бензоксазолону-2

Preliminary Investigation of the Central Action of Phenyl- and Piperidynometyl-
-Derivatives of Benzoxazolone-2-one

Przeprowadzone w ciągu ostatnich lat prace nad właściwościami benzoksazolinonu-2 oraz jego pochodnych, pozwoliły stwierdzić, że macierzysty benzoksazolone wykazuje działanie nasenne, przeciwbólowe, przeciwdrgawkowe, przeciwbakteryjne i przeciwraczące (4, 6, 8), a pochodne chlorowe wywierają podobne do fleksazonu działanie przeciwdrgawkowe i rozluźniające mięśnie szkieletowe (10). Wykazano również, iż pochodne oksazolonu wywierają efekty rozluźniające mięśnie szkieletowe, przeciwbólowe, antycholinergiczne i przeciwwzapalne. Na podstawie badań, przeprowadzonych z acylowymi i aminometylowymi pochodnymi benzoksazolonu, wysunięto hipotezę, iż efekty przeciwbólowe, hipotermiczny i sedatywny związane są nie tylko z ugrupowaniem benzoksazolowym czy łańcuchem aminometylowym, lecz również z atomem chloru bądź bromu (5). Niektóre z badanych pochodnych karbamidowych benzoksazolonu wykazywały dość znaczne działanie przeciwdrgawkowe, o sile nieco większej niż trimetadion czy parametadion (6). Jak wynika z szeregu przeprowadzonych badań, ośrodkowe działanie hamujące jest zasadniczą cechą badanych pochodnych benzoksazolonu-2, a czynnikiem odpowiedzialnym za te efekty jest prawdopodobnie układ benzoksazolinonu-2, a ściślej ugrupowanie amidowe -CO-N- cząsteczki. Należy też za-

znaczyć, że w pierścieniu cząsteczki benzoksazonów obok amidowego istniejący układ laktonowy -O-CO- nadaje tym związkom charakter cyklicznych karbaminianów -O-CO-N-, związków typowo sedatywnych (4).

W niniejszej pracy poddano wstępnej ocenie farmakologicznej 6 nowych pochodnych benzoksazonu-2, oznaczonych symbolami od R₁ do R₆:

- R₁ — 5-meta-bromofenylosukcynimidobenzoksazon-2,
- R₂ — 3-morfolinometylo-5-meta-bromofenylobenzoksazon-2,
- R₃ — 5-chloro-6-meta-bromofenylobenzoksazon-2,
- R₄ — 3-piperydynometylo-6-fluorobenzoksazon-2,
- R₅ — 6-fenylokarbamidobenzoksazon-2, (3),
- R₆ — 5-chloro-6-fenylokarbamidobenzoksazon-2, (3).

Badane związki zostały zsyntetyzowane w Zakładzie Chemii Farmaceutycznej Akademii Medycznej w Lublinie, pod kierunkiem prof. dr E. Domagaliny.

MATERIAŁ I METODY

Badania przeprowadzono na myszach szczepu Swiss, samicach o ciężarze ciała 18—25 g. Badane związki podawano dootrzewnowo w 3% roztworze Tweenu 80. Poszczególne grupy liczyły 8—10 zwierząt. Toksyczność ostrą oznaczano metodą Litchfielda i Wilcoxon'a (7), jako LD₅₀ po i.p. podaniu badanych związków, określając liczbę myszy padłych w ciągu 24 godz.

Ponadto oceniano wpływ badanych związków na: 1) temperaturę ciała myszy normotermicznych przy pomocy termometru termistorowego; 2) reaktywność myszy na elektryczny bodziec bólowy, stosując metodę Nilsena (9); 3) aktywność spontaniczną myszy przy użyciu aktometrów fotoopornikowych; 4) czas trwania snu heksobarbitalowego u myszy (65 mg/kg i.p.); 5) katalepsję wywołaną podaniem haloperidolu (1 mg/kg i.p.), zgodnie z metodą Zetlera i Mooga (12); 6) poziom mózgowej serotoniny (5-HT) i kwasu 5-hydroksyindoloctowego (5-HIAA), według metody Curzona i Greena (2), 7) poziom mózgowej noradrenaliny (NA) i dopaminy (DA), według metody Brodiego (1); 8) poziom mózgowego kwasu γ -aminomasłowego, według metody Suttona i Simmondsa (11).

W wymienionych testach badane związki stosowano w dawce odpowiadającej 1/20 i 1/10 ich LD₅₀, przy braku istotnego działania stosowano dawkę większą, odpowiadającą 1/5 LD₅₀. Dla związków, których LD_{min} było większe od 2000 mg/kg, przyjęto tę dawkę jako LD₅₀. Wyniki zestawiono w postaci średnich i opracowano statystycznie posługując się testem *t* Studenta.

WYNIKI

Toksyczność ostra wszystkich badanych związków jest większa od 2000 mg/kg i.p., jedynie LD₅₀ R₄ odpowiada dawce 460 mg/kg. Po podaniu związków w wymienionych dawkach obserwowano ogólne uspokojenie zwierząt.

Badane związki zastosowane myszom w dawce odpowiadającej 1/10 LD₅₀ w 30 min. po podaniu wykazują działanie hipotermiczne (najsilniejsze R₆ -4°C, najsłabsze R₄ -1,4°C). W przypadku związków R₁, R₂, R₄ i R₆ stwierdzono późniejszy efekt hipertermiczny, występujący w 90—120 min. po podaniu. Po zastosowaniu badanych związków w dawce odpowiadającej 1/20 LD₅₀ działanie hipotermiczne wykazywały jedynie związki R₄, R₅ i R₆ (tab. 1).

W badaniach nad reaktywnością myszy na elektryczny bodziec bólowy stwierdzono, że związki R₂, R₃, R₄, R₅ i R₆, zastosowane w dawce odpowiadającej 1/10 LD₅₀, wywierają działanie przeciwbólowe, przy czym jest ono najsilniejsze dla związku R₄ (tab. 2).

Wykazano, że wszystkie badane substancje, zastosowane w dawkach odpowiadających 1/10 i 1/20 LD₅₀, zmniejszają ruchliwość spontaniczną myszy (tab. 3).

W interakcji z heksobarbitalem stwierdzono znaczne wydłużenie czasu trwania snu po podaniu 1/5 LD₅₀ R₁, R₃ i R₄ oraz 1/10 LD₅₀ R₂, R₅ i R₆.

Zastosowane w dawce odpowiadającej 1/5 LD₅₀, związki R₁, R₂, R₅ i R₆ nasilają, związek R₃ zmniejsza, a R₄ nie wpływa na katalepsję wywołaną podaniem haloperidolu.

W badaniach biochemicznych stwierdzono, że zastosowane w dawce 1/5 LD₅₀ związki R₂, R₃ i R₄ podwyższają, a R₆ obniża poziom 5-HT. Związki R₂, R₄ i R₆ obniżają poziom 5-HIAA. Związki R₂, R₃ i R₅ obniżają, a R₄ podwyższa poziom mózgowej NA, natomiast R₂ i R₅ obniżają poziom DA w mózgu myszy. Badane związki, zastosowane w dawce 1/5 LD₅₀, obniżają poziom GABA, jedynie związek R₁ podnosi, a R₂ nie wpływa na poziom tego aminokwasu w mózgu myszy (tab. 4).

DYSKUSJA

Na podstawie przeprowadzonych badań stwierdzono, że największą toksycznością cechuje się piperydynometylowa pochodna benzoksazolu-2, czyli związek oznaczony symbolem R₄. Natomiast LD₅₀ wszystkich badanych pochodnych fenylowych jest większe od 2000 mg/kg. Po zastosowaniu R₄ w dawkach zbliżonych do LD₅₀ obserwowano zniesienie odruchu postawy, a po 15 min. sen, trwający ok. 2 godz. Pozostałe związki wykazywały wyraźne działanie uspokajające, utrzymujące się przez czas 2—3 godz. po podaniu. Wszystkie badane pochodne działały hipotermicznie, przy czym działanie to było najsilniejsze w 30 min. po ich zastosowaniu. W przypadku związków R₁, R₂, R₄ i R₆ początkowemu działaniu hipotermicznemu towarzyszył następnie (90—120 min. po podaniu) wzrost

Tab. 1. Wpływ pochodnych fenylowych i piperidynometylowej benzokazolonu-2 na temperaturę ciała myszy ($n=8$)
 The influence of phenyl and piperidynomethyl derivatives of benzoxazolin-2 on the body temperature of mice ($n=8$)

Stosowano i.p.	Srednia różnica temperatur w stosunku do pomiaru wyjściowego po czasie (min.) °C ±SE				
	30'	60'	90'	120'	150'
Grupa kontrolna	+0,06 ±0,28	-0,83 ±0,17	+1,1 ±0,12	-0,46 ±0,11	+0,57 ±0,13
R ₁ 1/10 LD ₅₀	-2,3 ±0,31**	-0,01 ±0,18**	+0,4 ±0,27*	+0,85 ±0,32**	+0,74 ±0,15
R ₂ 1/10 LD ₅₀	-3,25 ±0,22**	+1,45 ±0,24**	-0,16 ±0,11**	+1,28 ±0,16**	-0,4 ±0,08**
R ₃ 1/10 LD ₅₀	-1,6 ±0,45**	-0,85 ±0,34	+1,1 ±0,12	-1,06 ±0,21	+0,88 ±0,22
R ₄ 1/10 LD ₅₀	-1,38 ±0,37**	-0,42 ±0,27	+0,01 ±0,15**	+0,41 ±0,21**	+0,12 ±0,21
Grupa kontrolna	-0,77 ±0,15	+0,26 ±0,13	+0,22 ±0,15	-0,67 ±0,19	
R ₁ 1/20 LD ₅₀	-1,08 ±0,2	-0,16 ±0,31	+1,08 ±0,2**	+0,07 ±0,081**	
R ₂ 1/20 LD ₅₀	-1,45 ±0,47	+0,04 ±0,25	+0,24 ±0,16	+0,25 ±0,19**	
R ₃ 1/20 LD ₅₀	-1,53 ±0,62	+0,06 ±0,54	+1,03 ±0,37**	-0,4 ±0,27	
R ₄ 1/20 LD ₅₀	-0,41 ±0,08*	-0,62 ±0,15**	+0,9 ±0,11**	+0,08 ±0,18*	
Grupa kontrolna	-0,50 ±0,23	0,0 ±0,1	-0,15 ±0,09	+0,31 ±0,10	
R ₅ 1/10 LD ₅₀	-3,5 ±0,12**	-0,18 ±0,37	+0,35 ±0,16	+0,36 ±0,29	
R ₆ 1/10 LD ₅₀	-4,05 ±0,54**	+0,8 ±0,62	+1,13 ±0,36**	+0,56 ±0,18	
Grupa kontrolna	-0,66 ±0,16	+0,16 ±0,33	-0,02 ±0,10	+0,48 ±0,14	
R ₅ 1/20 LD ₅₀	-2,25 ±0,46**	+0,20 ±0,20	+0,66 ±0,25*	+0,58 ±0,17	
R ₆ 1/20 LD ₅₀	-2,03 ±0,35**	+1,11 ±0,43	+0,36 ±0,11	+0,01 ±0,20	

* $p < 0,05$; ** $p < 0,005$.

Tab. 2. Wpływ pochodnych fenylowych i piperidynometylowej benzoksazolonu-2 na reaktywność myszy na bodziec bólowy elektryczny
 The influence of phenyl and piperidynomethyl derivatives of benzoxazolone-2 on the reactivation of mice to the electric pain stimulus

Stosowano i.p. 1/10 LD ₅₀	Średnia różnica natężenia prądu powodującego wystąpienie reakcji bólowej po czasie (min.) ($\mu\text{A} \pm \text{SE}$)										
	15'	30'	45'	60'	75'	90'	120'				
Grupa kontrolna	-0,5 +0,125	+0,22 ±0,35	+0,16 ±0,16	-0,16 ±0,16	-0,16 ±0,16	+0,33 ±0,21	-0,33 ±0,21	+0,16 ±0,16			
R ₁	+0,125	+0,35	-0,125	+0,125	+0,18*	-0,25	+0,31	-0,125			
R ₂	0,0	+0,0*	+0,375	±0,18	+0,125	+0,29	+0,12	+0,125			
R ₃	+0,5	+0,32*	+1,12	±0,63**	+0,25	+0,45	-0,375	+0,18*			
R ₄	0,0	+0,0*	+1,0	±0,32**	+1,0	±0,29**	+0,31*	+1,37			
R ₅	+1,12	±0,29**	+1,12	±0,61	+0,25	±0,36	-1,0	±0,26*			
R ₆	+0,83	±0,3	+1,0	±1,12	0,0	±0,0	-0,33	±0,49			

* $p < 0,05$; ** $p < 0,005$.

Tab. 3. Wpływ pochodnych fenylowych i piperidynometylowej benzoksazolonu-2 na ruchliwość spontaniczną myszy ($n=8$)
 The influence of phenyl and piperidynomethyl derivatives of benzoxazolin-2 on the spontaneous of mice ($n=8$)

Stosowano i.p.	Czas w min. po podaniu badanych substancji					
	15'	30'	45'	60'	90'	120'
Grupa kontrolna	111 ±11,52	84 ±20,26	69 ±14,41	64 ±16,95	83 ±21,76	61 ±27,35
R ₁ 1/10 LD ₅₀	80 ±6,72	28 ±9,77*	9 ±2,99**	7 ±4,23**	15 ±6,14**	19 ±5,69
R ₂ 1/10 LD ₅₀	68 ±13,59*	20 ±13,28*	20 ±12,18*	16 ±7,74*	27 ±18,65	20 ±11,35
R ₃ 1/10 LD ₅₀	90 ±15,19	13 ±4,61**	6 ±2,42**	7 ±2,27**	40 ±10,78	33 ±8,33
R ₄ 1/10 LD ₅₀	45 ±1,84**	54 ±18,35	59 ±13,22	15 ±4,56*	22 ±9,2*	39 ±7,64
R ₁ 1/20 LD ₅₀	45 ±10,37**	16 ±6,59**	6 ±2,50**	29 ±13,55	22 ±8,64*	6 ±1,41
R ₂ 1/20 LD ₅₀	51 ±11,63**	17 ±5,17**	33 ±8,94*	7 ±1,71**	16 ±7,57*	15 ±4,76
R ₃ 1/20 LD ₅₀	73 ±11,54*	19 ±6,72*	8 ±2,98**	8 ±3,25**	18 ±5,85*	9 ±2,6
R ₄ 1/20 LD ₅₀	95 ±8,86	122 ±18,6	45 ±9,7	14 ±5,34*	35 ±15,54	27 ±13,3
Grupa kontrolna	102 ±21,19	72 ±4,16	88 ±7,84	86 ±14,33	64 ±27,71	12 ±4,33
R ₅ 1/10 LD ₅₀	77 ±14,10**	9 ±3,16**	8 ±4,09**	10 ±3,68**	19 ±24,70	28 ±10,82
R ₆ 1/10 LD ₅₀	73 ±7,80	12 ±3,32**	13 ±3,85**	14 ±5,34**	10 ±2,59*	18 ±4,85
Grupa kontrolna	177 ±12,06	124 ±13,92	84 ±21,64	67 ±19,95	79 ±26,86	42 ±18,55
R ₅ 1/20 LD ₅₀	94 ±12,99**	11 ±4,43**	22 ±10,04	22 ±13,40	32 ±13,40	23 ±9,94
R ₆ 1/20 LD ₅₀	126 ±38,32	28 ±12,07**	8 ±3,02**	18 ±6,45*	22 ±7,91*	10 ±5,54

* $p < 0,05$; ** $p < 0,005$.

Tab. 4. Wpływ pochodnych fenylowych i piperydynometylowej benzoksazolonu-2 na poziom 5-HT, 5-HIAA, NA, DA i GABA w mózgu myszy ($n=8$)
 The influence of phenyl and piperydinomethyl derivatives of benzoxazolin-2 on the 5-HT, 5-HIAA, NA, DA and GABA level in the brain of mice ($n=8$)

Stosowano i.p. 1/5 LD ₅₀	Zawartość mózgowa ($\mu\text{g/g} \pm \text{SE}$)				
	5-HT	5-HIAA	NA	DA	GABA
Grupa kontrolna	0,409 \pm 0,016	0,504 \pm 0,019	0,4772 \pm 0,013	1,440 \pm 0,082	370 \pm 12,46
R ₁	0,457 \pm 0,019	0,510 \pm 0,021	0,4485 \pm 0,016	1,390 \pm 0,061	402 \pm 8,17*
R ₂	0,502 \pm 0,012**	0,450 \pm 0,014*	0,4111 \pm 0,014**	1,000 \pm 0,067**	390 \pm 10,46
R ₃	0,493 \pm 0,012**	0,525 \pm 0,027	0,4156 \pm 0,012**	1,070 \pm 0,053	222 \pm 9,03**
Grupa kontrolna	0,588 \pm 0,020	0,638 \pm 0,028	0,5310 \pm 0,019	2,00 \pm 0,12	370 \pm 12,46
R ₄	0,737 \pm 0,101**	0,511 \pm 0,033*	0,5940 \pm 0,016*	2,007 \pm 0,15	186 \pm 11,60**
R ₅	0,577 \pm 0,027	0,586 \pm 0,016	0,4740 \pm 0,017*	1,642 \pm 0,080*	154 \pm 20,88**
R ₆	0,517 \pm 0,018*	0,546 \pm 0,033*	0,5130 \pm 0,006	1,718 \pm 0,110	195 \pm 5,22**

* $p < 0,05$; ** $p < 0,005$.

temperatury ciała. Wyniki przeprowadzonych badań z pochodnymi benzoksazolonu-2 pozwalają wyciągnąć wniosek o ośrodkowym działaniu hamującym tych związków, za czym przemawia: zmniejszenie ruchliwości spontanicznej, wydłużenie czasu trwania snu heksobarbitalowego oraz nasilenie działania kataleptycznego haloperidolu przez większość badanych związków.

Nasilenie katalepsji przy równoczesnym obniżeniu poziomu mózgowej dopaminy może wskazywać na pewien udział mechanizmów dopaminer-gicznych w działaniu tych pochodnych.

Nie można również wykluczyć udziału układu serotonergicznego w mechanizmie ich działania. Obniżenie poziomu 5-HIAA po zastosowaniu związków R₂, R₄ i R₅ świadczyć może o zahamowaniu uwalniania 5-HT do szczeliny synaptycznej. Zgodnie z danymi literaturowymi (8), można wysunąć przypuszczenie, że stwierdzone efekty hamujące oraz obserwo-wane działanie przeciwbólowe i obniżające temperaturę ciała są związane z budową chemiczną badanych związków, a ściślej mówiąc — z układem benzoksazolonu-2. Działania te są charakterystyczne dla większości po-chodnych benzoksazolonu-2, co stwierdzono również na podstawie wcześ-niejszych badań przeprowadzonych w naszym zakładzie (4, 5, 6).

PIŚMIENNICTWO

1. Brodie B. B. i wsp.: Application of Steady State Kinetics to the Estimation of Synthesis Rate and Turnover Time of Tissue Catecholamines. *J. Pharmacol. exp. Ther.* **154**, 493, 1966.
2. Curzon G., Green A. R.: Rapid Method for the Determination of 5-hydroxytryptamine and 5-hydroxyindoloacetic Acid in Small Region of Rat Brain. *Brit J. Pharmacol.* **39**, 653, 1970.
3. Domagalina E. i wsp.: Nowe pochodne karbamidowe benzoksazolinonu-2. *Ann. Univ. M. Curie-Skłodowska, Lublin, Sectio D*, **35**, 121 (1980).
4. Kolasa K.: Ośrodkowe działanie nowych pochodnych benzoksazolinonu-2 i 3-hydroksybenzoksazolu. *Acta Polon. Pharm.* **2**, 241, 1979.
5. Kolasa K., Kleinrok Z.: Ośrodkowe działanie nowych pochodnych acylo-wych i aminometylowych benzoksazolonu-2. *Acta Polon. Pharm.* **3**, 383, 1979.
6. Kolasa K., Kleinrok Z.: Wstępne badania farmakologiczne nowych kar-bamidowych i sukcyrimidowych pochodnych benzoksazolonu-2. *Acta Polon. Pharm.*, 1980 (w druku).
7. Litchfield J. T., Wilcoxon F.: A Simplified Method of Evaluating Dose-Effect Experiments. *J. Pharmacol.* **96**, 99, 1949.
8. Mann N., Mutschler E.: On the Analgetic Activity of some Reduced Biphenyl Mannich Bases. *Arch. Pharm.* **309**, 320, 1976.
9. Nilsen P. L.: Studies on Analgesimetry by Electrical Stimulation of the Mouse Tail. *Acta. Pharmacol. Tox.* **18**, 10, 1961.
10. Paskov D. i wsp.: Pharmacological Activity of Benzoxazolones. *Farmatsiya (Sofia)* **25**, 61, 1975.

11. Sutton I., Simmonds M. A.: Effects of Acute and Chronic Pentobarbitone on the γ -aminobutyric Acid System in Rat Brain. *Bioch. Pharmacol.* **23**, 1801, 1974.
12. Zetler G., Moog E.: Die Bulbocapnin-Katatonie, ihre Synergisten und Antagonisten. *Arch. exp. Path. Pharmacol.* **232**, 442, 1958.

Otrzymano 15 IX 1980.

РЕЗЮМЕ

Проведено предварительные фармакологические исследования 5 новых фенилбвых и 1 пиперидинометилового дериватов бензоксазолинона-2. Доказано, что эти дериваты вызывают гипотермию, обладают аналгетическими свойствами, уменьшают спонтанную моторную подвижность, усиливают действие гексобарбитала, усиливают каталептическое действие галоперидола, а также изменяют содержание серотонина, 5-гидроксиуксусной кислоты, норадреналина, дофамина и ГАМК в мозге мышей.

Полученные результаты показывают, что исследованные дериваты обладают слабым центральным тормозящим действием. Предполагается, что эти центральные эффекты связаны с кольцом бензоксазола.

SUMMARY

Preliminary investigation of 5 new phenyl- and piperidynomethyl derivatives of benzoxazolin-2-one have been performed. It was found that these compounds decreased body temperature, developed analgesic activity, prolonged a sleeping time after hexobarbital injection, potentiated haloperidol-induced catalepsy and also performed some changes in a level of NA, DA, 5-HT, 5-HIAA and GABA in a mouse brain.

This can suggest that these derivatives have a weak central inhibitory action. It seems that their actions are connected with the benzoxazole rings.

