بسم الله الرحمن الرحيم

International University of Africa

Post-Graduation College

Department of Pharmacology and Toxicology

The Pharmacological Activities of New Synthetic Compounds, *in vitro* and *in vivo* Studies

A thesis submitted to the department of pharmacology and Toxicology, faculty of pharmacy, International University of Africa, for the full fulfillment of requirement for the degree of Master of pharmacology

BY

Mazin Yousif Babiker Alsafi

(B. Pharm. 2013)

Supervisor

Dr. Aimun Abdelgaffar Elhassan Ahmed

(B. Pharm., M. Pharm., Ph.D.)

Co-Supervisor

Dr. Tilal Alsaman Elemam Elbashir

(B. Pharm., M. Pharm., Ph.D.)

October, 2016

View metadata, citation and similar papers at core.ac.uk
brought to you by CORE
provided by International University of Africa Repository

قال تعالي:

﴿ قُلْ لَو كَانَ الْبَحرُ مِدَاداً لِكَلِمَات رَبِي لنَفِدَ الْبحرُ قَبلَ أَن تَنْفدَ لكَلِمَاتُ رَبِي وَلَوْ جِئْنَا بِمِثْلِهِ مَدَداً ﴾

سورة الكهف الاية ﴿109﴾

الإهداء

اليوم والحمد لله، أطوي تعب الايام وخلاصة المشوار وبين دفتي هذا البحث

إلي منارة العلم، سيد الخلق ..

ألي رسولنا الكريم محمد (صلي الله عليه وسلم)

ألي انسانة الروح ، إلي اميرة قلبي

إلي امي التي حاكت سعادتي بخيوط من قلبها الذهب

إلي من اشفقت علي ... هذا انا اهديك نتائج ذلك السهر

إلي من كان سببا في وجودي هنا، إلي روح ابي الطاهرة

الذي علمني ان ارتقي سلم الحياة بحكمة وصبر

إلي من سعي لانعم بالراحة والهناء، الذي لم يبخل بشيء من اجل دفعي الي النجاح

الي الانسان العظيم، الذي تربع علي عرش إعجابي،..... ولا زال

إلى الرجولة المكتملة.. و الدفء الأبوي.. الاخ الغالي لؤي يوسف

وإلى من حبهم يجرى فى عروقى ويلهج بذكرهم فؤادى, إلى إخوانى وأخواتى

إلي الكبيرة ..... وإلي الصغيرة

إلي الطيب المتسامح، الإبن البار علاء الدين .... إلي هادئ الطبع عماد الدين

إلي الجدة الغالية .. طبتي لنا بدعائك ليل نهار، ودمتي لنا

Dedication

DAD... may Allah forgive you

This work is nicely dedicated to

To my lovely mother

To my brothers and sisters

To my Schoolmates and professors

To all whom we care about them

And most importantly, to our Almighty God

I appreciate all efforts to do this work

Mazin

Acknowledgement

It would not have been possible to attain this level of education without the help of our almighty God, then a multitude of individuals.

First and foremost, I would like to express my profound gratitude and warmest thanks to my supervisor **Dr. Aimun AE. Ahmed** not only for his tremendous academic support, but also for his, guidance, motivation, enthusiasm, valuable comments and for offering me the possibility to work in his group, beside encouragement under his direct supervision that allow me subjected to his experience guidance throughout the study.

Without his guidance and support, this dissertation cannot be completed on time and i could not have imagined having a better advisor and mentor.

My sincere thanks also go to my Co-Supervisor **Dr. Tilal Alsaman,** the Head-department of Medicinal chemistry at Omdurman Islamic University, by ready the compounds, material, chemicals and sharing me with his valuable information and providing me the synthetic steps protocol.

He kindly read my paper and offered invaluable detailed advices on grammar, organization and the theme of the dissertation.

I am grateful to my big family represented by **All members** of the Pharmacology department and Technical staff at faculty of pharmacy, IUA for support and awareness during my stay between them.

Our thanks also go to the Technical staff at the Department of Pharmacognosy, Faculty of Pharmacy, IUA **Mr. Salah Abd Aljabar.**

I also wish to thanks my colleagues **Dr. Mwahib El-mutasim** and **Dr. Samreen Khalil,** for the pleasant co-operation, inspiriting discussion and stimulating me to complete this thesis.

I am deeply indebted to my wonderful friends, **Batch-6 IUA**, who have stood by me with their unconditional love, everlasting supports and never let me fall. I could have not tolerated these years of living away from home without their encouragement and compassion.

Finally, but by no means least, thanks go to my mum and family for almost unbelievable support. They are the most important people in my world and i dedicate this thesis to them.

Bibliographical Sketch

I am Mazin Yousif, I was born on August 24, 1991, in Khartoum, I obtained my B. Pharm. degree in pharmacy from Faculty of Pharmacy, IUA at 2013.

I joined Department of Pharmacology at faculty of Pharmacy IUA as a graduate student in Dec. 2015,

I submitted this thesis to get the Degree of M. Pharm. in Pharmacology in oct. 2016.

Table of Contents

Dedication iii

Acknowledgement ii

List of Tables viii

List of Figures ix

List of Abbreviations xii

ABSTRACT xiii

1. Introduction and Literature Review 1

1.1. Introduction 1

1.1.1. The Pain response 1

1.1.2. The inflammation process 3

1.2. Literature Review 8

1.2.1. Current Anti-Inflammatory Drugs 8

1.2.2. Pyrazole derivatives 12

1.2.3. Synthesis of tested compounds 14

1.3. The experimental modelling 17

1.3.1. Analgesic stimuli 17

1.3.2. Anti-inflammatory investigations 18

1.3.3. Ulcerogenic Potential estimation, in vivo study 20

1.3.4. In vitro pharmacological investigations on isolated preparations 21

1.4. The rationale of the study.....23

1.5. Study objectives 23

A- General objectives.....23

B- Specific objectives 23

2. Materials and Methods 25

2.1. Materials.....25

2.1.1. The standard drugs.....25

2.1.2. Chemicals.....26

2.1.3. Instruments.....27

2.1.4. Study schematic diagram.....28

Mechanism of action determination.....28

2.1.5. The tested substances.....29

2.1.6. Experimental animal housing and ethical considerations 29

2.2. Methods.....31

2.2.1. The Pharmacological investigations.....31

2.2.2. Statistical analysis methods 44

3. Results 46

3.1. Screening of analgesic activity for the synthetic compounds.....46

3.1.1. Analgesic activity of Diclofenac sodium 46

3.1.2. Preliminary screening of TPD compounds.....47

3.2. Anti-inflammatory activity of the most active selected compound (TPD-04).....53

3.2.1. In vivo Carrageenan induced Paw edema, on rats.....53

3.2.2. In vitro anti-inflammatory activity 55

A. Using membrane stabilization test.....55

B. Using Albumin denaturation activity test.....56

3.3. In vitro pharmacological isolated tissue preparations studies 58

3.3.1. Preliminary effect of TPD-04 on isolated rabbit intestine 58

3.3.2. Comparison of TPD-04 with contracting standard drugs as agonist 59

3.3.3. Mechanism of action determination using standard blockers 61

3.4. Ulcerogenic potential of the selected compound (TPD-04) 66

3.4.1. Incidence (%) and ulcer average number, on rat in vivo.....66

3.4.2. Ulcer index estimation.....66

3.4.3. Average severity of ulcerogenicity, and the total ulceration effect (%), on rat in vivo 67

4. Discussion.....69

4.1. Analgesic activity screening 69

4.2. Anti-inflammatory activity 69

4.3. In vitro isolated rabbit intestine preparations 71

4.4. Ulcerogenicity 73

5. Conclusion and Recommendations.....74

5.1. Conclusion 74

5.2. Recommendations 75

Reference 77

Appendix.....100

List of Tables

Table 2-1: The standard drugs used during the study with their origin sources and fundamental features.....25

Table 2-2: Chemicals used in the experiments.....26

Table 2-3: Instruments used in the experiments.....27

Table 3-1: Summary of the main pharmacological parameters EC_{50} and E_{max} of TPD-04 and vehicle control DMSO.. 59

Table 3-2: Summary of the main pharmacological parameters EC_{50} and E_{max} of TPD-04 with the contracting standards.. 61

Table 3-3: pA_2 values of the action of Atropine in a dose of [10^{-8} and 10^{-6} M] on contracting activity of TPD-04 and the standard Acetylcholine on isolated rabbit intestine. 63

Table 3-4: pA_2 values of the action of Cyproheptadine in a dose of [10^{-8} and 10^{-6} M] on contracting activity of TPD-04 and the standard Serotonin on isolated rabbit intestine. 65

Table 3-5: Recorded of percentage of incidence and average no of ulcer values calculated from the raw data. 66

Table 3-6: Recorded of percentage of Average Severity and total ulceration values calculated from the raw data. 68

List of Figures

Fig 1.1: Scheme of Synthesis of Phenoxy Pyrazolyl hydrazones TPD (01-04). 14

Fig 1.2: The tested compounds (TPD 01, 02, 03 and 04) with their structures, chemical names and main features 16

Fig 2.1: The study schematic diagram summarized the main study steps....28

Fig 3.1: Effect of standard Diclofenac sodium and control (corn oil) on the analgesic activity in mice using tail flick test.....46

Fig 3.2: Effects of TPD-01 and **(A)** control (corn oil) **(B)** Standard Diclofenac sodium on the analgesic activity in mice using tail flick test. 47

Fig 3.3: Effects of TPD-02 and **(A)** control (corn oil) **(B)** standard Diclofenac sodium on the analgesic activity in mice using tail flick test.. ...48

Fig 3.4: Effects of TPD-03 and **(A)** control (corn oil) **(B)** Standard Diclofenac sodium on the analgesic activity in mice using tail flick test. 49

Fig 3.5: Effects of TPD-04 and **(A)** control (corn oil) **(B)** Standard Diclofenac sodium on the analgesic activity in mice using tail flick test. 50

Fig 3.6: Effects of TPD compounds and **(A)** Control (Corn oil), **(B)** Standard Diclofenac sodium on the analgesic activity in mice using tail flick test. 52

Fig 3.7: The effect of TPD-04 and Standard Diclofenac sodium at different time interval on paw edema induced by carrageenan in rats, **(A)** Column and **(B)** Bar. 54

Fig 3.8: The Effects of TPD-04 and standard Diclofenac sodium using membrane stabilization test, **(A)** Column and **(B)** vertical bars.....56

Fig 3. 9: The Effects of TPD-04 and standard Diclofenac sodium using albumin denaturation activity test, **(A)** Column and **(B)** vertical bars. 57

Fig 3.10: Dose-response curve of **(A)** TPD-04 and **(B)** TPD-04 in the presence of DMSO in a dose ranging between [10^{-8} to 10^{-3} M] on isolated rabbit intestine. 58

Fig 3.11: Cumulative dose –response curve of TPD-04 in a dose ranging between [10-^{8} to 10-^{3} M] on isolated rabbit intestine, **(A)** with the standard Acetylcholine **(B)** the standard Serotonin **(C)** and Barium chloride.....60

Fig 3.12: Cumulative dose –response curve of Non-Selective M blocker (Atropine) in a dose [10^{-8} and 10^{-6} M] on contractile activity on isolated rabbit intestine. of **(A)** TPD-04 in a dose ranging between [10^{-8} to 10^{-3} M] and **(B)** the standard Acetylcholine. 62

Fig 3.13: E_{max} values for TPD-04 in a dose ranging between [10^{-8} to 10^{-3} M] with standard Blocker Atropine in a dose [10^{-8} and 10^{-6} M].....63

Fig 3.14: Cumulative dose –response curve of Non-selective 5Ht blocker (cyproheptadine) in a dose [10^{-8} and 10^{-6} M] on contractile activity on isolated rabbit intestine of **(A)** TPD-04 in a dose ranging between [10-^{8} to 10-^{3} M] and **(B)** the standard Serotonin.....64

Fig 3.15: E_{max} values for TPD-04 in a dose ranging between [10^{-8} to 10^{-3} M] with standard Blocker Serotonin in a dose [10^{-8} and 10^{-6} M].....65

Fig 3.16: Ulcer indices of doses of 50, 100 and 200 mg/kg of TPD-04 and compared with **(A)** Control (Corn oil), **(B)** Standard Diclofenac sodium. ...67

List of Abbreviations

COX-2	Cyclooxygenase enzyme type 2.
DMSO	Dimethyl sulphoxide
EC_{50}	The concentration of the drug producing 50% of their maximal relaxing effect.
E_{max}	The maximal relaxing effect of the drug.
i.p.	Intraperitoneally
pA_2	Negative logarithm of the competitive antagonist concentration at which the agonist concentration should be doubled to reach the same effect that without the antagonist.
pD_2	Negative logarithm of the non-competitive antagonist concentration that reduces an agonist effect to its $E_{max}/2$.
SAR	Structure-Activity Relationship.
S.E.M	Standard Error of Mean

ABSTRACT

Background: Pyrazole and its derivatives are an important class of compounds and attracted widespread attention due to their pharmacological properties, being reported to have a large spectrum of biological effects, especially analgesic and anti-inflammatory properties.

Objectives: The objectives of the present study were to screen four synthetic pyrazolyl derivatives (TPD compounds) for analgesic activity and select the best active one(s) for further biological investigations compared to the standard drug, these include:

Investigation of the anti-inflammatory activity of the most active selected compound(s), using *in vitro* and *in vivo* techniques. In addition, possible ulcerogenic potential on rats using *in vivo* techniques will be determined.

Determination of other pharmacological effect(s) using different *in vitro* isolated preparations.

Elucidation of the possible mechanism(s) of action underlay the most active compound(s).

Materials and Methods: TPD compounds were screened for analgesic activity by tail flick method in albino mice at the dose of 0.5, 1 and 2 mg/kg, i.p. (intraperitoneally), then TPD-04 was investigated for further *in vivo* anti-inflammatory activity by carrageenan induced rat paw edema in Wistar rats at

the dose of 10, 20 and 40 mg/kg, i.p. (intraperitoneally), and *in vitro* anti-inflammatory activity was evaluated using albumin denaturation, and Heat-induced hemolysis at doses ranging from [9×10^{2} to 9×10^{-1} µg/ml]. Then, the ulcerogenecity of TPD-04 was addressed by *in vivo* modelling in Wistar rats at the dose of 50, 100 and 200 mg/kg, PO (Per Oral); ulcer Index, severity Index, and % of total ulceration were measured.

Diclofenac sodium was used as a standard drug for the study of analgesic and anti-inflammatory activity as well as ulcerogenecity.

For isolated tissue; the cumulative dose-response curves of the TPD-04, Acetylcholine and Serotonin were constructed using different doses ranged (10^{-8} to 10^{-3} M), alone and in the presence of a single dose of a blocker, then the values of EC_{50}, E_{max} and pA_2 were determined as mean ± S.E.M and compared statistically. Non-selective blockers, Atropine and Cyproheptadine were used to elucidate the exact mechanism mediating the contractile effect of TPD-04.

The statistical differences will consider to be significant if $p \leq 0.05$.

Results: The tail flick method results showed that TPD compounds have significantly reduced pain. TPD-04 significantly reduced pain (p= 0.0003), when compared with control and gives maximum tail flick latency (= 6.91,

6.25 and 6.04) seconds at dose of [0.5, 1, and 2 mg/kg] respectively, while standard Diclofenac sodium(1mg/kg) give latency with (= 5.06 second).

The carrageenan induced paw edema results showed that TPD-04 has significantly reduced inflammation (p=0.0103), it gives maximum percent of inhibition at time 3 = (28.6 % and 25.0 % for TPD-04 at [40mg/kg] and Diclofenac [20mg/kg], respectively), with significant value (p=0.0307).

The percentage of membrane stabilization for TPD-04 and Diclofenac sodium were done at different concentrations. Maximum inhibition was observed for both TPD-04 and Diclofenac sodium at 900 µg/ml (97 % and 99 % respectively).

Both, the tested compound TPD-04 and the standard Diclofenac showed the maximum inhibition of albumin denaturation at 900 µg/ml (61.1 % and 63.9 %, respectively).

The ulcerogenecity results revealed the advantageously high gastric tolerance to compounds TPD-04 compared to standard Diclofenac.

For isolated tissue; our results revealed that TPD-04 exhibited dose-dependent contraction (p=0.018) on isolated rabbit intestine *in vitro* with lower potency and lower efficacy (almost its quarter effect) comparable to standards ACH and 5HT, this effect is mediated by muscarinic receptors and little serotoninergic.

Conclusion: The results obtained demonstrated that TPD-04 has potential health benefits as promising analgesic and anti-inflammatory, with low ulcerogenic potential, which can be used for the treatment of various diseases such as cancer, neurological disorders and inflammatory disorders.

Arabic Abstract المستخلص

خلفية الدراسة

تعتبر مركبات البيرازول ومشتقاتها من المركبات المهمة طبيا ، والتي تجذب انتباه الباحثين ، وذلك لخصائصها الدوائية الواسعة ، حيث انها اثبتت فعاليتها كمركبات مسكنة للالم ومضادة للالتهابات

اهداف الدراسة

تهدف هذه الدراسة لفحص النشاط المسكن للمركبات (تي بي دي) بطريقة نفض الذيل في الفئران البيضاء المعملية، ومن ثم اختيار افضلها نشاطا وتاثيرا لمزيد من الدراسات البيولوجية الأخري وتشمل:

تقييم النشاط المضاد للالتهاب للمركب (تي بي دي - 04) عن طريق استحداث الالتهاب بواسطة مادة الكاراجينان ، وتمسخ الألبومين، و ثباتية غشاء كريات الدم الحمراء.

دراسة التقرحات المعوية للمركب (تي بي دي - 04) عن طريق الحيوانات المعملية،

يهدف هذه البحث لدراسة الخواص الفارماكوداينامكية والتأثيرات الدوائية وتحديد آلية للمركب (تي بي دي - 04) الذي تقوم عليه عملها على امعاء الارنب المعزول باستخدام الطرق الفارماكولوجية المتعارف عليها علمياً.

منهجية إجراء الدراسة

تم فحص النشاط المسكن المركبات (تي بي دي) في الجسم الحي النشاط مسكن بطريقة نفض الذيل في الفئران البيضاء المعملية بإستخدام ثلاث جرعات [0.5 ،1 ، و 2 ملغرام/ كغ] عن طريق الحقن داخل الفجوة البريتونية ، ثم تم التحقيق للمركب (تي بي دي- 04) في الجسم الحي لمعرفة نشاطة كمضاد للالتهابات عن طريق استحداث الالتهاب بواسطة مادة الكاراجينان بإستخدام ثلاث جرعات [10 ،20 ، و 40 ملغرام/ كغ] عن طريق الحقن داخل الفجوة البريتونية.

وللتاكد من النتائج تم استخدام تجارب حيوية علي مستوي الانسجة (خارج جسم الحيوان) مثل ثباتية غشاء كريات الدم الحمراء و تمسخ الالبيومين عن طريق استخدام تراكيز تتراوح بين [900 إلي 0.9 ميكروغرام / مل].

ولدراسة التقرحات المعوية للمركب (تي بي دي - 04) تم إستخدام الفئران البيضاء المعملية بإستخدام ثلاث جرعات [50 ،100 ، و 200 ملغرام/ كغ] عن طريق الفم ، تم قياس معامل التقرح، معامل الشدة، ونسبة إجمالي التقرح.

تم استخدام عقار ديكلوفيناك الصوديوم القياسي كدواء قياسي (مرجع) لدراسة النشاط المسكن والمضاد للالتهاب وكذلك لدراسة التقرحات المعويه للمركبات تحت الدراسة.

للأنسجة المعزولة تم استخدام مجموعة من الادوية العيارية مثل عقار الاستايلكولين، والسيروتونين، كلوريد الباريوم، الاتروبين والسبروهيبتادين.

وبعد إذابة المركب (تي بي دي - 04) فى المذيب العضوى ثنائي– ميثل اوكسيد الكبريت تم انشاء منحنى الجرعة والاستجابة الكامل له وللادوية القياسية بشكل منفرد او فى وجود جرعات فارماكولوجية مختلفة من الشالات القياسية. بالإضافة لذلك تمت دراسة الخواص الفارماكوداينامكية المتوقعة للمركب (تي بي دي - 04) ببناء منحنى الجرعة والاستجابة للأدوية القياسية، ثم تحديد حساب قيمة كل من الجرعة التي تحدث نصف الفعالية القصوى (EC_{50}) ، الفعالية القصوى(E_{max}) ، ومعامل الشال النوعي (pA_2). أُستخدمت الادوية العيارية مثل عقار الاتروبين والسيبروهيبتادين لمعرفة الية الفعالية علي مستوي الانسجة.

قورنت جميع النتائج اعلاه إحصائيا وستعتبر الاختلافات مهمة عند قيمة الاحتمالية ($p \leq 0.05$).

النتائج

أظهرت النتائج طريقة نفض الذيل أن مركبات (تي بي دي) قد خفضت بشكل ملحوظ من الألم ،وان الفعالية تزداد بزيادة الجرعة.

المركب (تي بي دي - 04) اعطي انخفاضا ملحوظا من الالم (ع = 0.0003) مقارنة مع الدواء القياسي ويعطي أقصى فعالية كمون له في نفض الذيل (= 6.91، 6.25 و 6.04) ثانية في جرعة [0.5 ،1 ، و 2 ملغرام/ كغ] على التوالي في حين ان الدواء القياسي ديكلوفيناك الصوديوم [1 ملغرام/ كغ] إعطاء فعالية كمون مع (= ثانية5.06).

اظهرت نتائج استحداث الالتهاب بواسطة مادة الكاراجينان ان المركب (تي بي دي - 04) اعطي انخفاضا ملحوظا لوذمة كف القدم والاتهابات، بشكل ملحوظ (ع = 0.0103) وانه يعطي أقصى تثبيط له في الوقت 3 بالنسب المئوية (28.6 % و 25.0 %).

اظهرت النتائج عن طريق استخدام التجارب حيوية علي مستوي الانسجة (خارج جسم الحيوان) مثل ثباتية غشاء كريات الدم الحمراء و تمسخ الالبيومين فعالية واضحة للمركب (تي بي دي - 04)، حيث انه اعطي اقصي فعالية له في كلا التجربتين في تركيز [900 ميكروغرام/ مل] وكانت النتائج مقارنة مع الدواء القياسي ديكلوفيناك الصوديوم في نفس التركيز باستخدام ثباتية غشاء كريات الدم الحمراء هي (97 % و 99 % على التوالي) ، وباستخدام تمسخ الالبيومين هي (61.1 % و 63.9 % على التوالي).

كشفت نتائج دراسة التقرحات المعوية نتيجة تحمل عالية للمعدة للمركب (تي بي دي - 04) مقارنة مع الدواء القياسي ديكلوفيناك الصوديوم.

اظهرت النتائج خلو المذيب العضوى) داي ميثيل سلفوكسايد (فى التركيز المستخدم للاذابه من اى تاثير على امعاء الارنب المعزول، بينما اظهر المركب (تي بي دي - 04) انقباضا بسيطا علي النسيج

المعزول, وعند مقارنته مع عقارى الاستايلكولين والسرتونين مع انخفاض فاعلية وأقل فعالية (تقريبا ربع التأثير) لعقاري الاستايلكولين والسرتونين.

وأثبتت الدراسة ان هذه التاثيرات تنسب لتاثيره الواضح في المستقبلات المسكارينية، والتاثير البسيط نسبيا في المستقبلات السيروتونينية.

الخاتمة والتوصيات

أظهرت النتائج أن المركب (تي بي دي - 04) له فوائد صحية محتملة حيث اثبت فعاليته كعقار واعد كمسكن ومضاد للالتهابات، مع إحتمالية منخفضة لتقرحات المعدة، بالتالي يمكن استخدامه لعلاج العديد من الأمراض مثل السرطان، الاضطرابات العصبية، والاضطرابات الالتهابية.

المزيد من الدراسة مطلوبة علي هذه المركبات، خاصة على المستوى الجزيئي الدوائي، والتي قد تكشف الضوء على بعض الخصائص، وبالتالي اعطاء نتائج وتفسيرات دقيقة. مستقبلا، يؤخذ في الاعتبار، الآثار المحتملة من هذا المركب علي أمراض القلب.